

УДК: 57.089.2; 615.214.31; 615.323

Батарея тестов для изучения адаптогенного действия биологически активных веществ в доклинических исследованиях

©2021. Е.Б. Шустов^{1,2*}, С.В. Оковитый¹, В.Ц. Болотова¹, А.Е. Ким³

¹ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: shustov-msk@mail.ru

Поступила в редакцию 20.04.2021 г.

После доработки 26.05.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

По материалам статьи авторы предлагают исследователям проблем адаптации и изучения специфической адаптогенной активности стандартизированные подходы к биомедицинскому (доклиническому) исследованию новых биологически активных веществ, обеспечивающему их сопоставимость. Проведен анализ современных взглядов на процессы адаптации, как на повышение неспецифической устойчивости к адаптирующему воздействию, и свойств известных адаптогенов. Показано, что адаптогенное действие может быть реализовано за счет вовлечения нескольких регуляторных путей, таких, как изменение активности нейронов и эндокринного ответа в ответ на неблагоприятные воздействия, взаимодействие с клеточными рецепторами и модуляция их чувствительности к эндогенным регуляторам, изменение состава клеточных мембран, структуры цитоскелета, активности ферментных комплексов, эпигеномная регуляция, антиоксидантная и антирадикальная активность. Предложена группировка методов экспериментального исследования адаптогенов на основе их соответствия определению этого фармакологического класса и требованиям доказательной медицины. Выделены группы методов, направленных на повышение скорости и стойкости формирования состояния повышенной резистентности к неблагоприятным воздействиям, репаративно-восстановительные процессы, неспецифическая резистентность, психоактивирующее и нейропластическое действие, антимуtagenное и антиканцерогенное действие. Предложены конкретные схемы адаптирующих воздействий и критерии оценки адаптогенной активности на основе сопоставления полученных результатов с эффектами «эталонных» адаптогенов. Обоснована технология интегральной оценки результатов методик, различных по своей информационной значимости.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адаптация; адаптогены; белки теплового шока; гипертермия; гипоксия; гипоксия-индуцируемый фактор; интегральная оценка; ферменты антиоксидантной защиты; физическая нагрузка; экстремальные воздействия

DOI: 10.17816/phf65230/2713-153X-2021-2-3-10-25

СОКРАЩЕНИЯ:

ЦНС – центральная нервная система;
ФМБА – Федеральное медико-биологическое агентство;
ГТС – гипоксическая газовая смесь;
ПУ – показатель устойчивости;
ПСВ – показатель силовой выносливости;
СУР3А4 – изоформа 3А4 фермента цитохром-Р450-оксидазы;
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
НАДФН – восстановленная форма НАДФ;
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;
ДТНБ – 5,5-дитио-бис(-2-нитробензойная) кислота;
СОД – супероксиддисмутаза;
ТХУ – трихлоруксусная кислота;

ВВЕДЕНИЕ

Группа лекарственных средств, способная ускорять процессы адаптации, нормализующие и регулирующие функции организма и способствовать более полной реализации адаптационных реакций, называется адаптогенами [1]. С современной точки зрения, для отнесения к группе адаптогенов исследуемое соединение должно соответствовать трем критериям [2]:

1. Действие адаптогена должно быть неспецифическим, он должен повышать сопротивляемость организма к неблагоприятным воздействиям широкого диапазона факторов физической, химической и биологической природы.

2. Адаптоген должен обладать нормализующим действием независимо от направления предшествующих патологических изменений.

3. Он должен быть безопасным, при применении вызывать минимальные по выраженности изменения физиологических функций.

Защитное действие адаптогенов может являться результатом как опосредованного их влияния через нейрогуморальные регуляторные механизмы на эффекторные исполнительные органы, так и непосредственного влияния на клеточные структуры. Адаптогены, по мнению некоторых авторов [3, 4], оказывают комплексное действие на организм, влияя как на его регуляторные структуры (ЦНС, эндокринную систему, цитокиновое звено регуляции), так и непосредственно взаимодействуя с клеточными рецепторами разного типа (в том числе, модулируя их чувствительность к нейромедиаторам и гормонам). Кроме того, эти вещества способны влиять на состав мембранных компонентов, структуру клеточного цитоскелета, а также на активность ферментных систем [5, 6]. Наряду с этим, адаптогены способны непосредственно воздействовать на биомембраны, влияя на их селективную проницаемость для низкомолекулярных соединений и активность мембран-ассоциированных ферментов. Проникая в клетку, адаптогены непосредственно активизируют различные внутриклеточные системы (например, метаболизма ксенобиотиков, синтеза белков на эндоплазматическом ретикуломе, энергоредукции), а также пополняют эндогенный фонд субстратов и кофакторов антиокислительной системы, поскольку многие из них, являясь редокс-активными соединениями, обладают антиокислительными свойствами. Благодаря этому, адаптогены препятствуют развитию патологических состояний, обусловленных накоплением в организме продуктов свободно-радикального происхождения и липидных перекисей.

В обобщенном виде основные эффекты, типичные для применения адаптогенных препаратов [7], могут быть сведены к следующим:

- повышение устойчивости к повреждающим и неблагоприятным факторам внешней среды;
- повышение устойчивости к гипоксии (антигипоксическое действие);
- повышение физической выносливости и работоспособности;
- ускорение восстановления после поражений центральной нервной системы (черепно-мозговые травмы, нарушения мозгового кровообращения, нейроинфекции, нейроинтоксикации, различные физические воздействия и их последствия), при нервно-мышечных и нейродегенеративных заболеваниях;
- неспецифическое иммуностимулирующее действие, повышение уровня невосприимчивости возбудителей инфекционных заболеваний;
- повышение устойчивости к операционной травме, шоку различного генеза;
- антиоксидантное действие;
- повышение устойчивости к действию токсикантов;
- репаративно-восстановительное действие;
- антимуtagenное, антиканцерогенное действие;
- активация синтеза нуклеиновых кислот, протейносинтеза.

Анализ известных фармакологических эффектов применения адаптогенов растительного и животного происхождения, а также этилтиобензимидазолов (бемитил, томерзол) как препаратов экстренного действия, позволил сгруппировать их в следующие группы, которые могут быть основой для критерияльной оценки их значимости в адаптогенном действии:

А. Увеличение скорости и стойкости формирования состояния повышенной специфической резистентности (адаптации) к неблагоприятным (экстремальным) воздействиям. К этой группе эффектов относятся повышение устойчивости к повреждающим и неблагоприятным факторам внешней среды (физическим – гипоксия, гипертермия; химическим – повышение устойчивости к действию токсикантов), а также эффективности тренировочного процесса при физических нагрузках. Для изучения адаптации к гипоксии и гипертермии используется импульсно-прерывистая схема адаптации. Для изучения адаптации к физической нагрузке – гладкая схема 3-4-недельной тренировки.

Б. Репаративно-восстановительные эффекты. К этой группе относятся способность адаптогенов ускорять регенерацию печени после частичной гепатэктомии, ускорение восстановления после поражений центральной нервной системы (перевязка мозговых сосудов, дозированный кортикальный удар).

В. Неспецифическое повышение резистентности организма, не связанное с адаптационными процессами. К этой группе относится способность адаптогенов повышать перено-

GSH – восстановленный глутатион;

ДХБ – дихлорбензоил;

HIF-1 α – фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

TSPO – транслокаторный протеин;

БТШ – белки теплового шока;

РАН – Российская академия наук;

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота;

СПбГХФУ – Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет;

ВМедА – Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова;

ГосНИИИ ВМ – Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины.

симость хронического стресса, операционной травмы, шока любой этиологии, антиоксидантное, антирадикальное, а также иммуностимулирующее действие, повышение переносимости различных инфекций.

Г. Психоактивирующее действие. Этот вид активности адаптогенов проявляется, как правило, при введении более высоких доз в режиме однократного применения. Его признаками являются повышение физической работоспособности животных в нагрузочных (бег на тредбане, плавание с грузом) и поведенческих тестах (например, тест открытого поля).

Д. Отсроченные эффекты, характерные для длительного курсового применения. К этой группе относятся антимуtagenное и антиканцерогенное действие.

Методики выявления эффектов адаптогенов, отнесенных к группе А, являются обязательными. Без них решение вопроса о возможности отнесения исследуемого соединения к группе адаптогенов является не корректным. При этом достаточным является выполнение любой из отнесенных к этой группе методик.

Методики других групп не являются обязательными. Они могут быть использованы для детализации специфических особенностей действия потенциального адаптогена.

Цель статьи – предложить исследователям проблем адаптации и изучения специфической адаптогенной активности стандартизированные подходы к биомедицинскому (доклиническому) исследованию новых биологически активных веществ, обеспечивающему их сопоставимость.

