

На правах рукописи

Пьявченко Геннадий Александрович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОРЫ И СТРИАТУМА МОЗГА
КРЫС В НОРМЕ И ПРИ НАКОЖНОМ НАНЕСЕНИИ АНТИСЕПТИКА-
СТИМУЛЯТОРА ДОРОГОВА 3 ФРАКЦИИ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология
(медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и в акционерном обществе фармацевтическом научно-производственном предприятии «Ретиноиды».

Научный руководитель:

член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор **Кузнецов Сергей Львович**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Ноздрин Владимир Иванович**

Официальные оппоненты:

Румянцева Татьяна Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра анатомия человека, заведующий кафедрой;

Павлов Артем Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, кафедра анатомии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Защита состоится «_____» _____ 2020 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.040.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по адресу: 119435, г. Москва, ул. Россолимо 15/13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Изучение морфологических особенностей структур мозга, принимающих участие в регуляции поведения у лабораторных крыс с учётом их возраста и пола, представляется важным, поскольку эти животные часто используются в доклинических исследованиях лекарственных препаратов. Одновременно с этим для лечения аллергических заболеваний кожи является актуальной разработка негормональных лекарственных средств, обладающих меньшим побочным системным действием, малой токсичностью и отсутствием привыкания. Согласно Машковскому М. Д. (1993), антисептик-стимулятор Дорогова показан в виде мазей и паст в лечении экземы и нейродермита. По имеющимся данным [Белоусова Т. А. и соавт., 2014], цинковая паста с 5% АСД 3 фракции обладает дерматотропными свойствами и может применяться в лечении аллергодерматозов. По данным литературы [Леонов Н. И., 1951], АСД оказывает дозозависимое воздействие на нервную систему, что требует более детального изучения этого эффекта в действии препарата на структуры головного мозга. Накожное нанесение концентрированной субстанции АСД 3 фракции вызывает раздражение, а само вещество обладает специфическим запахом, в то время как данные об исследовании местнораздражающих и алергизирующих свойств пасты, содержащей 5% АСД 3 фракции, отсутствуют. Это не позволяет говорить о возможных механизмах действия веществ в его составе, на структуры головного мозга, ответственные за регуляцию поведенческой активности у лабораторных крыс. Из этого следует, что выявление активации нейронов головного мозга при накожном нанесении пасты с АСД 3 фракции является актуальной задачей для исследования, а изучение местной тканевой реакции позволит сделать вывод о возможности наличия неприятных ощущений при его применении.

Степень разработанности темы

В последние десятилетия изучаются морфофункциональные корреляты взаимодействий структур мозга при реализации поведенческой активности животных. Исследована особенность активации нейронов мозга при участии раздражителей различного характера [Díaz-Morán S. et al., 2014], изучены особенности ультразвуковых и двигательных поведенческих реакций у лабораторных животных [Акопян В. Б., Ершов Ю. А., 2005; Жучков С. А. и соавт., 2009]. Работы по изучению возрастных, половых и суточных особенностей поведения, а также данные по динамике популяций нейронов в участках мозга, ответственных за реализацию изучаемых признаков, в литературе практически не представлены, в то время как роль межнейронных и межструктурных взаимодействий мозга в реализации поведения животного и ответ на раздражители важны для оценки свойств лекарственных средств.

Антисептик-стимулятор Дорогова 3 фракции был получен более полувека назад, однако до настоящего времени сведения об эффекте препарата на структуру и функции органов и систем организма остаются в рамках данных 70-х годов прошлого столетия [Дерябина З. И., Николаев А. В., 1968], а выходящие в последующем работы [Некрасова И. И. и соавт., 2011; Ховайло Е. В., 2015] затрагивают лишь клинический эффект применения препарата при различных заболеваниях у животных. Так, описанный авторами эффект его действия на центральную нервную систему не рассматривался с точки зрения взаимосвязи между активацией структур мозга и изменением поведения животных, что является важным для понимания фундаментальных механизмов реализации поведения.

Таким образом, изучение возрастных, половых и суточных аспектов поведения, а также морфологических изменений активации структур мозга, ответственных за регуляцию этих актов в норме и при воздействии АСД 3 фракции, является одной из важных задач, поскольку нейротропный эффект АСД описан в литературе, но не подтверждён.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение морфофункциональных изменений в структурах мозга крыс в норме с учётом возраста и пола, а также при накожном нанесении фармацевтической комбинации с 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции.

Задачи исследования:

1. Оценить количество нейронов в моторной коре и стриатуме головного мозга молодых, взрослых и старых крыс обоего пола на гистологических препаратах, окрашенных крезильным фиолетовым по методу Ниссля.

2. Изучить ультразвуковую и двигательную активность лабораторных крыс с учётом возраста, пола и времени суток.

3. Провести оценку корреляционной зависимости между количеством нейронов, окрашенных крезильным фиолетовым по методу Ниссля, и поведенческими реакциями у крыс.

4. Изучить морфологические изменения в структурах головного мозга при применении антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции собственным методом комбинированной окраски.

5. Оценить уровень корреляции между активацией нейронов коры и стриатума головного мозга и изменением поведенческой активности животных, получавших накожно антисептик-стимулятор Дорогова 3 фракции.

6. Определить возможность влияния доз антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции на морфофункциональные характеристики поведения животных, изучить (исключить) наличие местнораздражающего и аллергизирующего действия.

Научная новизна

Впервые исследована динамика количества нейронов в участках мозга, принимающих участие в регуляции двигательной активности, а также особенностей поведения лабораторных крыс в возрастном и половом аспекте. Показано наличие корреляционной связи для каждой из изучаемых групп: молодые, взрослые и старые животные обоего пола.

Разработан оригинальный способ совместной окраски срезов головного мозга крысы серебрением и крезильным фиолетовым, подтверждённый патентом РФ № 2666256 от 06.09.2018 г.

Впервые изучена активация структур головного мозга, ответственных за механизмы реализации поведения у крыс, а также изменения их двигательной и УЗВ активности в условиях накожного нанесения 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции.

Впервые показано отсутствие местнораздражающего и аллергизирующего эффекта при накожном нанесении фармацевтической комбинации, содержащей 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящего исследования дополняют немногочисленные данные о возрастной, половой и суточной динамике морфофункциональных взаимодействий в реализации поведенческих актов у крыс. Разработан способ одновременного выявления нейронов и астроцитов на гистологических препаратах нервной ткани. Эти сведения могут быть использованы в практике преподавания курсов «Гистология, эмбриология, цитология», «Фармакология» и «Нормальная физиология». Представленные в работе методы могут быть использованы при оценке нейротропного действия лекарственных препаратов.

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования строилась на анализе корреляции степени активации нейронов определённых структур головного мозга и поведенческой активности животных. Оценку поведенческих реакций проводили на системах Sonotrack и Laboras (Metris, Нидерланды), количество клеток в зонах двигательной активности определяли в препаратах после окраски срезов мозга по методу Ниссля, а также совмещением методов Ниссля и Гольджи по запатентованной методике, оценку степени активации нейронов в структурах мозга – по экспрессии белка c-Fos. Подсчёт и измерение размеров нейронов проводили на изображениях, полученных в программе Axiovision, при помощи камеры AxioCam на световом микроскопе Axioscop 2. Статистический подсчёт включал в себя определение средних показателей изучаемых величин, их ошибки, медианы, межквартильного размаха, различия между показателями методами параметрического и непараметрического анализа, взаимозависимость

изучаемых признаков методами корреляционной статистики, построение графиков линейных и полиномиальных моделей, с размещением линий тренда и учётом коэффициента детерминации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наибольшую УЗВ и двигательную активность, а также количество нейронов в участках мозга, ответственных за поведение, демонстрируют молодые особи женского пола в тёмное время суток. Изучаемые гистофизиологические параметры характеризуются высокой степенью корреляционной зависимости между собой во всех возрастных и половых группах.

2. Собственным комбинированным методом окраски нервной ткани показано увеличение синтетической активности нейронов (по площади хромотофильной субстанции) в группе животных, получавших фармацевтическую комбинацию с антисептиком-стимулятором Дорогова 3 фракции.