ГРУППА А. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АДАПТОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

Экстремальные воздействия, к которым обычно формируется адаптация: гипоксия, гипертермия, интенсивные физические нагрузки.

Принципиальная схема исследований для этого типа критериев подразумевает четыре этапа:

- определение исходного уровня специфической резистентности;
- проведение цикла специфических тренировок для повышения переносимости воздействия;
- оценка конечного уровня специфической резистентности на следующий день после завершения тренировочного цикла;

– определение остаточного уровня специфической резистентности через семь дней после завершения тренировочного цикла.

Исходный уровень специфической резистентности исследуется на этапе рандомизации животных на экспериментальные группы и используется для формирования уравновешенных по этому показателю групп. Интервал «отдыха» животных между исходным тестированием и началом тренировочного цикла должно быть не менее 5–7 дней.

В ходе проведения тренировочного цикла животным, после завершения каждого тренировочного дня, вводится исследуемый препарат или физиологический раствор (контрольная группа). Для изучения адаптации к гипоксии и гипертермии используется импульсно-прерывистая схема адаптации. Для изучения адаптации к физической нагрузке – гладкая схема 3-4-недельной тренировки.

Исследование проводится по схеме независимых выборок с параллельным или перекрестным контролем. В исследованиях на крысах минимальное количество животных в группе должно быть не менее восьми. Тестирующее воздействие должно быть ориентировано на достижение предельного уровня его переносимости, сохраняющего при этом жизнь животного. Для исследования формируются контрольная и основные (по одной группе для каждой дозовой точки) экспериментальные группы.

В исследованиях на мышах, при возможности включения в исследование большого количества животных, целесообразно доводить тестирующее воздействие до смерти животного. При этом рандомизация животных на группы проводится без учета их исходного уровня резистентности к воздействию, а к числу экспериментальных групп добавляется интактная.

Для оценки перспективности применения изучаемого средства как адаптогена его активность должна быть соотнесена с активностью эталонного препарата (например, элеутерококка) при его применении в той же экспериментальной модели в стандартной дозе и выражена в «эталонных» единицах (например, элеутерококковых). По результатам анализа публикаций и нашим собственным исследованиям в качестве стандарта адаптогенной активности в биомедицинских исследованиях могут быть рекомендованы препараты и дозы, указанные в таблице 1.

Дозы адаптогенных препаратов, которые рекомендуются для применения в биомедицинских исследованиях в качестве «эталонного» стандарта для сопоставления адаптогенной активности биологически активных веществ

Doses of adaptogens suitable for biomedical research as a “reference” standard to compare the adaptogenic activity of biologically active substances

Эталонное средство	Стандартизация при производстве	Путь введения	Суточная доза, мг/кг
Экстракт корней женьшеня китайского сухой	5% гинзеноидов	Внутрижелудочный зондовый	5
Экстракт корневища элеутерококка колючего сухой	1% элеутерозидов	Внутрижелудочный зондовый	10
Экстракт корней родиолы розовой сухой	0,8% салидрозида или 1% розавина	Внутрижелудочный зондовый	1
Экстракт плодов лимонника китайского сухой	2% схизадринов	Внутрижелудочный зондовый	20
Экстракт корней аралии маньчжурской сухой	1:5	Внутрижелудочный зондовый	6
2-этилтиобензимидазол	Фармакопейной чистоты	Внутрижелудочный зондовый	25

Табл. 1.

Table 1.

А1. Адаптация к гипоксии

Оценка уровня устойчивости лабораторных животных к гипоксии определяется в соответствии с Методическими рекомендациями ФМБА России (2018). Основными критериями при этом могут быть среднегрупповое значение высотного порога и распределение животных по структуре устойчивости. Дополнительным – степень прироста уровня лактата крови.

Высотный порог у животных может определяться при выполнении как гипобарической, так и нормобарической гипоксической пробы. При проведении гипобарической пробы лабораторных животных (крыс) поднимают 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). На этой высоте они находятся пять минут (300 секунд), и их вновь поднимают с выбранной скоростью до следующей площадки, на 1000 м выше. Такой алгоритм реализуется до тех пор, пока у животного не фиксируется агональное дыхание, после чего крысу спускают до уровня земли со скоростью, равной скорости подъема. 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 два подхода. Первый – присвоение каждому временному промежутку (например, 100 секунд) пребывания на высоте определенного балла (табл. 2).

Табл. 2.
Балльная оценка устойчивости к гипоксии по критерию высотного порога для крыс
Table 2.
Hypoxia resistance rate with altitude tolerance criterion for rats

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

Второй подход связан с использованием дробной высотной шкалы, при которой целая часть равна высоте площадки в километрах, а дробная часть – отношению длительности жизни на этой высоте в секундах к длительности площадки. Например, крыса прожила на площадке 13 тыс. м 120 секунд при длительности площадки 300 секунд. Тогда высотный порог животного будет равен 13,4 км, а его устойчивость к гипоксии по высотному порогу будет равна 14 баллам.

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). Частотная кривая распределения значений показателя высотного порога (рис. 1) позволяет определить границы диапазонов устойчивости крыс к гипоксии, которыми 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 – к высокоустойчивым.

Для популяции здоровых крыс до 10% животных будут иметь низкую устойчивость к гипоксии, около 15% – высокую, 75% – среднюю.

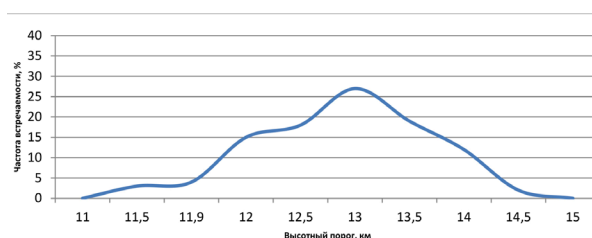


Рис. 1. Частотная кривая распределения значений высотного порога у крыс
Fig. 1. Frequency distribution curve of the altitude tolerance values of rats

Нормобарическая гипоксическая проба обычно проводится для мышей, так как технические возможности гипоксикаторов (предельно низкое содержание кислорода в гипоксической газовой среде – 3%, что соответствует высоте 13,5 км) могут не соответствовать высотному порогу для высокоустойчивых крыс.

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

В гипоксическую камеру помещают до тридцати мышей одновременно (в зависимости от объема камеры гипоксикатора). Для каждого животного регистрируют критический процент кислорода в гипоксической газовой смеси, который вызывал его гибель.

Стандартизированные условия эксперимента в гипоксикамере «БИО-НОВА-204» представлены на рисунке 2.

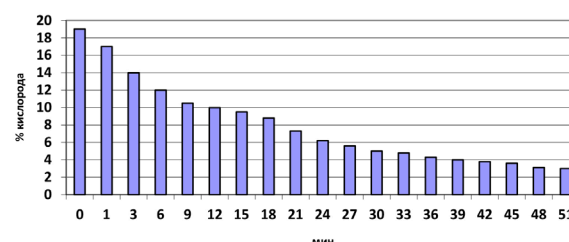


Рис. 2. Динамика процентного содержания кислорода в гипоксической газовой смеси при выполнении гипоксической пробы
Fig. 2. Trends in the oxygen concentration change in hypoxic gas mixture during the hypoxic test

Гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% до 3,4%. Для высокоустойчивых животных гибель 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%. Диапазону низкой устойчивости – 4,9% и более. В контрольной группе высокоустойчивых животных было 13%, среднеустойчивых – 67% и низкоустойчивых – 20%.

Для сопоставления результатов нормобарической и гипобарической гипоксических проб используется шкала пересчета, основанная на изменениях барометрического давления с высотой. Она представлена в таблице 3.

Экспресс-адаптация к гипоксической гипоксии может формироваться как при гипобарическом, так и при нормобарическом гипоксическом воздействии.

Гипобарическая экспресс-адаптация осуществляется в течение трех суток импульсно-прерывистым методом. Животные поднимаются в барокамере на высоту 5000 м, площадка – 30 мин, шесть циклов ежедневно, с интервалом между подъемами 15–20 мин. В середине и конце плато осуществлялся дополнительный подъем животных до высоты 6500 м, сразу после выхода на которую происходил спуск до высоты 5000 м.

Исследуемый препарат с потенциально адаптогенным действием вводится лабораторным животным максимально близко по времени (ближайшие 15–20 мин) после завершения последнего для данных суток барокамерного подъема (за цикл тренировок – трехкратное введение препарата).

Экспресс-адаптация к нормобарической гипоксии осуществляется в течение пяти тренировочных дней с интервалом в сутки. В каждый тренировочный день осуществляется три сеанса гипоксического воздействия. Животные помещаются в камеру гипоксикатора, который выводится на заданный для конкретного

тренировочного дня режим содержания кислорода. В первый и второй тренировочные дни площадка выдерживается 30 мин, в третий день – 25 мин, в четвертый и пятый – 20 мин. После чего животные переводятся на дыхание атмосферным воздухом. Через 15–20 мин пребывания в нормоксических условиях гипоксикатор повторно выводится на высоту +500 м к заданному режиму нормобарической гипоксии (при третьем гипоксическом воздействии – еще +500 м). Режимы содержания кислорода в гипоксической газовой смеси на уровне площадки представлены в табл. 4.

Исследуемый препарат с потенциально адаптогенным действием вводится лабораторным животным максимально близко по времени (ближайшие 15–20 мин) после завершения последнего для данных суток гипоксического воздействия (за цикл тренировок – пятикратное введение препарата).

На следующие сутки и через семь дней после завершения гипоксической тренировки осуществляется тестирование высотного порога у лабораторных животных. Индекс адаптационной активности исследуемого препарата определяется для первых суток после тренировки как отношение прироста (к интактной группе) высотного порога при применении препарата к аналогичному приросту для контрольной группы. Разность между индексами, полученными на первые и седьмые сутки после завершения экспресс-адаптации, будет характеризовать стойкость достигнутого повышения устойчивости к гипоксии.

Если исследуется влияние гипоксической тренировки на уровень устойчивости животных к гипоксии, то, на основании данных о распределении животных на группы по уровню устойчивости, для каждой экспериментальной группы рассчитывается показатель устойчивости:

$$ПУ = (C + 2 \times B) / (H + C + B),$$

где Н, С и В – число животных, отнесенных к подгруппам низкой, средней или высокой устойчивости.

Соотнесение содержания кислорода в гипоксической газовой смеси и эквивалентной высоты при стандартном барометрическом давлении и температуре

Correlation of the oxygen concentration in hypoxic gas mixture and the equal altitude values under standard barometric pressure and temperature conditions

% O ₂	10	9	8	7	6	5	4	3,7	3,6	3,5	3,3	3,2	3
pO ₂ , мм рт. ст.	76	68,4	60,8	53,2	45,6	38	30,4	28,12	27,36	26,6	25,08	24,32	22,8
Высота, км	6	6,8	7,3	8,1	9,6	10,9	12,1	12,5	12,7	12,9	13,1	13,3	13,5

Режимы содержания кислорода (%) в гипоксической газовой смеси при нормобарическом тренировочном гипоксическом воздействии

Conditions for the oxygen concentration (%) in hypoxic gas mixture during normobaric hypoxic exposure

	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Площадка	30 мин	30 мин	25 мин	20 мин	20 мин
Интервал	20 мин	20 мин	25 мин	30 мин	30 мин
Первый цикл	12%	11,1%	10,5%	10%	9,5%
Второй цикл	11,1%	10,5%	10%	9,5%	8,6%
Третий цикл	10,5%	10%	9,5%	8,6%	7,9%

Тогда об адаптационной активности препарата можно судить по отношению ПУ при приеме препарата к значению для контрольной группы.

Если для оценки влияния препарата на процессы адаптации к гипоксии использовалось несколько показателей, то интегральная оценка будет определяться как векторная сумма этих показателей.

А2. Адаптация к гипертермии

Исследование адаптации к гипертермии проводится на белых беспородных крысах. Оценка тепловой устойчивости лабораторных животных осуществляется по двум показателям: выживаемости в условиях непрерывного воздействия температуры воздуха $+40^{\circ}\text{C}$ и предельной физической работоспособности (плавание в воде с температурой $+40^{\circ}\text{C}$ и грузом 5% от массы животного). Исследование выполняется для всех экспериментальных групп (интактной, адаптационного контроля, адаптации на фоне препарата или эталона). На основе частотного анализа распределения этих показателей в группе интактных животных определяют границы диапазонов низкой, средней и высокой устойчивости к гипертермии.

Белых крыс-самцов весом 180–220 г в течение трех суток подряд ежедневно подвергают термоадаптационному воздействию. Для этого их в каждый тренировочный день трехкратно, на 20 минут с интервалом в 40 минут, помещают в термостат с температурой $+40^{\circ}\text{C}$ и относительной влажностью 35–37%. Исследуемые препараты вводят ежедневно, сразу после окончания дневного цикла «импульсно-прерывистой» тренировки в термокамере. На следующий день и через семь суток после завершения тепловых тренировок проводят повторное определение устойчивости животных к гипертермии по двум моделям: выживаемости при непрерывном воздействии гипертермии и времени плавания с грузом 10% от массы тела в воде с температурой $+40^{\circ}\text{C}$.

Индекс адаптационной активности исследуемого препарата определяется для первых суток после тренировки как отношение прироста (к интактной группе) среднegrupпового значения времени жизни в условиях гипертермии (времени предельного плавания животных с грузом) при применении препарата к аналогичному приросту для контрольной группы. Разность между индексами, полученными на первые и седьмые сутки после завершения экспресс-адаптации, будет характеризовать стойкость достигнутого повышения устойчивости к гипертермии.

Для оценки выживаемости животных при воздействии гипертермии могут быть использованы фиксированные временные точки: 75 минут (для неадаптированных животных выживаемость составляет примерно 30%) или 90 минут (выживаемость неадаптированных животных – около 10%).

Если исследовалось влияние тепловой тренировки на уровень устойчивости животных к гипертермии, то, на основании данных о распределении животных на группы по уровню устойчивости, для каждой экспериментальной группы рассчитывается показатель устойчивости, аналогично описанному для гипоксии.

Если для оценки влияния препарата на процессы адаптации к гипертермии использовалось несколько показателей, то интегральная оценка будет определяться как векторная сумма этих показателей.

А3. Адаптация к физическим нагрузкам (эффект тренировки)

При разработке модели оценки влияния фармакологических средств на динамику физиологической адаптации к нагрузке за основу была взята методика, описанная в работе Evangelista FS и соавторов [8].

В исследовании должно участвовать три группы животных: интактная (не подвергающаяся тренировочному процессу), контрольная (подвергающаяся тренировочному процессу, но животным в которой, вместо исследуемого препарата, вводится физраствор) и основная (животным в которой после завершения тренировок данного суточного цикла вводится анализируемое средство – кандидат в адаптогены или эталонный препарат). Предварительно животные должны пройти отбор для обеспечения однородности исследуемых групп по уровню физической работоспособности по любой из принятых в исследовательской организации методике оценки работоспособности (например, челночное или вынужденное плавание с утяжелением). Повторное исследование проводят через 4 недели тренировок. Оценивают время, необходимое животному для совершения отдельных заплывов, их количество и время плавания в целом (челночное плавание) или время вынужденного плавания животных с грузом.

Тренировки проводят в плавательной установке, представляющей собой 200-литровый бассейн высотой 40 см, шириной 35 см и длиной 80 см, заполняемой водой до половины. Внутри него располагался контур из оргстекла высотой 30 см, шириной 30 см и длиной 75 см, разделенный на 10 отсеков (15x15 см каждый) (рис. 3). Температура воды поддерживается постоянно на уровне $30\text{--}32^{\circ}\text{C}$.



Рис. 3. Плавательная установка для животных (общий вид)
Fig. 3. Swimming pools for rats (general view)

Плавательные тренировки проводят два раза в день с перерывом в час, пять дней в неделю на протяжении четырех недель, в одно и то же время. Продолжительность первых трех тренировок составляет один час раз в день для адаптации животных к нагрузке. В дальнейшем длительность одной тренировки – 1,5 ч (табл. 5).

Животные получают суточную норму еды после окончания второй тренировки, что позволяет избежать перекармливания перед тренировкой, негативно сказывающегося на тренировочном процессе.

Схема тренировочного процесса [9]
Training programme [9]

Табл. 5.
Table 5.

Показатель		Количество и время тренировок	
		1-я тренировка	2-я тренировка
Первичный тест	0 день		
	1–3 дни	1 ч	-
1-я неделя	4-5 дни	1,5 ч	1,5 ч
	6-7 дни		Отдых
2-я неделя	8–12 дни	1,5 ч	1,5 ч
	13-14 дни		Отдых
3-я неделя	15–19 дни	1,5 ч	1,5 ч
	20-21 дни		Отдых
4-я неделя	22–26 дни	1,5 ч	1,5 ч
	27-28 дни		Отдых
Итоговый тест	29-й день		

Под влиянием тренировочных физических нагрузок происходит развитие функциональной брадикардии. По данному показателю можно судить о наличии адаптационных изменений у тренированных животных. Также для оценки адаптационных реакций в ответ на тренировочную нагрузку могут использоваться биохимические показатели, определяемые в скелетной мышце (например, общий белок, гликоген, аденилнуклеотиды, ферменты энергетического обмена).