3. При всех рассматриваемых дозах кожное нанесение фармацевтической комбинации с 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции сопровождается активацией нейронов изучаемых структур головного мозга и возрастанием поведенческой активности животных.

4. Применение фармацевтической комбинации в дозе 4 г/кг/сут сопровождается обратимыми проявлениями местнораздражающего действия, в то время как доза 0,5 г/кг/сут не продемонстрировала признаков местного раздражения, но также вызвала изменения в морфофункциональных характеристиках поведения животных. Наличие алергизирующего действия у фармацевтической комбинации не обнаружено.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования, отражающие половую и возрастную динамику содержания нейронов в зонах поведенческой активности, включены в образовательный и научно-исследовательский процесс учебных и научных подразделений ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет) и ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» при чтении лекций, проведении практических и семинарских занятий, подготовке учебно-методических материалов по специальностям «Лечебное дело» и «Педиатрия».

Данные о воздействии АСД 3 фракции на нервную систему, а также результаты исследования местнораздражающего и алергизирующего действия вошли в регистрационное досье на препарат ПАСДэн® (АО «Ретиноиды», Москва).

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов определяется стандартизацией условий содержания лабораторных грызунов, достаточным количеством экспериментальных животных, рандомизацией с учётом веса, формированием групп сравнения и контроля, адекватными

морфологическими и физиологическими методами исследования, корректными методами статистического анализа данных.

Апробация результатов диссертационной работы проводилась на расширенном совместном заседании кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет) и научного отдела АО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», протокол №01 от 29.08.2019 г. Результаты диссертационного исследования обсуждались на 12-ти научных конгрессах, конференциях, совещаниях и заседаниях: научное совещание «Учение о тканях. Гистогенез и регенерация» (2015 г., г. Санкт-Петербург, Россия), IX Всероссийская и X Международная научные конференции «Бабухинские чтения в Орле» (2015, 2017 гг., г. Орёл, Россия), V и VI International Symposium «Interaction of Nervous and Immune Systems in Health and Disease» (2015, 2017 гг., г. Санкт-Петербург, Россия), XXII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (2016 г., г. Санкт-Петербург, Россия), XIII конгресс Международной ассоциации морфологов (2016 г., г. Петрозаводск, Россия), IX Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (2017 г., г. Москва, Россия), 24th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference “Stress and Behavior” (2017, г. Санкт-Петербург, Россия), 47th Society for Neuroscience Annual Meeting (2017, г. Вашингтон, США), Международная научно-практическая конференция «Трансляционная медицина» (2017 г., г. Орёл, Россия), 11th Federation of European Neurosciences Societies Forum of Neuroscience (2018, г. Берлин, Германия).

Личный вклад автора

Идея и концепция настоящего исследования принадлежит Г.А. Пьявченко. Автором спланированы все эксперименты, выполнено взятие материала, его окраска и морфометрический анализ с использованием моноклональных антител к белку c-Fos, окраски по методу Ниссля, запатентованной комбинированной методики, исследование поведенческих реакций на приборах Sonotrack и Laboras. Проведена статистическая обработка материала. Написаны все статьи, материалы и тезисы по теме диссертации, а также рукописи диссертации и автореферата.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Работа выполнена в соответствии с паспортом специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 5 и 7.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационного исследования опубликована 21 научная работа, из них 5 оригинальных статей – в центральных рецензируемых изданиях и журналах,

рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, из которых 3 статьи в изданиях, индексируемых международными системами цитирования Scopus и Web of Science. Также автором получен 1 патент на изобретение РФ.

Структура и объём диссертации

Диссертация написана на 112 страницах, содержит главы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов, библиографический список. Работа проиллюстрирована 30 рисунками и 13 таблицами. Список литературы включает в себя 144 источника, из них 78 источников на русском языке и 66 – на английском.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Сведения об исследуемой фармацевтической комбинации. Цинковая паста с 5% антисептика-стимулятора Дорогова для наружного применения: однородная паста светло-коричневого цвета с розоватым оттенком и характерным запахом. Состоит из активного вещества антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции (5%), а также цинка оксида (20%), крахмала картофельного (20%), вазелина медицинского (55%). Экспериментальный фармацевтический состав применяли в двух дозах: 0,5 и 4 г/кг/сутки.

Экспериментальные животные

Вид, линия и количество животных. Исследование проводили на 238 крысах обоего пола линии Wistar, 36 крысах-самцах линии Sprague Dawley и 48 беспородных морских свинках-самцах белой масти. Все животные были получены из сертифицированных питомников. Для исследования были выбраны крысы и морские свинки как виды, общепринятые для экспериментальных фармакологических работ [Altun M. et al., 2007; Nosek K. et al., 2008, Whishaw I. Q., Kolb B., 2005]. Для изучения местнораздражающего и аллергизирующего действия предпочтение в выборе тест-системы было отдано беспородным морским свинкам белой масти, поскольку эти животные в сравнении с крысами характеризуются более высокой степенью реактивного ответа на воздействие биологически активных веществ при накожном нанесении.

Содержание животных. Исследование выполняли в соответствии с межгосударственным стандартом «Принципы надлежащей лабораторной практики» [ГОСТ 33044-2014, 2015] согласно утверждённому плану и СОПам ЦДИ АО «Ретиноиды». Манипуляции с животными, а также условия их содержания рассмотрены и утверждены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных АО «Ретиноиды». Животные находились в отдельных помещениях для содержания

лабораторных животных в контролируемых условиях окружающей среды. Рандомизацию в группы осуществляли методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего более чем на 10%. Каждому животному присваивали индивидуальный номер. После нанесения исследуемой фармацевтической комбинации животных рассаживали на 2 часа по индивидуальным клеткам с номером, помечаемым на этикетке.

Проведение исследования

Экспериментальная программа. Исследование возрастной, половой и суточной динамики ультразвуковой и двигательной активности крыс, изученных на валидированных приборах Sonotrack и Laboras отдельно, проводили на 60 (n=10 в группе) крысах линии Wistar, полученных из питомника «Андреевка», филиала ФГБУН «НЦБМТ ФМБА» России (далее – питомника «Андреевка»). Животных обоего пола разделяли на три возрастные группы: двухмесячные (молодые), семимесячные (взрослые) и шестнадцатимесячные (старые). Для оценки количества, частоты и длительности УЗВ осуществляли их запись у крыс на приборе Sonotrack в помещении с шумоизолирующими элементами непрерывно в течение 24 часов, на приборе Laboras проводили регистрацию поведенческих реакций.

Для синхронизации по времени и объединения работы приборов в единый комплекс Laboras-Sonotrack использовали крыс-самцов линии Wistar возрастом 2 месяца. Для проверки совпадения поведенческих актов и анализа активности животных применяли камеру Zavio F7210, оснащённую инфракрасным фильтром ночного видения.

Определение содержания нейронов в моторной коре и стриатуме головного мозга крыс проводили на 36 (n=6 в группе) особях обоего пола линии Wistar. Животных разделяли по группам на молодых, взрослых и старых. Проводили подсчёт количества нейронов и их вертикального размера методами морфометрического анализа.

Выявление взаимосвязи между количеством нейронов в участках коры и стриатума крыс обоего пола и их поведенческой активностью в возрастном аспекте проводили на 72 (n=12 в группе) животных линии Wistar обоего пола.

Оценку связи между активацией нейронов коры и стриатума головного мозга и изменением поведенческой активности животных, получавших АСД в дозе 4 г/кг/сут, а также морфофункциональные изменения структур, ответственных за поведенческую активность головного мозга крыс, в условиях накожного нанесения АСД 3 фракции в дозе 0,5 г/кг/сут проводили на самцах линии Sprague Dawley (n=6 в группе), полученных из питомника «Пушино», филиала ФГБУН «ИБХ» РАН. В каждом эксперименте выделяли по 3 группы: интактные животные (1 группа); получавшие основу (2 группа) и фармацевтическую

комбинацию (3 группа). Представители 2 и 3 группы в течение 1 недели ежедневно получали основу и саму комбинацию на выстриженную межлопаточную область спины.

Оценку местнораздражающего действия проводили на беспородных морских свинках-самцах белой масти, полученных из питомника «Андреевка». В исследовании участвовали 3 группы по 10 животных в каждой (1 – интактные животные, а также получавшие фармацевтическую комбинацию: 2 – в дозе 0,5 г/кг/сут и 3 – в дозе 4 г/кг/сут). Исследуемую комбинацию наносили после выстригания волосяного покрова металлической лопаткой на кожу спины один раз в сутки в течение недели в одно и то же время. Через 2 часа после каждого нанесения проводили визуальную оценку эритемы и толщины кожной складки, по которым судили о наличии отёка. Степень выраженности раздражающего действия на кожу оценивали по методике, описанной Алексеевой О. Г. и Дугевой Л. А. (1978). Половину животных умерщвляли в CO₂-камере на 1-е сутки после прекращения нанесения, а другую половину – на 14-е сутки. Участки кожи из места нанесения и зоны контроля фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы толщиной 5 микрон окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение влияния многократных накожных аппликаций фармацевтической комбинации, содержащей 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции при экспериментальном аллергическом контактном дерматите, вызванном ДНХБ (Sigma-Aldrich, США) проводили на беспородных морских свинках-самцах белой масти. В исследовании участвовали 3 группы по 6 животных в каждой. Животным всех групп индуцировали развитие аллергического контактного дерматита 1% раствором ДНХБ в смеси ацетона и оливкового масла (4:1) в дозировке 75 мкл ежедневно в течение 1 недели на левый боковой участок депилированной кожи туловища, на 10-й день от начала сенсibilизации наносили разрешающую дозу аллергена – 0,5% раствор ДНХБ в той же смеси в дозировке 25 мкл на правый боковой участок депилированной кожи туловища. Животные 1 группы в восстановительном периоде (1 неделя) не получали лечения, в то время как свинки 2 и 3 группы ежедневно получали основу и комбинацию соответственно в дозе 0,5 г/кг/сут на участок кожи с развившимся аллергическим дерматитом. Животных умерщвляли на 1-е сутки прекращения нанесения. Участки кожи из места развития аллергического дерматита фиксировали в формалине, срезы толщиной 5 микрон окрашивали гематоксилином и эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание нейронов в моторной коре и стриатуме головного мозга

крыс разного возраста и пола

У молодых крыс-самцов количество нейронов в поле зрения светового микроскопа V пластинки моторной коры является наименьшим, количество нейронов у самок в 1,5 раза

выше. У взрослых животных обоего пола содержание пирамидных нейронов является наиболее высоким. У старых животных содержание клеток вновь понижается и приближается к значениям, полученным для молодых крыс. У самок этот процесс выражен в большей степени. Принципиально те же количественные изменения наблюдаются в стриатуме, что относится как к самкам, так и к самцам. Однако у взрослых и старых самок нейронов меньше. Количество нейронов в моторной коре достигает наибольшего числа у взрослых животных обоего пола. В стриатуме эти изменения разнонаправленны и не столь закономерны. Размеры нейронов исследуемых зон остаются неизменными для любого пола и возраста (таблица 1).

Таблица 1. Количество и размеры нейронов моторной коры и стриатума крыс обоего пола в молодом, взрослом и старом возрасте, Ме (25L; 75U), n=36 (p ≤ 0,05)

Группы	Моторная кора		Стриатум	
	Количество	Размер (µm)	Количество	Размер (µm)
Молодые самцы	46 (43; 49)	10 (8; 11)	43 (41; 45)	9 (9; 10)
Молодые самки	68 (64; 73)*	12 (9; 14)	62 (59; 64)*	9 (8; 11)
Взрослые самцы	81 (77; 87)	8 (7; 9)	61 (58; 65) [#]	9 (8; 12)
Взрослые самки	77 (72; 88)	11 (9; 13)	53 (50; 56) ^{*#}	9 (8; 11)
Старые самцы	53 (50; 56) ^{#°}	10 (8; 12)	52 (51; 53) ^{#°}	10 (9; 11)
Старые самки	44 (41; 47) ^{*#°}	10 (8; 12)	42 (41; 44) ^{*#°}	11 (10; 11)

* – статистическая значимость различий между самками разного возраста и самцами того же возраста;

[#] – статистическая значимость различий между взрослыми, старыми крысами соответствующего пола и молодыми животными;

[°] – статистическая значимость различий между старыми крысами соответствующего пола и взрослыми животными.

Таким образом, количество нейронов в моторной коре и в стриатуме с возрастом меняется. Максимальное их количество выявляется у взрослых животных обоего пола. Количество нейронов у молодых самок было больше, чем у самцов, сравниваясь в значениях у взрослых особей и понижаясь в процессе старения. Сходные результаты получены при анализе содержания нейронов стриатума, где исследуемый показатель был более выражен у взрослых самцов.

Возрастная, половая и суточная динамика ультразвуковой и двигательной активности крыс, изученная на приборах Sonotrack и Laboras

Результаты измерений свидетельствуют о том, что животные любого возраста в тёмное время издадут больше ультразвуков, чем в светлое время. Частота УЗВ и их длительность мало зависят от времени суток. Количество УЗВ, издаваемых самками, во всех случаях больше такового у самцов. Частота УЗВ в кГц у крыс любого пола меняется незначительно, а длительность УЗВ у самок в большинстве результатов измерений была выше, чем у самцов. Взрослые и старые животные в сравнении с молодыми демонстрируют меньшее количество и более низкую частоту УЗВ, в то время как различия по длительности УЗВ выявлены не были.

Животные обоего пола всех возрастов демонстрировали наибольшую поведенческую активность ночью. При этом взрослые самки в тёмное время суток двигались больше. Выявлено, что основное время на записи у крысы приходится на параметр «неподвижность». Меньший временной интервал занимают груминг и вертикальная стойка. Ещё меньше времени связано с локомоциями, питанием и питьём.

Таким образом, описанные выше исследования показали, что поведенческая активность крыс более выражена у молодых и взрослых самок в тёмное время суток.

Взаимосвязь между количеством нейронов в участках коры и стриатума крыс обоего пола и их поведенческой активностью в возрастном аспекте

В препаратах головного мозга, окрашенных крезильным фиолетовым по методу Ниссля, на срезах V пластинки моторной коры молодых крыс клеток мало, тела большинства нейронов выглядят округлыми, их цитоплазма слабо прокрашена, имеет вид узкого ободка, отростки не контурируются. В препаратах взрослых особей клеток намного больше, нейроны пирамидной формы, с интенсивно прокрашенной цитоплазмой, содержащей базофильные гранулы. К старости в моторной коре происходит снижение общего числа нейронов, однако их количество превышает наблюдаемое у молодых животных.

Исследование локомоторной активности показало, что максимальной подвижностью во время записи обладали взрослые самцы, а минимальной – старые животные обоего пола. Та же направленность была выявлена при подсчёте среднего количества нейронов в группах. Наименьшее значение этого показателя наблюдалось у молодых крыс, максимальное – у взрослых животных; к старости оно было сопоставимо для молодых особей (таблица 2).