Об эффективности тренировочного процесса (адаптации к физическим нагрузкам) в плавательных тестах можно судить по приросту времени плавания до отказа при финальном тестировании (через сутки и через семь дней после завершения тренировок) в сравнении с длительностью плавания при исходном тестировании перед началом тренировочного цикла.

Оценка эффективности тренировочного процесса может быть выполнена и по динамике силовых характеристик мышечной ткани в тестах, связанных с выполнением упражнений с отягощением. В этих тестах движения можно разделить на динамические и статические. Статические упражнения характеризуются удержанием неподвижно рабочего веса с помощью тренируемой группы мышц. Динамические движения, в свою очередь, делятся на позитивные и негативные повторения. Позитивные повторения осуществляются с помощью тренируемой группы мышц путем ее сокращения при наличии дополнительного отягощения. Негативные повторения выполняются с нагрузкой, при которой развиваемого животным мышечного усилия недостаточно ни для сокращения, ни для удержания нагрузки в статическом режиме. При этом режим отягощения подобран таким образом, чтобы движение, обратное динамическому сокращению, т.е. растяжение тестируемой мышечной группы, было плавным и не травмировало животное.

Для выполнения «негативных повторений» для передних лап животному дают ухватиться за участок закрепленной проволоочной сетки динамометра и плавно,

в сопротивление естественному движению – подтянуть себя к проволоке, оттягивают до выпрямления лап, но так, чтобы животное их не разжимало. Затем усилие оттягивания уменьшают, давая животному подтянуть себя обратно. Повторы делают до тех пор, пока экспериментатор не ощущает у животного отсутствие способности притягивать себя к проволоке. После чего мышце дается минута отдыха, и подход повторяется. Выполняется три подхода. Тренировки проходят через день на протяжении трех недель.

До и после начала тренировочного цикла с помощью динамометра измеряется сила хвата передних конечностей. Суммарное количество движений за три повторения в каждом исследовании оценивают исходно, а также после первой, второй и третьей недели тренировок [10]. Интерпретируемыми показателями методики являются:

- показатель силовой выносливости, равный сумме результатов трех подходов подтягиваний;
- показатель эффективности тренировок, равный отношению ПСВ после завершения тренировочного цикла к значениям до его проведения.

О наличии адаптогенного действия тестируемого препарата можно говорить тогда, когда в группе с его применением будет выявлено статистически достоверное повышение показателя эффективности тренировочного процесса по сравнению с контрольной группой животных.

А4. Адаптация к химическим нагрузкам

Адаптация организма к химическим нагрузкам может осуществляться по различным механизмам, среди которых ведущим является индукция мощности метаболической трансформации ксенобиотиков. Можно предположить, что общебиологические закономерности адаптации (формирование структурного следа), протекающие на фоне индуцированного внешним воздействием протеинсинтеза, должны будут проявляться и в уровне индукции ферментов детоксикации ксенобиотиков.

К числу наиболее быстро индуцируемых ферментов относится изоформа цитохрома P450 CYP3A4, участвующая в первой фазе метаболической трансформации наиболее часто применяемых лекарственных препаратов со снижением активности около 60%. Важным свойством некоторых из метаболизируемых этим цитохромом препаратов является способность индуцировать на генетическом уровне экспрессию образования этого фермента. Наиболее сильными индукторами являются карбамазепин, фенитоин, рифампицин, фенobarбитал. Любой из указанных препаратов при курсовом применении в средних терапевтических дозах может быть инициирующим химическую адаптацию фактором.

Об интенсивности процессов химической адаптации можно судить по уровню накопления метаболита индуцирующего препарата (что может быть определено методами высокоточного химического анализа со спектрометрической идентификацией соединений) или на основании методики длительности барбитурового сна. Данная методика основана на том, что, после введения лабораторным животным стандартной дозы барбитурата, снижение длительности индуцированного препаратом сна определяется скоростью его метаболической биотрансформации, реализуемой изоформой цитохрома P450 CYP3A4.

Для оценки адаптационной активности тестируемого соединения формируются четыре группы лабораторных животных: интактная (не подвергающаяся воздействию индуктора микросомального окисления) и три экспериментальных (контрольная, эталонная и основная). В этих трех группах животным ежедневно на протяжении двух недель в утренние часы внутрибрюшинно вводят модельный индуктор экспрессии цитохрома. Кроме того, животным контрольной группы ежедневно внутрижелудочно зондом в конце дня вводят физиологический раствор. В эталонной группе – эталонный адаптоген в стандартной дозе. Животным основной группы вводят тестируемое на адаптационную активность соединение.

На следующие сутки после завершения периода индукции микросомального окисления во всех четырех группах проводят или тест на длительность барбитурового сна, или определение в крови животных уровня окислительного метаболита модельного индуктора (это исследование целесообразно выполнять через 6–8 часов после последнего введения индуктора).

Соотношение результатов исследования в контрольной и интактной группе позволяет охарактеризовать спонтанный уровень индукции активности ферментов биотрансформации, соотношение между значениями в основной и контрольной группе – оценить влияние на эти процессы тестируемого соединения, а соотношение значений в основной и эталонной группе – оценить уровень адаптационной активности в сравнении с реально используемым эталонным адаптогеном.

А5. Оценка перекрестной адаптации

Для адаптогенов характерно перекрестное влияние на уровень резистентности к экстремальным воздействиям. В частности – влияние адаптации к гипоксии на уровень физической работоспособности животных.

Общая схема исследования следующая:

этап 1 – исходное тестирование физической работоспособности любым из методов (тест бега на тредбане, плавательный нагрузочный тест);

этап 2 – экспресс-адаптация к гипоксии в соответствии с методикой, описанной в разделе А1;

этап 3 – финальное тестирование физической работоспособности на следующие сутки после завершения процедуры экспресс-адаптации;

этап 4 – отсроченное тестирование (через семь дней после завершения процедуры экспресс-адаптации) для оценки стойкости адаптационных сдвигов в физической работоспособности животных.

В исследовании участвуют четыре группы животных: интактная и три группы с экспресс-адаптацией к гипоксии (контрольная, с эталонным адаптогеном и с введением тестируемого вещества). Рандомизация животных на группы проводится по результатам тестирования физической работоспособности животных на первом этапе. Интервал времени между этапами 1 и 2 составляет не менее пяти дней. Животным трех групп с экспресс-адаптацией в конце каждого тренировочного дня внутрижелудочно вводят зондом соответствующие лекарственные препараты или физиологический раствор (в контрольной группе). Каждая группа с экспресс-адаптацией к гипоксии проходит все четыре этапа исследования. Общая схема исследования строится по схеме либо параллельного, либо перекрестного контроля. При этом интактная группа участвует только в первом, третьем и четвертом этапе.

О выраженности перекрестной адаптации будет свидетельствовать соотношение между результатами третьего этапа в основной и контрольной группах, а перспективность его дальнейшего изучения в качестве адаптогена – по соотношению результатов в основной и эталонной группах. О стойкости перекрестной адаптации можно будет судить по соотношению между результатами четвертого и третьего этапа исследования.

ГРУППА Б. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

К этой группе могут быть отнесены методы выявления регенераторного потенциала (восстановление ткани печени после частичной гепатэктомии) и нейро-реабилитационной активности после ишемического или травматического повреждения головного мозга животных потенциального адаптогена. С этой целью необходимо провести на лабораторных животных моделирование соответствующего поражения и, затем, в динамике оценивать полноту и скорость восстановления функциональной активности поврежденных органов и функциональных систем организма.

Также, как и при выполнении других тестов адаптационной активности, исследование должно выполняться с рандомизацией животных по следующим экспериментальным группам:

- интактная;
- оперированный контроль;
- оперированные животные + исследуемое вещество (потенциальный адаптоген);
- оперированные животные + эталонный адаптоген.

Введение препаратов и физиологического раствора для контрольной группы осуществляют по общим правилам через сутки после нанесения животным локального повреждения. Повторное введение препаратов осуществляет ежедневно на протяжении пяти дней в утренние часы. Животные интактной группы являются контрольными.

Б1. Оценка полноты регенерации печени после частичной гепатэктомии

Частичная гепатэктомия осуществляется на крысах массы 180–220 г под эфирным наркозом путем удаления левой боковой и центральной доли печени, что составляет примерно 60–70% массы печени животного. После ушивания раны печени и брюшной полости животных рандомизируют на группы по 6–10 крыс в каждой.