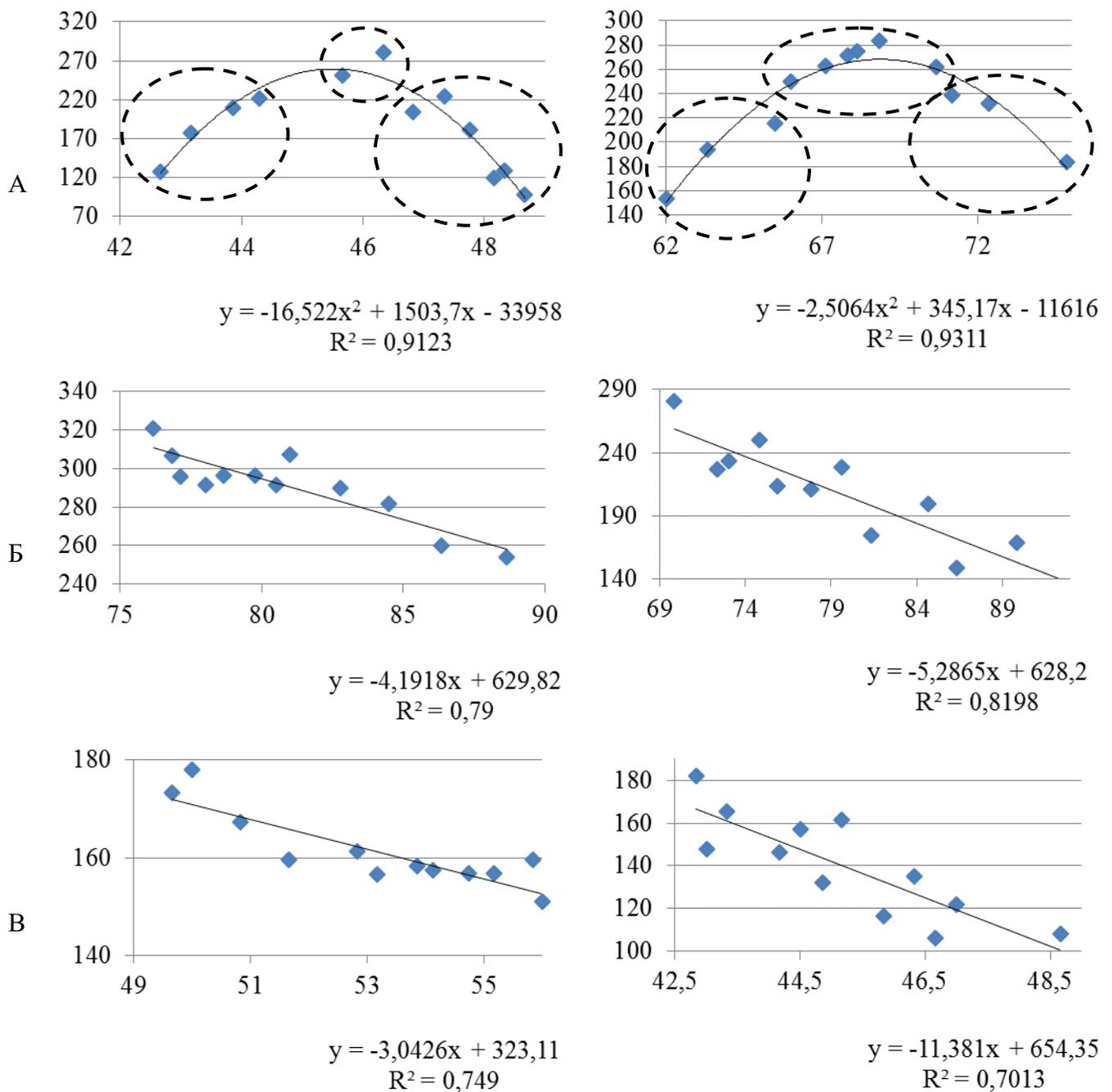
Таблица 2. Продолжительность локомоций и количество нейронов (в поле зрения) в V слое моторной коры крыс, $M \pm SE$, $n=72$ ($p \leq 0,05$)

Показатели	Группы животных					
	Молодые		Взрослые		Старые	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Продолжительность локомоций, сек	185,3±16,4	235,2±11,8*	291±5,4 [#]	206,1±12,2*	161,4±2,2°	140,0±7,0*°
Количество нейронов	46,1±0,6	68,1±1,1*	80,9±1,1 [#]	79,8±2,1 [#]	53,2±0,6°	45,2±0,5*°
Коэффициент корреляции	-0,25	0,26	-0,89	-0,91	-0,87	-0,84
Коэффициент детерминации	0,91	0,93	0,79	0,82	0,75	0,70

* – статистическая значимость различий самок разного возраста с самцами;

[#] – статистическая значимость различий молодых крыс со взрослыми;

° – статистическая значимость различий взрослых крыс со старыми.



1

2

Рисунок 1. Продолжительность локомоторных реакций и количество нейронов моторной коры (V пластинка) у молодых (А), взрослых (Б) и старых (В) крыс самцов (1) и самок (2) (в овалах выделены 3 подгруппы молодых животных). По оси абсцисс — количество нейронов (в поле зрения); по оси ординат — продолжительность реакции (с); $y=ax^2+bx+c$ — уравнение модели, описывающей зависимость продолжительности локомоторных реакций от количества нейронов моторной коры, а R^2 — коэффициент детерминации.

Регрессионный анализ материала с построением линейных и полиномиальных линий тренда позволил графически определить содержание нейронов в моторной коре и локомоторную активность животных.

Отмечено, что группа молодых крыс обоего пола, в отличие от других возрастных групп, характеризуется значительной неоднородностью. В ней присутствуют особи, отличающиеся

друг от друга по обоим показателям (рисунок 1). Так, одна часть животных проявила низкую двигательную активность на фоне низкого содержания нейронов, другая – характеризовалась большей плотностью расположения нейронов и больше двигалась, а третья – при максимальном представительстве нейронов в поле зрения отличалась меньшей продолжительностью совершаемых движений. У крыс других групп двигательная активность линейно коррелировала с количеством нейронов моторной коры. Плотность расположения нейронов в моторной коре мозга у крыс неодинакова в разных возрастных группах: она минимальна у молодых особей, возрастает у взрослых, и у старых животных снижается. Подвижность животных разных возрастных групп достоверно коррелирует с числом нейронов в моторной коре мозга. Двигательная активность взрослых и старых крыс внутри соответствующих групп линейно коррелирует с числом нейронов; у молодых особей аналогичная зависимость имеет нелинейный характер и описывается полиномиальной моделью второго порядка.

Таким образом, сопоставление возрастной динамики средних (по группам) функциональных и морфометрических показателей позволило выявить линейную связь между плотностью расположения нейронов в моторной коре и подвижностью животных: большее число нейронов коррелировало с большей двигательной активностью.

Для определения двигательной активности были использованы результаты записи локомоций (таблица 2). Корреляционная зависимость этого параметра от количества нейронов в стриатуме определена в таблице 3. Отмечается наличие высокой степени связи у молодых животных обоего пола, которая в дальнейшем снижается у взрослых особей, доходя до минимальных значений у старых животных.

Таблица 3. Продолжительность локомоций и количество тел нейронов (в поле зрения) в стриатуме крыс обоего пола разных возрастных групп, $M \pm SE$, $n=72$ ($p \leq 0,05$)

Показатели	Группы животных					
	Молодые		Взрослые		Старые	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Продолжительность локомоций, сек	185,3±16,4	235,2±11,8*	291±5,4 [#]	206,1±12,2*	161,4±2,2°	140,0±7,0*°
Количество нейронов	43,3±0,2	62,5±0,4*	62,3±1,1 [#]	53,2±0,5* [#]	52,5±0,2°	42,4±0,2*°
Коэффициент корреляции	0,90	0,89	-0,56	-0,54	-0,15	0,10
Коэффициент детерминации	0,80	0,79	0,75	0,83	0,74	0,84

* – статистическая значимость различий самок разного возраста с самцами;

[#] – статистическая значимость различий молодых крыс со взрослыми;

° – статистическая значимость различий взрослых крыс со старыми.