Исследуемые соединения и физиологический раствор для животных контрольной группы вводят на следующий день после операции и в последующие четыре дня внутрибрюшинно раз в день. Одна из экспериментальных групп является ложнооперированным контролем. Кроме того, выделяется отдельная группа животных для тестирования активности референсного препарата.

В качестве референсного препарата, кроме описанных ранее адаптогенов, может использоваться комбинация двух нестероидных анаболиков – рибоксина и оротата калия (50 мг/кг каждого препарата), для которых доказана способность ускорять процессы регенерации в поврежденной печени.

Для количественной оценки процессов регенерации печени вычисляется коэффициент полноты регенерации [11] по следующей формуле:

$$K = 100 \times \frac{P_1 - P_2}{P_3},$$

где P_0 – исходная масса печени;

P_1 – масса печени через семь дней после частичной гепатэктомии;

P_2 – масса оставшейся печени после частичной гепатэктомии;

P_3 – масса удаленной печени, $P_2 = P_0 - P_3$.

Исходная масса печени вычисляется по массе тела голодного животного, поскольку эти показатели для крыс массой 180–220 г линейно связаны. Для самцов массовый коэффициент равен $0,0518 \pm 0,0014$ г печени/г массы тела, для самок – $0,0517 \pm 0,0016$ г печени/г массы тела [12].

Функциональное состояние печени оценивается на седьмые сутки после гепатэктомии по продолжительности гексеналового сна, отражающего состояние микросомальной окислительной системы. Гексенал вводят внутрибрюшинно в дозе 80 мг/кг [13]. У ложнооперированных животных средняя продолжительность длительности барбитурового сна находится в диапазоне 21–38 мин, у оперированного контроля – 55–75 мин.

Кроме того, в качестве дополнительных показателей функционального состояния печени могут быть использованы биохимические показатели, определяемые в плазме крови животных: активность аланин- и аспаратаминотрансфераз, уровень общего билирубина, мочевины, общего белка.

Б2. Восстановление после локального кортикального удара

Черепно-мозговую травму крысам моделируют путем нанесения удара по участку сенсомоторной коры. Для создания травмы животных наркотизируют внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего проводят трепанацию в левой лобной части черепа над зоной сенсомоторной коры (рис. 4). Центр трепанационного отверстия должен находиться на пять миллиметров роstralнее и 2,5 миллиметра

медialнее брегмы. В трепанационное отверстие помещают подвижный стальной поршень диаметром три миллиметра с ходом четыре миллиметра, по которому с высоты 10 см ударяет скользящий в стальной трубке груз массой 50 грамм. Высверленную пластину возвращают на место, и зашивают разрез кожи.

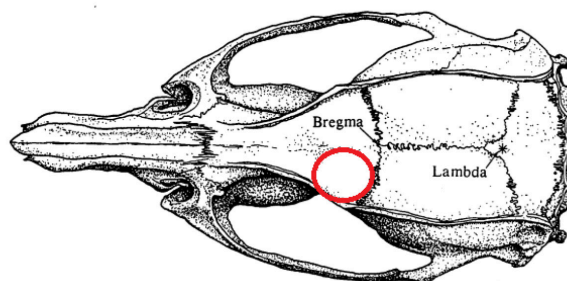


Рис. 4. Область трепанации черепа над зоной сенсомоторной коры [14]

Fig. 4. The location of craniotomy over the sensorimotor cortex [14]

В первые сутки после операции у животных оценивают выраженность неврологического дефицита в тесте «Стимулирование конечностей». Тест заключается в оценке ответа задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. Процесс тестирования состоит из семи различных испытаний, результаты которых выражают в сумме баллов.

Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета:

2 балла – крыса полностью выполняла испытание;

1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем две секунды и/или не полностью;

0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности.

Максимально возможное суммарное количество баллов было равно 14 [15, 16].

На третьи и седьмые сутки после нанесения травмы тест повторяют. Для оценки неврологического дефицита у животных, вместо теста стимулирования конечностей, могут использоваться тесты «Сужающаяся дорожка» или «Цилиндр», также позволяющие выявить нарушения локомоторных функций. Для оценки скорости восстановления разность в оценке локомоторной функции между третьим и седьмым днем периода восстановления в баллах делят на длительность периода восстановления между тестированием животных (четыре суток). Отношение этого показателя к результатам контрольной группы будет свидетельствовать о нейрореабилитационной активности исследуемого вещества, а по отношению к эталонному адаптогену – о его адаптогенной активности (в эталонных единицах).

Б3. Восстановление после перевязки сонных артерий

Церебральную ишемию моделируют двусторонней перевязкой левой и правой общих сонных артерий.

Крыс наркотизируют хлоралгидратом (350 мг/кг, Sigma, США). Посредством хирургического доступа выделяют общие сонные артерии, подводят под них полипропиленовые лигатуры и перевязывают. У ложнооперированных крыс выполняют те же манипуляции, кроме перевязки общих сонных артерий.

Исследуемые препараты вводят внутривенно на следующие сутки после выполнения манипуляций, и далее

ежедневно в утренние часы один раз в день на протяжении пяти дней. Животные контрольной и ложнооперированной групп получают физиологический раствор в эквивалентных количествах. Показателем, позволяющим в динамике оценивать процессы восстановления у животных, является время удержания на вращающемся стержне (тест Ротарод).

Методика предназначена для оценки чувства равновесия, способности удерживаться на вращающемся барабане [17, 18]. Для крыс используется вращающийся вал диаметра семь сантиметров, приподнятый на высоту 15 см над уровнем дна площадки, покрытый мягким пористым материалом. Чтобы избежать спрыгивания животного, пол камеры держат под электрическим напряжением 35–40 В, ток – 1 А без учета сопротивления кожи лап животного. При падении животного на пол микрофон регистрирует вокализацию животного в слышимом диапазоне. По количеству записанных эпизодов определяют число падений с вала.

Для крыс стандартная величина скорости вращения, при котором животное не удерживается на валу, обычно, несколько превышает два оборота в секунду. Чем выше скорость вращения вала, при котором животное способно удерживаться 20–30 секунд на вращающемся валу, тем выше его координированность и чувство равновесия.

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

Увеличение времени выполнения теста более чем на 10% 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, 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 здоровых животных на вращающемся горизонтальном валу представлена на рис. 5.

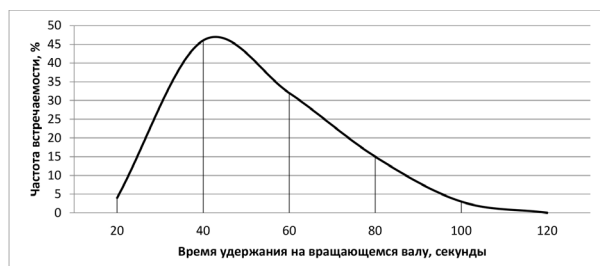


Рис. 5. Частотная кривая распределения значений времени удержания здоровых животных на вращающемся горизонтальном валу при фиксированной скорости вращения 1,5 об/мин

Fig. 5. Frequency distribution curve of the retention time of healthy animals on horizontal shaft rotating at constant rotational velocity of 1.5 rpm

Анализ статистических характеристик распределения в контрольной группе животных показал, что время удержания животных в тесте Ротарод имеет характер распределения, близкий к нормальному. 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 адаптогенный препарат должен не только повышать среднegrupповые значения показателя теста Ротарод по сравнению с контролем, но и вызывать перераспределение в сторону группы с высокой выносливостью.

ГРУППА В. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МЕТОДИКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

В1. Повышение активности ферментов антиоксидантной защиты

Действие адаптогенов может быть связано [19] с:

- активацией антирадикальной цепи (глутатион – аскорбат – токоферол);
- индукцией синтеза и повышением активности пероксидаз (глутатион-пероксидазы, НАДФ-пероксидазы);
- присутствием в составе адаптогенов таких экзогенных доноров водорода, как биофлавоноиды;
- присутствием в составе субстратов дегидрогеназ, продуцирующих НАДФН (фосфоглюконат, сорбит, яблочная и глутаминовая кислоты).

Поэтому для оценки адаптогенной активности биологически активных соединений, в качестве вспомогательного критерия может использоваться изучение показателей антиоксидантной защиты тканей. С этой целью в гомогенате тканей (мозг, печень) или гемолизате эритроцитов могут определяться небелковые тиоловые группы, активность каталазы и супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы.