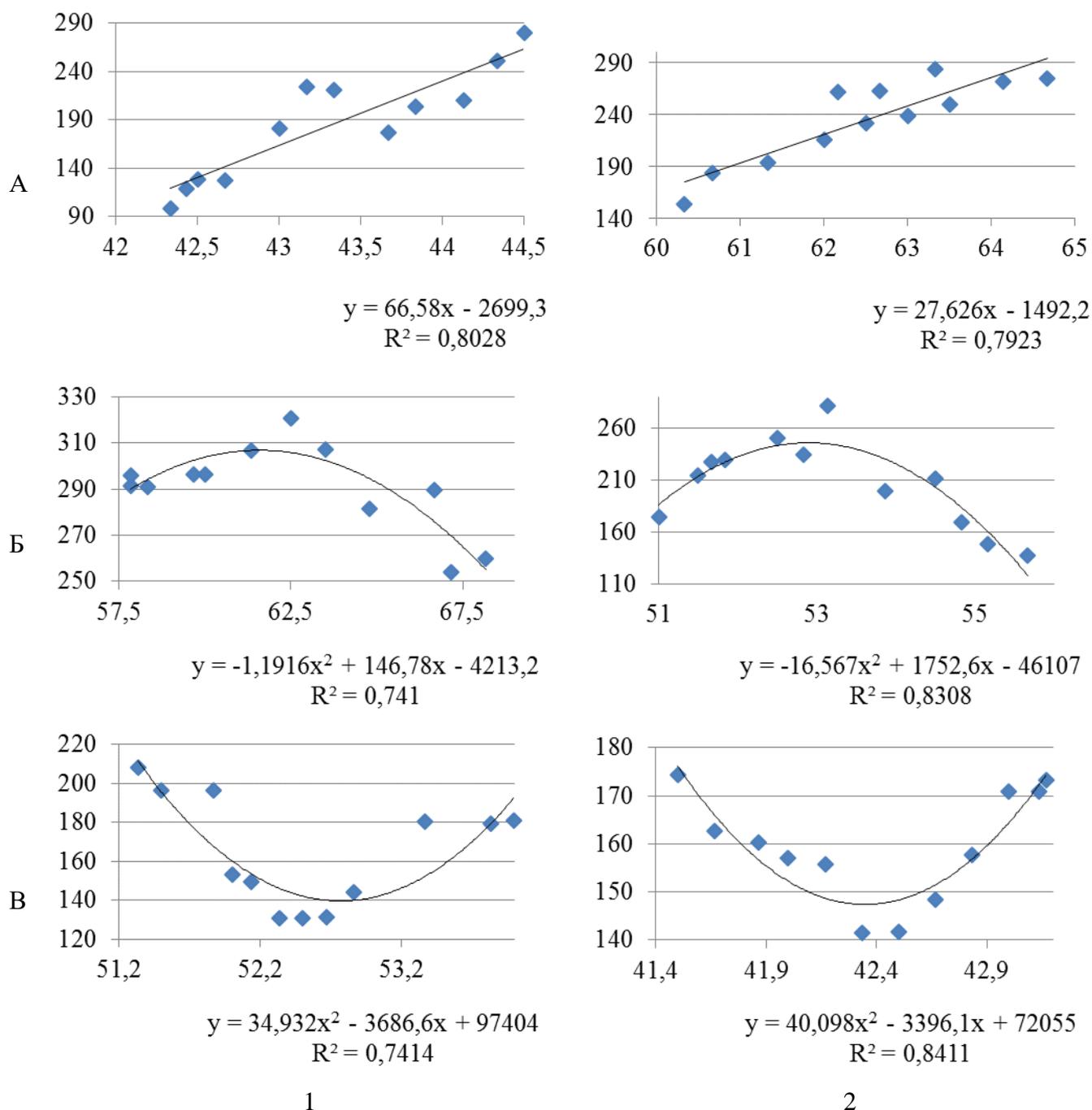


Рисунок 2. Продолжительность локомоторных реакций и количество нейронов стриатума у молодых (А), взрослых (Б) и старых (В) крыс самцов (1) и самок (2). Обозначения – см. рисунок 1.

Графический анализ полученных данных показал, что наибольшая корреляционная зависимость прослеживается между содержанием нейронов в стриатуме и двигательной активностью у молодых крыс обоего пола. Заметной связью эти параметры обладают у взрослых крыс, в то время как у старых особей её наличие не прослеживается (рисунок 2).

В препаратах головного мозга, окрашенных крезиловым фиолетовым, на срезах вентральной части стриатума крыс отмечается высокое содержание поперечно ориентированных в каудальном направлении нервных волокон, между которыми в небольшом

количестве расположены нейроны преимущественно округлой формы, с незначительной прокраской цитоплазмы.

Таким образом, регуляция двигательной активности у молодых животных достоверно коррелирует с количеством клеток структур стриатума. С возрастом у животных такая связь прослеживается меньше. Это обусловлено тем, что у молодых особей в антенатальном онтогенезе и первый месяц постнатальной жизни происходят сложные морфофункциональные процессы реорганизации коры, и главенствующая роль в регуляции поведения в целом и двигательной активности в частности приходится на подкорковые структуры головного мозга.

Оценка архитектоники структур головного мозга совмещённым методом

Ниссля–Гольджи

Анализ цито- и миелоархитектоники коры и стриатума головного мозга крыс показал, что совмещение методов окраски по Ниссля и по Гольджи на одном срезе позволяет провести комплексную оценку количества и размеров нейронов и глиальных клеток. Помимо этого, новый метод позволяет визуализировать тигроид, ядрышки, нервные волокна, нейропилль, оценить количество тотально импрегнированных нейронов от общего количества клеток, окрашенных по Ниссля (рисунок 3).

На срезах моторной коры головного мозга крыс отчётливо различаются окрашенные крезиловым фиолетовым нейроны с тигроидом, а также тотально импрегнированные нейроны в небольшом количестве. В ядрах нейронов, окрашенных по методу Ниссля, обнаруживаются округлые импрегнированные структуры небольшого размера – ядрышки. От импрегнированных нейронов в разных направлениях отходят отростки различной толщины – аксоны и дендриты.

Нейропилль и межклеточные контакты хорошо визуализируются. На срезах стриатума имеется большое количество поперечно ориентированных нервных волокон, между которыми имеются преимущественно нейроны, окрашенные крезиловым фиолетовым, их распределение неравномерно, очагово. Имеются единичные импрегнированные нейроны.

Анализ количества и функциональной активности нейронов и астроцитов в моторной коре головного мозга выявил достоверные различия по определению площади хроматофильной субстанции. Оценка архитектоники структур головного мозга совмещённым методом Ниссля–Гольджи показала увеличение синтетической активности нейронов в группе животных, получавших фармацевтическую комбинацию, содержащую 5% АСД 3 фракции. В стриатуме эти показатели не были изучены в связи с резкой неоднородностью архитектоники.

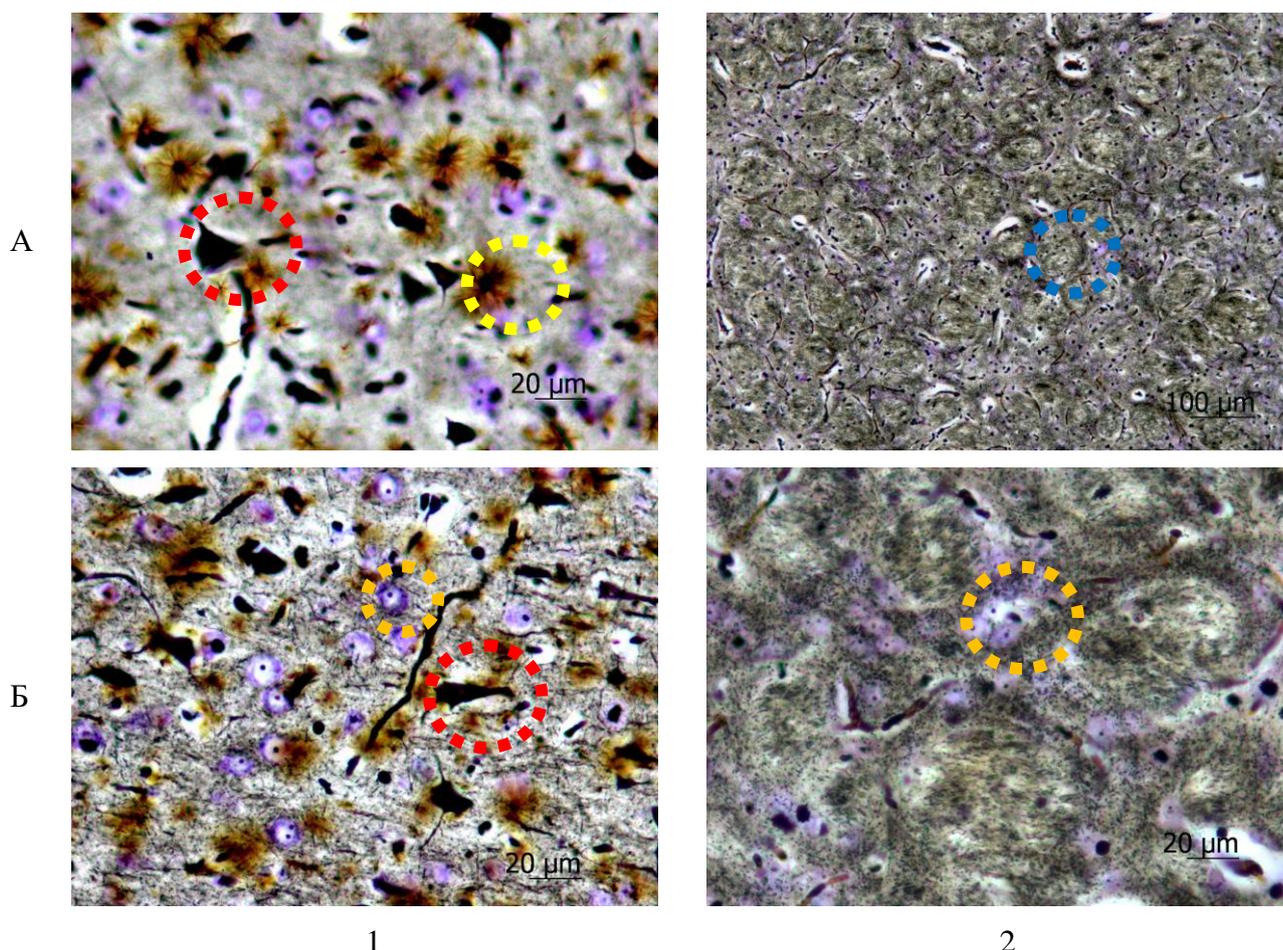


Рисунок 3. Микрофотографии фрагментов моторной коры (1) и стриатума (2) крыс, получавших комбинацию, содержащую 5% АСД 3 фракции, примеры клеток: (А) – астроциты (желтый круг), импрегнированные нейроны (красный круг), поперечно ориентированные нервные волокна (синий круг) и (Б) – импрегнированные нейроны (красный круг) и нейроны, окрашенные по методу Ниссля (оранжевый круг). Комбинированная окраска методами Ниссля и Гольджи. Об. 10х (2А), об. 40х (1А, 1Б, 2Б), ок. 20х.

Оценка морфофункциональных изменений и поведенческой активности животных, получавших фармацевтическую комбинацию, содержащую АСД 3 фракции в дозах 0,5 и 4 г/кг/сутки

Активацию c-Fos-позитивных нейронов головного мозга выявили в фоновом количестве у интактных крыс. У животных, получавших основу, наблюдалось большее количество c-Fos-позитивных нейронов. Крысы, получавшие фармацевтическую комбинацию с АСД 3 фракции, показали увеличение количества нейронов в структурах, особенно, в цингулярной, моторной коре и стриатуме (рисунок 4). Результаты анализа поведенческой активности крыс после применения фармацевтической комбинации демонстрируют увеличение продолжительности и скорости движения, пройденного расстояния, общего количества поведенческих актов. Анализ УЗВ показал, что крысы опытной группы издают ультразвуков больше и ниже (по частоте) в сравнении с другими.

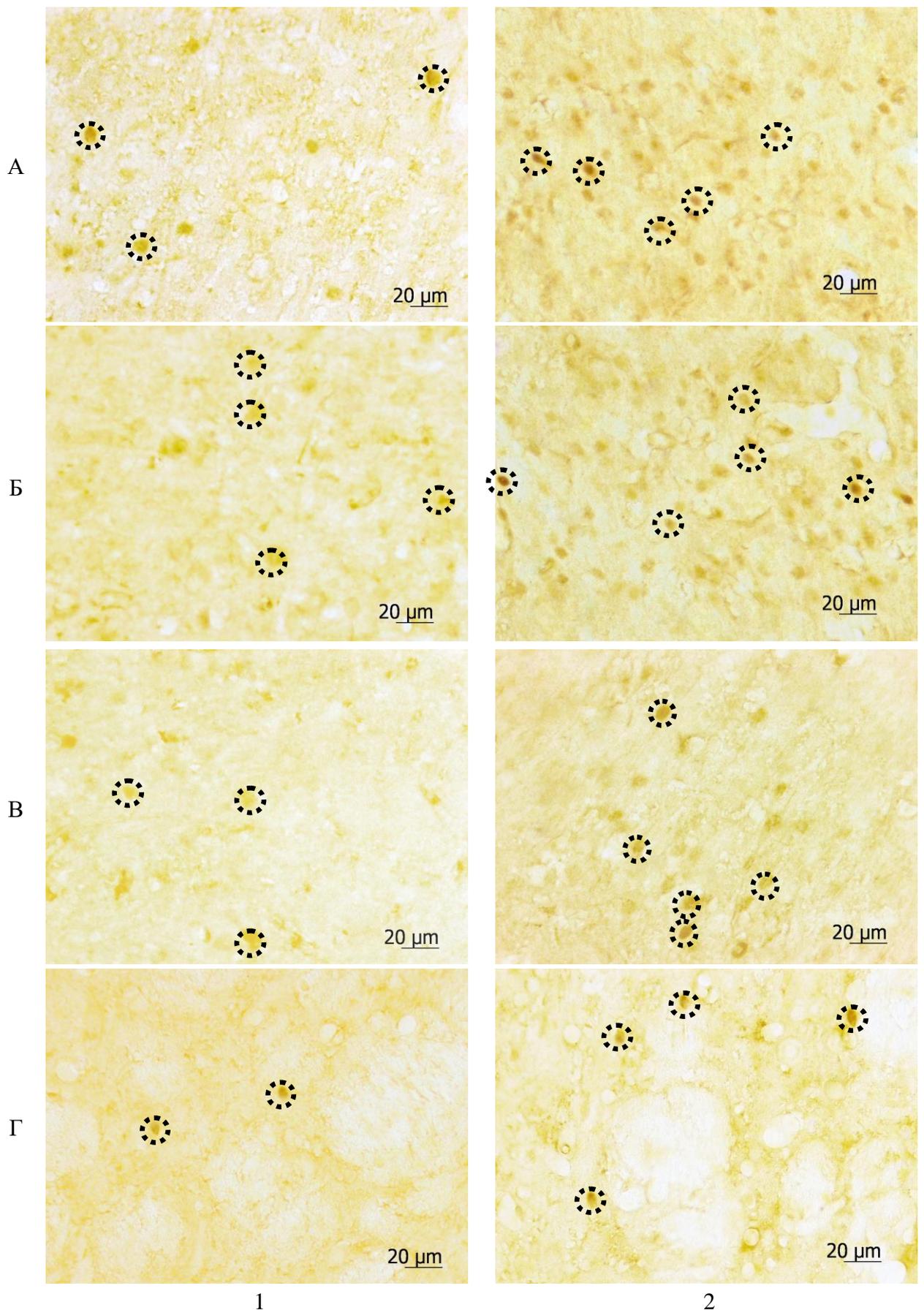


Рисунок 4. Микрофотографии фрагментов моторной (А), соматосенсорной (Б) цингулярной (В) коры и стриатума (Г) крыс, получавших основу (1) и фармацевтическую комбинацию в дозе 4 г/кг/сут (2). Примеры c-Fos-позитивных клеток разной интенсивности окраски указаны овалами Об. 40х, ок. 20х.

В настоящем исследовании обнаружена связь между активацией нейронов моторной коры и стриатума головного мозга крыс, оценённой по количеству с-Fos-позитивных клеток, и средней скоростью движения животных. Выявлена связь между количеством с-Fos-позитивных нейронов цингулярной коры и параметрами УЗВ в группе животных, получавших фармацевтическую комбинацию. Увеличение содержания белка с-Fos в клетках соматосенсорной и инсулярной коры свидетельствует об активации нейронов.

Таким образом, нанесение АСД 3 фракции на кожу межлопаточной области крыс линии Sprague Dawley приводит к значительному увеличению числа активированных, с-Fos-позитивных нейронов в цингулярной, моторной, инсулярной коре и стриатуме головного мозга, а также к увеличению двигательной и УЗВ активности крыс. Результаты корреляционного анализа позволяют говорить о высокой степени вероятности наличия связи между количеством активированных нейронов и поведенческой активностью животного.

Накожное нанесение фармацевтической комбинации в меньшей дозе (0,5 г/кг/сут) вызывало функциональные и морфологические изменения тех же структур мозга, однако количество с-Fos-позитивных клеток выявлялось больше в моторной коре и стриатуме (рисунок 5), в то время как увеличение количества активированных нейронов в цингулярной и соматосенсорной коре было менее выраженным. Средняя скорость передвижения, пройденное расстояние и количество надпороговых УЗВ увеличилось в меньшей степени при сравнении с более высокой дозой фармацевтической комбинации. Отсутствие различий количества активированных клеток соматосенсорной коры во 2 и 3 группах может говорить о незначительности факта ощущений при нанесении.