Концентрацию небелковых тиоловых групп в гомогенате ткани мозга и гемолизате эритроцитов определяют с использованием 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты по методике G.L. Ellman (1959) с применением раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения белка в пробах [20]. К 0,6 мл гемолизата эритроцитов (1:9 объемов дистиллированной воды) или гомогената ткани мозга (100,0 мг/мл) добавляют 0,2 мл 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Пробы перемешивают и центрифугируют в течении десяти минут при 3000 об/мин, супернатант переносят в пробирки, содержащие трис-буфер с ЭДТА, к полученной смеси добавляют раствор ДТНБ. Измерение оптической плотности осуществляют при длине волны $\lambda=412$ нм. Расчет производится с помощью калибровочной кривой, для построения которой используют раствор восстановленного глутатиона с концентрациями от 0,02 до 2,0 мМ.

Определение активности каталазы в гемолизате эритроцитов производят методом, основанным на определении убыли перекиси водорода в инкубацион-

ной среде [21]. Гемолизат эритроцитов изготавливают на 0,05 М буфертрис-НСI (рН 7,4) в соотношении 1:9. Снижение оптической плотности в результате расщепления перекиси водорода в опытной пробе измеряют против контроля с интервалом 30 с в течение трех минут при комнатной температуре при длине волны $\lambda=230$ нм. При расчете активности используют средние значения измерения оптической плотности за каждую минуту в течение трех минут. Об активности каталазы в гемолизате эритроцитов судят по убыли перекиси водорода за минуту и выражают в международных единицах — моль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин} \times 10^{-4}$ и относят к одному грамму гемоглобина.

Определение активности супероксиддисмутазы осуществляют методом, принцип которого заключается в способности СОД тормозить реакцию самоокисления кверцетина, с образованием супероксидных анион-радикалов, подвергающихся дисмутации СОД [22]. Для этого к 1,0 мл разведения гомогената ткани или гемолизата эритроцитов добавляют 0,4 мл смеси этанола-хлороформа и 300 мг сухого KH_2PO_4 . Перемешивают стеклянной палочкой на льду 15 мин, центрифугируют при 6000 об/мин 20 минут. Для анализа используют надосадочную жидкость. Измерение проводят в кюветах спектрофотометра с длиной оптического пути 1,0 см при 25 °С. Через 20 мин измеряли падение оптической плотности раствора. Процент ингибирования реакции самоокисления кверцетина под действием фермента определяют по отношению к аналогичному снижению в контроле. Удельную активность СОД выражают в условных единицах, отнесенных к 1,0 г белка супернатанта, учитывая разведение биологического материала.

Определение активности глутатионпероксидазы основано на способности фермента катализировать расщепление гидроперекиси третинола, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион [23]. С помощью реагента Элмана, т.е. 5,5-дитиобис (2-нитробензойной кислоты), определяют концентрацию оставшегося после реакции глутатиона. После пяти минут инкубации на водяной бане при температуре 37 °С реакцию останавливают 20% раствором ТХУ, внося по 0,1 мл в каждую пробу, и немедленно охлаждают во льду. Затем центрифугируют в течение 10 мин при 4000 g. Спектрофотометрически определяют содержание соединения с максимумом поглощения при длине волны 412 нм.

Расчет активности осуществляют по формуле:

$$A = (E_k - E_{op}/K \times E_{ст}) \times N,$$

где N — фактор конечного разведения;

E — экстинкция проб;

K — коэффициент молярной экстинкции $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Активность фермента выражают в мк молях GSH за одну минуту, и ее относят к 1,0 г гемоглобина или к 1,0 мг белка.

Определение активности фермента глутатион-S-трансферазы основано на оценке скорости ферментативного образования конъюгата восстановленного глутатиона с электрофильным субстратом — 1-хлор-2,4-динитробензолом.

Гемолизат эритроцитов получают разведением взвеси эритроцитов дистиллированной водой в соотношении 1:19. Для определения активности фермента в ткани головного мозга гомогенат 100 мг/мл разводят в 17,5 раза. В состав реакционной смеси входит 0,05 мл ге-

молизата или 0,1 мл разведения гомогената, 0,12 мл глутатиона 1 мМ, и 0,05 мл 2,4-ДХБ 1 мМ и 0,1 М К-фосфатный буфер рН 6,5 до общего объема 3,02 мл. Реакцию запускают добавлением 1-хлор-2,4-динитробензола. В контрольную пробу вместо гемолизата или гомогената вносят воду. Измерение оптической плотности проводят каждую минуту в течение пяти минут при длине волны $\lambda=340$ нм против воды. Расчет производят с учетом коэффициента молярной экстинкции образующегося продукта $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, степени разведения, времени инкубации. Результаты выражают в мк моль/мин $\times$ г гемоглобина (или г белка) [20].

Определение общего белка в гомогенатах ткани коры головного мозга и лизате эритроцитов проводят методом, основанным на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот и цистеина с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи [24]. Фотометрирование осуществляют при длине волны $\lambda=750$ нм против контрольной пробы на реактивы в кювете десять миллиметров. Расчет содержания белка в миллиграммах, отнесенного к навеске или эритроцитарной взвеси, производят по калибровочному графику с учетом разведения. Калибровочный график строится в пределах концентраций от 25 до 250 мкг стандартного белка. В качестве стандартного образца белка используют бычий сывороточный альбумин.

Определение содержания гемоглобина в лизате эритроцитов проводят цианидным методом, основанным на способности ферроцианида калия и цианида трансформировать гемоглобин в цианометгемоглобин, определяемый фотометрически при длине волны $\lambda=520-560$ нм [25]. Концентрацию гемоглобина рассчитывают в граммах на миллилитр.

Выявляемое в ходе исследования повышение активности антиоксидантных ферментов в группе с кратковременным курсовым введением исследуемого соединения подтверждает наличие у него адаптогенного действия.

В2. Определение уровня экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α

Наиболее типичным и важнейшим стабилизационным механизмом геномного ответа на гипоксическое воздействие является экспрессия транскрипционного гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α , вовлеченного в регуляцию гликолиза, окислительного фосфорилирования, гематопоеза, ангиогенеза и ряда других адаптационных механизмов.

Наиболее чувствительными к гипоксическому воздействию тканями по динамике HIF-1 α являются мозг и печень.

Из биологического материала (цельная кровь или образцы тканей животных) выделяют тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля согласно протоколу производителя к комплексу реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала (например, «АмплиПрайм РИБО-сорб»). Синтез первой цепи к ДНК проводят согласно указаниям инструкции комплекта реагентов для получения к ДНК на матрице РНК (например, «РЕВЕРТА-Л»).

Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии гена HIF-1 α крыс, проводят методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) с помо-

Праймеры и зонды для определения уровня экспрессии гена HIF-1α крыс методом Real-Time PCR [17]

Primers and probes for determining the expressi

Табл. 6.

Table 6.

Исследуемая мишень	Олигонуклеотидные праймеры и зонды
Ген HIF-1α	HIF_1a_F: 5-ACTCATCATGACATGTTTACTAAAGGAC-3 HIF_1a_R: 5-TGTCAAACGGAAGATGGCAG-3Z HIF_1a: 5-ROX-TCACCACAGGACAGTACAGGATGCTTGC-BHQ1-3
Ген «домашнего хозяйства» крысы TSPO	TSPO_F: 5-AGGCTGTGGATCTTTCCAGAAC-3 TSPO_R: 5-GGCTGGGCACCAGAGTGA-3Z TSPO: 5-FAM-CAATCACTATGTCTCAATCCTGGGTACCCG-BHQ1-3

щью детектирующего амплификатора и специфических праймеров и зондов к гену HIF-1α крыс. Праймеры для последовательностей HIF-1α и TSPO (гену «домашнего хозяйства», транспортера субстратов через наружную митохондриальную мембрану) отражены в таблице 6.

Стадию амплификации к ДНК HIF-1α крыс в режиме реального времени проводят в 25 мкл смеси: ПЦР Буфер (×10): 700 mM Трис-НCl, pH 8,6; 250C, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, Taq-полимераза, на детектирующем амплификаторе. Условия проведения амплификации к ДНК HIF-1α с праймерами HIF-1α_F/HIF-1α_R и зонда Z HIF-1α: 95 °C – 15 мин, затем 50 циклов: 95 °C – 30 сек, 65 °C – 50 сек, 72 °C – 30 сек. Количество исследуемых к ДНК (копийных ДНК полученных из РНК путем обратной транскрипции) в образцах рассчитывают путем определения пороговых циклов ПЦР. Нормализация количества изучаемых транскриптов к общему количеству к ДНК в пробе проводилась с помощью отношения HIF-1α/TSPO. Для оценки уровня экспрессии гена HIF-1α в качестве стандарта сравнения использовался ген TSPO, экспрессия которого считается стабильной для животного.