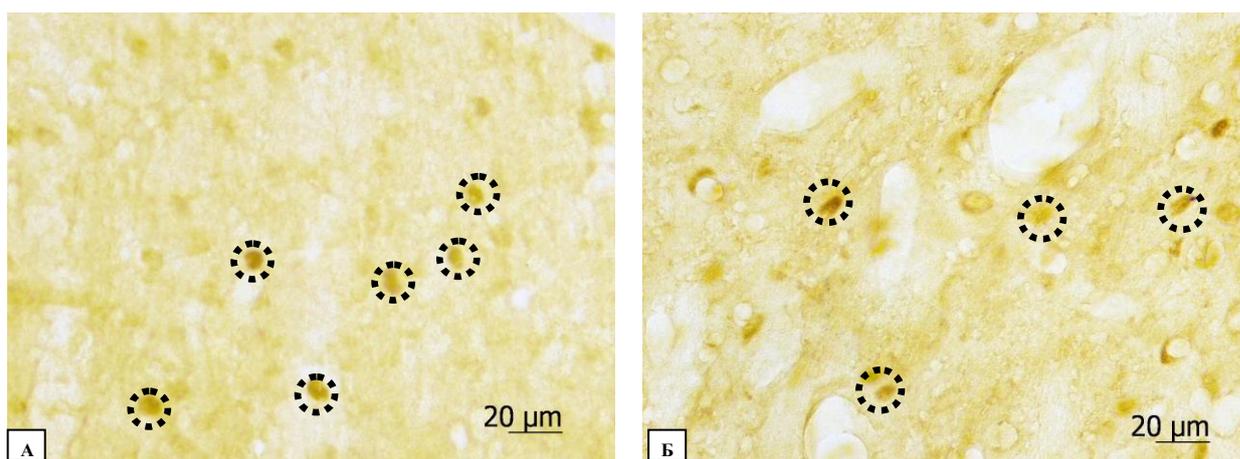


Рисунок 5. Фрагменты моторной коры (А) и стриатума (Б) крыс, получавших 5% АСД. С-Fos-позитивные нейроны (примеры клеток – в овалах). Об. 40х, ок. 20х.

Таким образом, накожное нанесение крысам АСД 3 фракции в малых дозах вызывает повышение двигательной и УЗВ активности, сопровождающееся увеличением количества с-Fos-позитивных нейронов цингулярной, моторной коры и стриатума без увеличения

активации соматосенсорной коры, которая является структурой, участвующей в обработке импульсов от сенсорных органов.

**Оценка наличия признаков местного раздражения и аллергизирующего действия
у животных, получавших фармацевтическую комбинацию с АСД 3 фракции
в дозах 0,5 и 4 г/кг/сутки**

При визуальной оценке состояния кожи спины морских свинок ($n=30$), получавших топически цинковую пасту, содержащую 5% АСД 3 фракции в дозировках 0,5 и 4 г/кг/сут в течение 1 недели, признаков местного раздражения выявлено не было. В течение всего срока наблюдения кожные покровы не содержали признаков отёка и имели естественную окраску. При гистологическом исследовании у 1-2 групп (контрольные) морских свинок морфологические признаки воспалительной реакции в коже отсутствовали на 1 и 14 сутки после последнего нанесения фармацевтической комбинации, а у животных 3 группы на 1 сутки после последнего нанесения при морфологическом исследовании участков кожи в сетчатом слое дермы были отмечены признаки небольшой воспалительной реакции в виде слабо выраженного полнокровия сосудов и небольшого количества диффузно расположенных мононуклеарных инфильтратов. К 14 суткам после нанесения фармацевтической комбинации эти признаки обнаружены не были.

При исследовании аллергизирующего действия комбинации, содержащей 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции, был проведён морфологический анализ кожи спины морских свинок ($n=18$). У животных 1 группы были обнаружены выраженные изменения в эпидермисе (десквамации, спонгиоз, эрозии) и дерме (кровоизлияния и увеличение клеточной плотности за счёт эозинофилов, тучных клеток и макрофагов). В образцах кожи, полученных от морских свинок 2 группы, отмечены изменения в эпидермисе (незначительные эрозии и десквамации) и дерме (возрастание клеточной плотности эозинофилов и макрофагов в сосочковом слое) умеренного характера. Морфологические изменения в коже животных 3 группы, получавших фармацевтическую комбинацию, содержащую 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции, были выражены слабо. Отмечалось незначительное скопление эозинофилов и макрофагов в сосочковом слое дермы у некоторых животных.

Таким образом, исследование показало, что накожное нанесение цинковой пасты с 5% антисептика-стимулятора Дорогова в течение 1 недели в дозе 0,5 г/кг/сут не оказывает местнораздражающего действия, в то время как применение фармацевтической комбинации в дозе 4 г/кг/сут сопровождается обратимым, слабо выраженным, быстро проходящим местнораздражающим действием на кожу самцов морских свинок. Основа и фармацевтическая комбинация не обладают аллергизирующим действием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интактные животные демонстрируют небольшую, фоновую активацию нейронов в центрах поведенческой активности головного мозга, что может быть обусловлено функциональным ответом нервной системы на внешние раздражители. Кроме того, животные характеризуются возрастными, половыми и суточными особенностями поведения. Накожное нанесение цинковой пасты, содержащей 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции демонстрирует выраженную активацию структур коры и стриатума головного мозга, сопровождающуюся возрастанием поведенческой активности у животных. Данные о возможном наличии признаков местного раздражения или аллергизирующего действия в условии накожного нанесения фармацевтической комбинации с 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции подтверждены не были.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано учитывать возрастные, половые и суточные особенности поведения животных, а также проводить стандартизацию по этим параметрам, что позволит повысить точность как проводимых доклинических исследований лекарственных препаратов, так и изучение особенностей поведения лабораторных животных в норме и при различных патологических состояниях.

2. При проведении доклинического исследования эффективности и безопасности новых лекарственных препаратов, в состав которых входит антисептик-стимулятор Дорогова 3 фракции, рекомендуется учитывать наличие у него активирующего эффекта на нервную систему.

3. Представленный способ окраски нервной ткани рекомендуется для практического применения в диагностике и изучении нейродегенеративных заболеваний у человека. Метод может быть успешно применен в патологоанатомических отделениях психиатрических клиник, а также является целесообразным в изучении фундаментальных вопросов строения и функционирования центральной нервной системы на экспериментальных лабораторных животных.

ВЫВОДЫ

1. Морфофункциональные изменения коры и стриатума головного мозга у крыс в норме характеризуются небольшим количеством с-Fos-позитивных (активированных) нейронов. При накожном нанесении фармацевтической комбинации с 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции происходит выраженная активация нейронов цингулярной, моторной, соматосенсорной коры и стриатума головного мозга и возрастание поведенческой активности животных.

2. Ультразвуковая и двигательная активность более выражена у молодых крыс, в большей степени у самок, и значительно возрастает в тёмное время суток.

3. Оценка количества нейронов структур головного мозга, принимающих участие в формировании двигательного поведения, а также характера поведенческих реакций при помощи совмещенного комплекса Laboras-Sonotrack, позволяет говорить о выявленной корреляционной зависимости между ними.

4. Применение фармацевтической комбинации, содержащей антисептик-стимулятор Дорогова 3 фракции, вызывает увеличение синтетической активности нейронов, оцененное по увеличению площади хромотофильной субстанции.

5. Накожное нанесение антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции вызывает дозозависимое увеличение количества активированных нейронов коры и стриатума головного мозга, что коррелирует с изменением поведенческой активности животных.

6. Применение фармацевтической комбинации с 5% антисептика-стимулятора Дорогова 3 фракции в дозе 4 г/кг/сут оказывает на кожу слабо выраженное обратимое быстро проходящее местнораздражающее действие. Накожное нанесение комбинации в дозе 0,5 г/кг/сут не сопровождается местным раздражением кожи, но вызывает активацию структур головного мозга и изменение поведенческих реакций у крыс. Аллергизирующее действие изучаемой композиции не обнаружено.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ноздрин В. И., Пьявченко Г. А. Опыт проведения доклинических исследований лекарственных препаратов дерматотропного действия // **Технологии живых систем.** – 2013. – Т. 10, № 8. – С. 31–36.

2. Пьявченко Г. А., Урываев Ю. В., Ноздрин В. И. Совместное применение комплексов Laboras и Sonotrack при исследовании поведенческих реакций у крыс // **Учёные записки Орловского государственного университета.** – 2013. – Т. 56, № 6. – С. 238–242.

3. Пьявченко Г. А. Суточная структура ультразвуковой вокализации у крыс // Альманах «Ретиноиды». – М.: ЗАО «Ретиноиды», 2014. – Вып. 33. – С. 79–82.

4. Пьявченко Г. А. Способ оценки поведенческих реакций у грызунов // Альманах «Ретиноиды». – М.: ЗАО «Ретиноиды», 2014. – Вып. 33. – С. 83–90.

5. Пьявченко Г. А. Количество нейронов в зонах двигательной активности у крыс // Вопросы морфологии XXI века. – Вып. 4. – Сб. науч. тр.: «Учение о тканях. Гистогенез и регенерация» / под ред. И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича. – СПб.: ДЕАН, 2015. – С. 165–168.

6. Пьявченко Г. А., Шмаркова Л. И., Ноздрин В. И. Изменения количества нейронов в моторной коре крыс и их двигательная активность в возрастном аспекте // **Морфология.** – 2015.

– Т. 147, № 3. – С. 7–10. Переводная версия: **P'yavchenko G. A.**, Shmarkova L. I., Nozdrin V. I. Changes in the Number of Neurons in the Rat Motor Cortex and Movement Activity with Age // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2016. – Vol. 46, № 3. – P. 270–273.

7. **Пьявченко Г. А.**, Шмаркова Л. И., Ноздрин В. И. Возможная взаимосвязь между количеством нейронов стриатума и двигательной активностью крыс в разные периоды жизни // *Морфология*. – 2015. – Т. 147, № 3. – С. 78.

8. Nozdrin V. I., **Piavchenko G. A.**, Novikova N. S., Pugach V. A. "PASDen" Effect on the Neurons Activation in Different Rat Brain Regions // *Abstracts of the V International Symposium Interaction of the Nervous and Immune Systems in Health and Disease*. – Saint-Petersburg, 2015. – P. 46–47.

9. **Пьявченко Г. А.**, Пугач В. А., Новикова Н. С., Шмаркова Л. И., Корнева Е. А., Ноздрин В. И. Содержание c-Fos-позитивных нейронов в коре и полосатом теле большого мозга и особенности поведения крыс при накожном нанесении пасты с антисептиком-стимулятором Дорогова // *Морфология*. – 2016. – Т. 150, № 6. – С. 13–19. Переводная версия: **P'yavchenko G. A.**, Pugach V. A., Novikova N. S., Shmarkova L. I., Korneva E. A., Nozdrin V. I. The Content of c-Fos-Positive Neurons in the Cerebral Cortex and Striatum and Behavioral Characteristics in Rats on Cutaneous Application of Antiseptic Dorogov's Stimulator Paste // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2017. – Vol. 47, № 8. – P. 1004–1009.

10. **Пьявченко Г. А.**, Пугач В. А., Дутта П., Новикова Н. С. Морфофункциональная характеристика воздействия пасты с АСД 3 фракции на поведенческую активность у крыс // *Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XXII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием*. – СПб., 2016. – С. 73–74.

11. Ноздрин В. И., **Пьявченко Г. А.**, Новикова Н. С., Пугач В. А., Корнева Е. А. Влияние накожного нанесения цинковой пасты, содержащей антисептик-стимулятор Дорогова (ПАСДэн®) на двигательную активность крыс // *Морфология*. – 2016. – Т. 149, № 3. – С. 151–152.

12. **Пьявченко Г. А.**, Дутта П., Новикова Н. С., Пугач В. А., Корнева Е. А., Ноздрин В. И. Влияние накожного нанесения антисептика-стимулятора Дорогова на поведенческие реакции крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2017. – Т. 163, № 5. – С. 637–640. Переводная версия: **Piavchenko G. A.**, Dutta P., Pugach V. A., Novikova N. S., Korneva E. A., Nozdrin V. I. Effect of Skin Application of Dorogov's Antiseptic-Stimulant on Behavioral Reactions in Rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 163, № 5. – P. 677–680.

13. **Piavchenko G. A.**, Bachdasarian L., Bulthuis R., Nozdrin V. I. Multi-functional measurement systems application in preclinical drug research // *The proceedings of International*

congress «Biotechnology: state of the art and perspectives». – Moscow.: LLC «RED GROUP», 2017. Vol. 1. – P. 299.

14. **Пьявченко Г. А.**, Дутта П., Шмаркова Л. И., Ноздрин В. И. Зависимость активации нейронов коры большого мозга и стриатума крыс от дозы пасты АСД // Морфология. – 2017. – Т. 151, № 3. – С. 98–99.

15. **Piavchenko G. A.** Antiseptic Dorogov's Stimulator 3rd Fraction Skin Application and its Effect on the Nervous System Activation // Abstracts of the VI International Symposium Interaction of the Nervous and Immune Systems in Health and Disease. – Saint-Petersburg, 2017. – P. 63.

16. **Piavchenko G. A.**, Bachdasarian L., Bulthuis R., Nozdrin V. I. Multi-Functional Measurement Systems Application in Preclinical Drug Research (Laboras, Sonotrack, DSI-telemetry) // Program and Proceedings of the 24th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and Behavior». – Saint-Petersburg, 2017. – P. 19.

17. **Piavchenko G. A.**, Bulthuis R., Bachdasarian L., Nozdrin V. I. Antiseptic Dorogov's Stimulator skin application effect on the animal's behavioral response // Abstracts of Society for Neuroscience 47th Annual Meeting «Neuroscience 2017». – Washington, DC (USA), 2017. Vol. 6 (14 November AM). – P. 799.

18. **Пьявченко Г. А.** Оценка местнораздражающего действия пасты, содержащей АСД 3 фракции // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Трансляционная медицина». – 2017. – С. 140–141.

19. **Piavchenko G. A.**, Bulthuis R., Bachdasarian L., Nozdrin V. I. Gender-related cortico-striatal interactions in motor behavior regulation of rats in different age // Abstracts of 11th Federation of European Neurosciences Societies Forum of Neuroscience. – Berlin (Germany), 2018. 7-11 July. – P. 301.

20. Иванова М. Е., Гузев К. С., Пронина К. С., **Пьявченко Г. А.**, Кузнецов С. Л. Валидация методики количественного определения фенола в составе пасты с антисептиком-стимулятором Дорогова 3 фракции // Альманах «Ретиноиды». – М.: АО «Ретиноиды», 2019. – Вып. 35. – С. 17–22.

21. **Пьявченко Г. А.**, Кузнецов С. Л., Ноздрин В. И. Оценка местнораздражающего и аллергизирующего действия препарата с 5% АСД 3 фракции // Альманах «Ретиноиды». – М.: АО «Ретиноиды», 2019. – Вып. 35. – С. 29–31.

Способ одновременного выявления нейронов и астроцитов на гистологических препаратах нервной ткани: патент № 2666256 Рос. Федерация / **Пьявченко Геннадий Александрович**, Дутта Пранаб, Новикова Наталья Сергеевна, Ноздрин Владимир Иванович, заявитель и патентообладатель – ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» – заявл. № 2016152820 30.12.2016, опубл. 06.09.2018. – Бюл. №25. – 6 с.

Список использованных сокращений и условных обозначений:

АСД – антисептик-стимулятор Дорогова.

БСА – бычий сывороточный альбумин.

ДАБ – 3,3'-диаминобензидин.

ДНХБ – 2,4-динитрохлорбензол.

кГц – килогерц.

мкл – микролитры.

СБФ – фосфатно-солевой буфер.

СОП – стандартная операционная процедура.

УЗВ – ультразвуковые вокализации.

ФГБУН НЦБМТ ФМБА России – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России.

ФГБУН «ИБХ» РАН – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук.

ЦДИ АО «Ретиноиды» – центр доклинических исследований акционерного общества «Ретиноиды».