В условиях нормоксии уровень экспрессии гена HIF-1α в крови и почках соответствует базовому уровню экспрессии генов «домашнего хозяйства» лабораторных животных, в сердце идет в 3–5 раз, в печени – в 15–20 раз, а в тканях мозга – в 250–300 раз более интенсивно.

В условиях развития гипоксии [26] повышение уровня экспрессии гена HIF-1α в цельной крови (в 20–40 раз) свидетельствует о наступлении гипоксического состояния, но не позволяет дифференцировать его тяжесть (значения показателя по высотам от 6000 м и выше имеют близкий диапазон). Маркером выраженной гипоксии тканей является двух-трехкратный рост экспрессии этого фактора в печени, а критического уровня гипоксии – в сердце (в 6–7 раз) и почках (в 20–30 раз). В условиях гипоксии экспрессия HIF-1α в тканях мозга снижается, и только при критических ее степенях отмечается повторный рост, не достигающий уровня нормоксической экспрессии HIF-1α.

При адаптации к гипоксии в ранние сроки (первые–третьи сутки) происходит повышение уровня экспрессии HIF-1α в периферических тканях и снижение в тканях мозга. При формировании стадии повышенной устойчивости животных к гипоксическому воздействию (7–10 дней и более) происходит снижение уровня экспрессии к нормоксическому уровню в крови и тканях печени, и повышение в тканях мозга. Выявление подобной динамики соответствует достижению состояния повышенной резистентности организма к гипоксическому воздействию, т.е. формированию состояния адаптированности.

В3. Определение уровня белков теплового шока БТШ70

Количество белка теплового шока в крови или тканях животных определяют иммуноферментным методом с

помощью наборов компании «StressGen» (Канада), BSM Diagnostics (Австрия) или иных производителей.

Институтом цитологии РАН предлагается модификация методики с использованием разработанной ими реагенти-ки [27]. Суть модифицированной методики заключается в том, что на поверхности лунок 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа иммобилизуются комплексы 8-(6-аминогексил)-амино-аденозин-5'-трифосфата, конъюгированного с молекулами яичного альбумина. Лунки промываются буфером, в них вносят исследуемый образец или стандарт, в который добавлена натриевая соль АТФ до концентрации 10 мМ, и содержимое инкубируется. Лунки промываются, в них вносятся поликлональные кроличьи антитела к БТШ70 и производится инкубация. Лунки промываются, в них вносят антитела, взаимодействующие с кроличьими антителами, конъюгированные с ферментом, и содержимое инкубируется. Лунки промываются, в них вносят субстрат фермента и хромоген, содержимое инкубируют и производят спектрофотометрическую оценку развившейся окраски с последующим соотношением ее с данными калибровки.

Определение БТШ может производиться методом иммуноблоттинга (Westernblotting), а также методом проточной цитометрии. Для этого фиксированные параформальдегидом клетки (лейкоциты) обрабатывают первичными моноклональными антителами к изоформам БТШ (конституциональной и индуцибельной) и 0,6% раствором сапони-на, инкубируют 10 мин при комнатной температуре, затем отмывают фосфатно-солевым буфером с 1% бычьим сыворо-точным альбумином. После отмывки клетки повторно инку-бируют при комнатной температуре с вторичными антите-лами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с изомером флюоресцеин-изотиоцианатом 1 с добавлением 0,6% сапони-на. После отмывки проводят измерение флю-оресценции на проточном цитометре типа FACScan. Для определения фоновой флюоресценции (негативный кон-троль) фиксированные в параформальдегиде клетки инку-бируют только с сапонином и вторичными антителами [28].

Группа Г. Методики оценки психоактивирующего дей-ствия адаптогенов

Психоактивирующее действие не связано с адаптоген-ной активностью, но оно является типичным для большин-ства природных препаратов с подобным действием и отра-жает особенности их состава. Как правило, оно проявляется в более высоких дозах и при однократном (или трехднев-ном) введении. Поэтому в таких исследованиях все тестиру-емые препараты, включая эталонные, применяются в двой-ной разовой дозе. Никакие тренирующие (адаптационные) воздействия при этом не предъявляются.

Для оценки психоактивирующего действия, обычно, ис-пользуются скрининговые тесты на физическую работоспо-

способность (бег животных на treadmills, челночное плавание или плавание с грузом до отказа) или тесты оценки спонтанной поведенческой активности (тест открытого поля, «Labogas», системы видеофиксации перемещений животного и др., принятые в организации) [17, 29]. Тестирование осуществляется в периоде исходного этапа исследования на этапе рандомизации, и через час после введения препарата (при трехдневной схеме – через час после последнего введения).

Возможные следовые эффекты для методик этой группы не определяются. Психоактивирующее действие исследуемого вещества оценивается по стандартным для конкретной методики показателям (длительность или скорость при выполнении нагрузочных тестов, локомоторная или поисково-исследовательская активность) в сопоставлении с результатами в контрольной группе и группе с введением эталонного адаптогена.

Группа Д. Методы оценки отсроченного влияния адаптогенов

К данной группе свойств относят антимуtagenное, антиканцерогенное, антивозрастное и иммуностимулирующее действие, описанное для длительного применения адаптогенов.

Методический аппарат этих исследований соответствует рекомендациям по проведению соответствующих доклинических исследований [30, 31] и не имеет каких-либо специфических особенностей, связанных с возможным адаптогенным действием изучаемых соединений.

Как правило, подобные исследования проводятся на этапе дополнительного доклинического изучения и не имеют отношения к соотношению тестируемого вещества с критериями принадлежности к фармакологической группе адаптогенов. Тем не менее, поскольку данные свойства присущи многим известным адаптогенным препаратам, для исследователей может представлять интерес определение для потенциально перспективного препарата и этих свойств.

Интегральная оценка адаптогенной активности

Интегральная оценка адаптогенной активности при изучении свойств биологически активного соединения по нескольким методикам, относящимся к разным группам эффектов, определяется как сумма произведений индексов адаптогенной активности препарата (в эталонных единицах) для соответствующей группы эффектов на весовые коэффициенты значимости группы (табл. 7). Получение весовых коэффициентов осуществлялось методом экспертного шкалирования с привлечением пяти специалистов в области исследования адаптации из различных организаций (СПбГХФУ, ВМедА, ГосНИИИ ВМ). Экспертные оценки имели коэффициент конкордации, равный 0,83, что позволяет использовать их в качестве адекватных изучаемым процессам.

Табл. 7.

Весовые коэффициенты значимости группы эффектов в оценке адаптогенного действия

Table 7.

Weight ratio of the significance of the group of effects in the assessment of adaptogenic activity

Группа эффектов	А	Б	В	Г	Д
Весовой коэффициент группы	10	7	5	3	1

Полученная суммарная балльная оценка, как интегрирующая по широкому кругу методик, может быть использована для сравнительной оценки адаптогенной активности разных соединений, изучаемых в разных исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Качество научных исследований во многом определяется той методологией, которую применяет исследователь. Чем сложнее исследуемая проблема, тем выше значимость методологической и методической корректности выполняемых работ.

К числу таких сложных научных проблем, вне всякого сомнения, относится адаптация. Выполненный нами анализ литературы по результатам изучения адаптации как процесса приспособления организма к меняющимся условиям среды, как результата этого процесса, и адаптируемости как свойства организма, показал необходимость определенной структуризации и стандартизации используемых различными авторами методических подходов. Обязательным элементом такой стандартизации является использование эталонного препарата с доказанной адаптогенной активностью в стандартной дозе и при стандартном пути введения.

Для верификации адаптогенного действия обязательным является оценка способности тестируемого соединения повышать скорость образования, выраженность и стойкость развивающегося состояния повышенной резистентности (адаптации) к специфическому воздействию. В биомедицинских исследованиях для этого могут быть использованы методики импульсно-прерывистой экспресс-адаптации к гипоксии или гипертермии, а также методики физической тренировки для повышения физической выносливости. Количественной характеристикой адаптогенной активности является отношение прироста переносимости неблагоприятного воздействия в ходе адаптации при применении соединения к аналогичному приросту, полученному при введении эталонного адаптогена. Адаптогенное действие также должно проявляться в повышении доли высокоустойчивых к данному воздействию объектов (людей или лабораторных животных), выявляемой по сдвигу частотных кривых распределения значений ключевых показателей устойчивости (высотный порог, время выполнения нагрузки, время жизни и др.).

Другие методики исследования, характеризующие репаративно-регенераторную активность, не связанные с адаптацией повышения неспецифической резистентности, антиоксидантная активность, психостимулирующее, антимуtagenное и антиканцерогенное действие не являются обязательными и используются для расширенной характеристики активности исследуемого вещества. При их использовании может быть получена интегральная оценка адаптогенной активности с учетом экспертных весовых коэффициентов значимости отдельных групп методик.

Таким образом, представленные материалы позволяют исследователям, работающим в сфере изыскания новых фармакологических средств с адаптогенным действием, обеспечить сопоставимость результатов, что делает такие исследования соответствующими современным требованиям доминирующей в медицине парадигмы доказательной медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каркищенко, В.Н. Фармакологические основы терапии: Тезаурус / В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов. – Москва, Санкт-Петербург: Айсинг, 2018. – 288 с.
2. Panossian AG, Efferth T, Shikov AN, et al. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress- and aging-related diseases. *Med. Res. Rev.* 2021; 41: 630–703. DOI: 10.1002/med.21743.
3. Виноградов, В.М. Фармакология адаптивных процессов: Акт. речь / В.М. Виноградов. – Ленинград: ВМА, 1984. – 28 с.
4. Panossian A, Wikman G. Evidence-based efficacy of adaptogens in fatigue, and molecular mechanisms related to their stress-protective activity. *Curr Clin Pharmacol.* 2009; 4 (3): 198–219. DOI: 10.2174/157488409789375311.
5. Panossian A, Wagner H. Stimulating effect of adaptogens: an overview with particular reference to their efficacy following single dose administration. *Phytother Res.* 2005; 19 (10): 819–38. DOI: 10.1002/ptr.1751.
6. Saito H, Yoshida Y, Takagi K. Effect of Panax Ginseng root on exhaustive exercise in mice. *Jpn J Pharmacol.* 1974; 24:119–27.
7. Каркищенко, Н.Н. Очерки спортивной фармакологии. Том 3. Векторы фармакорегулирования / Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба, В.Н. Каркищенко [и др.] – Москва, Санкт-Петербург: Айсинг, 2014. – 356 с.
8. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003; 36 (12): 1751–9.
9. Радько, С.В. Модель оценки влияния фармакологических средств на динамику адаптации к физической нагрузке / С.В. Радько, С.В. Оковитый, А.Н. Куликов [и др.] // Биомедицина. – 2016. – № 3. – С. 32–45.
10. Радько, С.В. Модель силовых нагрузок у мышей / С.В. Радько, С.В. Оковитый, М.В. Краснова // Биомедицина. – 2017. – № 1. – С. 24–27.
11. Гайворонская, В.В. Влияние бемитила, этонергола и яктона на процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии / В.В. Гайворонская, С.В. Оковитый, И.Ю. Колышев [и др.] // Биомедицина. – 2013. – № 1. – С. 16–21.
12. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник / под редакцией В.Г. Макарова, М.Н. Макаровой. Санкт-Петербург: ЛЕМА, 2016. – 116 с.
13. Verly WC. The control of liver growth. New York: Chalmers; 1976.
14. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th edition. Sydney, Australia: Academic Press; 2013: 12.
15. Силачев, Д.Н. Изучение новых нейропротекторов на модели фокальной ишемии головного мозга: специальность 03.00.13 – физиология: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Денис Николаевич Силачев; ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». – Москва, 2009. – 24 с.
16. Сысоев, Ю.И. Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы / Ю.И.Сысоев, С.В. Оковитый, Б. Узуебунам // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 95–105.
17. Каркищенко, Н.Н. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность: методические рекомендации / Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов [и др.] – Москва: ФМБА России, 2017. – 97 с.
18. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1957; 46 (3): 208–9. DOI: 10.1002/jps.3030460322.
19. Воскресенский, О.М. О связях адаптогенного и антиоксидантного действия / О.М. Воскресенский // Адаптация и адаптогены. – 1977. – С. 91–96.
20. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / под редакцией А.И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 1999. – Т. 2. – С. 72–73.
21. Leff JA, Oppengard MA, Curiel TJ, et al. Progressive increases in serum catalase activity in advancing human immunodeficiency virus infection. *Free Radic. Biol. Medicine.* 1992; 13 (2): 143–9. DOI: 10.1016/0891-5849(92)90076-s.
22. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36. – № 2. – С. 88–91.
23. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – Санкт-Петербург: ИКФ «Фолиант», 2000. – 102 с.
24. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1): 265–75.
25. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / под редакцией Н.У. Тица; перевод с английского В.В. Меньшикова; главный редактор В.В. Меньшиков. – Москва: Лабинформ, 1997. – С. 128–129.
26. Шустов, Е.Б. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1α как критерий развития гипоксии

тканей / Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, М.С. Дуля [и др.] // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 4–15.

27. Патент №2242764 Российская Федерация, МПК G01N33/53 (2006.01). Способ определения концентрации основного белка теплового шока 70 к Да: № 2003124736/15: заявл. 07.08.2003: опубл. 20.12.2004 / Новоселов, С.С., Суржилов С.А., Воронин А.П., Гужакова И.В., Маргулис Б.А.; патентообладатель Институт цитологии Российской академии наук (статус государственного учреждения) (RU) / – 7 с.

28. Андреева, Л.Н. Белки стресса (белки теплового шока). Методические подходы к изучению и применению: методические рекомендации / Л.Н. Андреева, А.А. Бойкова, П.Д. Шабанов // Санкт-Петербург: ВМедА, 2002. – 24 с.

29. Оковитый, С.В. Работоспособность. Утомление. Коррекция / С.В. Оковитый, Е.Б. Шустов, В.Ц. Болотова. – Москва: Кнорус, 2019. – 330 с.

30. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под редакцией А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.

31. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть вторая / под редакцией А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – 536 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Евгений Борисович Шустов, д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, главный научный сотрудник Научно-клинического центра токсикологии им. академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства России, лауреат Государственной премии РФ в области науки и техники, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: shustov-msk@mail.ru

Сергей Владимирович Оковитый, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Болотова Вера Цезаревна, канд. фармацевт. наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: vera.bolotova@pharminnotech.com

Алексей Евгеньевич Ким, канд. мед. наук, преподаватель кафедры патологической физиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: alexpann@mail.ru

ADDITIONAL INFORMATION ABOUT AUTHORS

Evgeny B. Shustov, Doctor of Medicine (MD), Professor, Chief Scientist of the S.N. Golikov Toxicology Research Center of the Federal Medical-Biological Agency, Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Laureate of the State Prize of the Russian Federation in Science and Engineering, Saint Petersburg, Russia; e-mail: shustov-msk@mail.ru.

Sergey V. Okovityi, Doctor of Medicine (MD), Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia; e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Vera Ts. Bolotova, Ph.D. in Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia; e-mail: vera.bolotova@pharminnotech.com

Alexey E. Kim, Ph.D. in Medicine, Lecturer of the Department of Pathological Physiology, S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia; e-mail: alexpann@mail.ru

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Battery of tests for studying the adaptogenic effects of biologically active substances in preclinical trials

©2021. E.B. Shustov^{1, 2*}, S.V. Okovity¹, V.Ts. Bolotova¹, A.E. Kim³

¹ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

² S.N. Golikov Scientific and Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical-Biological Agency of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

³ S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

* e-mail: shustov-msk@mail.ru

Received April 20, 2021;

Revised May 26, 2021;

Accepted June 16, 2021

Based on the materials of the article, the authors offer researchers of the problems of adaptation and the study of specific adaptogenic activity standardized approaches to biomedical (preclinical) research of new biologically active substances, ensuring their comparability. The analysis of modern views on adaptation processes, as an increase in nonspecific resistance to adaptive effects, and the properties of known adaptogens is carried out. It has been shown that adaptogenic action can be realized through the involvement of several regulatory pathways, such as changes in the activity of neurons and endocrine response in response to adverse effects, interaction with cell receptors and modulation of their sensitivity to endogenous regulators, changes in the composition of cell membranes, structure of the cytoskeleton, activities of enzyme complexes, epigenomic regulation, antioxidant and antiradical activity. A grouping of methods for the experimental study of adaptogens is proposed on the basis of their compliance with the definition of this pharmacological class and the requirements of evidence-based medicine. The groups of methods aimed at increasing the rate and stability of the formation of a state of increased resistance to adverse influences, reparative-restorative processes, nonspecific resistance, psychoactivating and neuroplastic effects, antimutagenic and anticarcinogenic effects were identified. Specific schemes of adaptive influences and criteria for assessing adaptogenic activity are proposed on the basis of comparing the results obtained with the effects of «reference» adaptogens. The technology of the integrated assessment of the results of the methods, which are different in their informational significance, has been substantiated.

KEYWORDS: adaptation; adaptogens; heat shock proteins; hyperthermia; hypoxia; hypoxia-inducible factor; integral assessment; antioxidant defense enzymes; physical activity; extreme effects