

ДНЕВНИК
преддипломной практики
2017 – 2018 учебный год
Студентки 6 курса 4 группы МБФ
Семеновой Ю.В.

Время практики с 12.02.2018 г. по 02.06.2018 г.

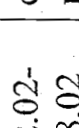
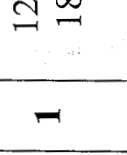
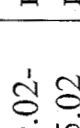
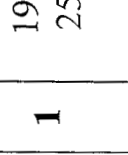
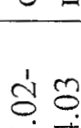
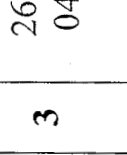
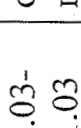
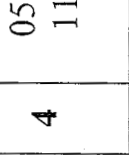
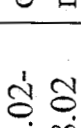
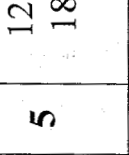
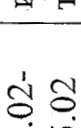
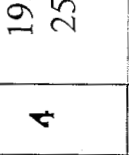
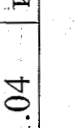
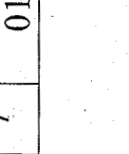
Место практики – кафедра фармакологии и биоинформатики


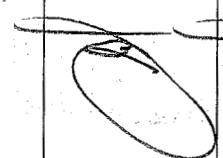



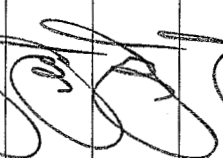

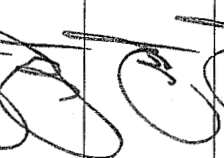

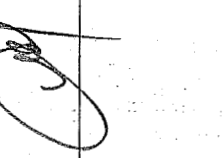




Вузовский руководитель : доц. кафедры фармакологии
и биоинформатики, д.м.н. Д.С. Яковлев

Общее кол-во отработанных часов - 900



Волгоград, 2018г.

N	Сроки	Содержание выполненной работы	Подпись студента	Подпись руководителя
1	12.02-18.02	Проведение аналитического обзора литературных данных, отражающих современное состояние исследуемой проблемы, получение обоснование целесообразности проводимого исследования. Работа с научными базами данных PubMed, Scopus, Web Of Science, eLIBRARY		
1	19.02-25.02	Постановка цели и задач выпускной квалификационной работы. Подготовка к выполнению экспериментальной части дипломной работы. Проработка дизайна исследования, составление шаблонов регистрации первичных данных. (см. ниже Приложение 1)		
3	26.02-04.03	Исследование антиагрегантной активности нового 5-HT _{2A} -антагониста <i>in vitro</i> методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени, и сравнить его с препаратом сравнения кислотой ацетилсалициловой в условиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. (см. ниже Приложение 2)		
4	05.03-11.03	Исследование антиагрегантной активности нового 5-HT _{2A} -антагониста <i>in vitro</i> методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени, и сравнить его с препаратом сравнения кислотой ацетилсалициловой в условиях адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов.		
5	12.02-18.02	Исследование антиагрегантной активности нового 5-HT _{2A} -антагониста <i>in vitro</i> методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени, и сравнить его с препаратом сравнения кислотой ацетилсалициловой в условиях серотонин-индуцированной агрегации тромбоцитов.		
4	19.02-25.02	Изучение антитромботическую активность нового 5-HT _{2A} -антагониста <i>in vivo</i> , с использованием модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током. Получение экспериментальных данных в контрольной группе животных, N=5 (см. ниже Приложение 3)		
7	26.03-01.04	Изучение антитромботическую активность нового 5-HT _{2A} -антагониста <i>in vivo</i> , с использованием модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим		

		током. Получение экспериментальных данных в группе животных препарата сравнения кислоты ацетилсалициловой, N=5		
8	02.04-08.04	Изучение антитромботическую активность нового 5-HT _{2A} -антагониста in vivo, с использованием модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током. Получение экспериментальных данных в группе животных препарата сравнения ципрогептадина N=5		
9	09.04-15.04	Изучение антитромботическую активность нового 5-HT _{2A} -антагониста in vivo, с использованием модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током. Получение экспериментальных данных в группе животных соединения Ib, N=5		
10	16.04-23.04	Проведение статистического анализа с обоснованием выбора критериев обработки первичных экспериментальных данных. (см. ниже Приложение 4)		
11	30.04-02.05	Анализ проведенного исследования антиагрегантных и антитромботических свойств соединения Ib. Формулировка выводов.		
12	03.05-19.05	Подготовка к проведению предварительной защиты дипломной работы на кафедре фармакологии и биоинформатики		
13	20.05-31.05	Работа с рецензентами. В качестве внешнего рецензента выбрана доцент кафедры анатомии и физиологии ВГАФК, д.б.н. В.А. Лиходеева, в качестве внутреннего - профессор кафедры фармакологии и биоинформатики д.м.н. А.Ф.Кучерявенко		
14	01.06-02.06	Проверка дипломной работы на объем заимствования в системе «Антиплагиат»		

Образец протокола эксперимента

Исследование антиагрегантных свойств *in vitro*

Протокол № _____

Дата выполнения эксперимента: « _____ » _____ 20__ г.

Время выполнения эксперимента: _____

Исполнители: _____

Вид животных _____ кролик _____ Пол _____ Масса животного _____

Номер животного _____

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация вводимого образца	Индуктор/концентрация	Изменение показателя светопропускания, Δ%	Примечание

Подпись _____

Образец протокола эксперимента

**Исследование антитромботических свойств in vivo. Тромбоз,
индуцированный электрическим током.**

Протокол № _____

Дата выполнения эксперимента: « _____ » _____ 20__ г.

Время выполнения эксперимента: _____

Исполнители: _____

Вид животных _____ крыса _____ Пол _____ Масса животного _____

Номер животного _____ Масса вводимого хлоралгидрата _____

Доза вводимого вещества _____ Масса вводимого вещества _____

№ п/п	Тестируемый образец	Линейная скорость кровотока, см/с	Время, мин	Примечание

Подпись _____

Исследование агрегации тромбоцитов.

Изучение антиагрегантных свойств *in vitro* проводилось на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (Рис.2.1) АЛАТ-2 "Viola" (г. Москва) по методу G. Born [Born G.V., 1962] в модификации З.А.Габбасова [Габбасов З.А. и др., 1989]. Метод основан на измерении среднего радиуса агрегатов – ФСП метод. Здесь происходит анализ флуктуаций светопропускания вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов, и используется для исследования кинетики агрегации.

Методология эксперимента включала в себя следующие этапы:

1. Забор крови производился из краевой ушной вены.
2. Стабилизация цельной крови 3,2%-ным раствором цитрата натрия (рН 6,0) в соотношении 9:1.
3. Центрифугирование в течение 10 мин при 150 g.
4. Перенос богатой тромбоцитами плазмы в отдельную чистую сухую пробирку.
5. Добавление в кювету прибора с магнитной мешалкой 270 мкл плазмы и 30 мкл изучаемого вещества или дистиллированной воды.
6. Инкубация в течение 5 минут при 37 °С.
7. Добавление 30 мкл индуктора агрегации.
8. Регистрация агрегации тромбоцитов в течение 5 минут при 37°С и турбулентном режиме перемешивания (800 об/мин) (Рис. 1).
9. Регистрация первичных данных в протоколе проведения эксперимента.

С целью контроля чувствительности тромбоцитов к исследуемому соединению, учитывая фактор времени, прошедшего с момента забора материала (не более 3х часов) необходимо использование индуктора агрегации в начале, по завершению и в течение эксперимента с равными временными интервалами. (Рис.1)

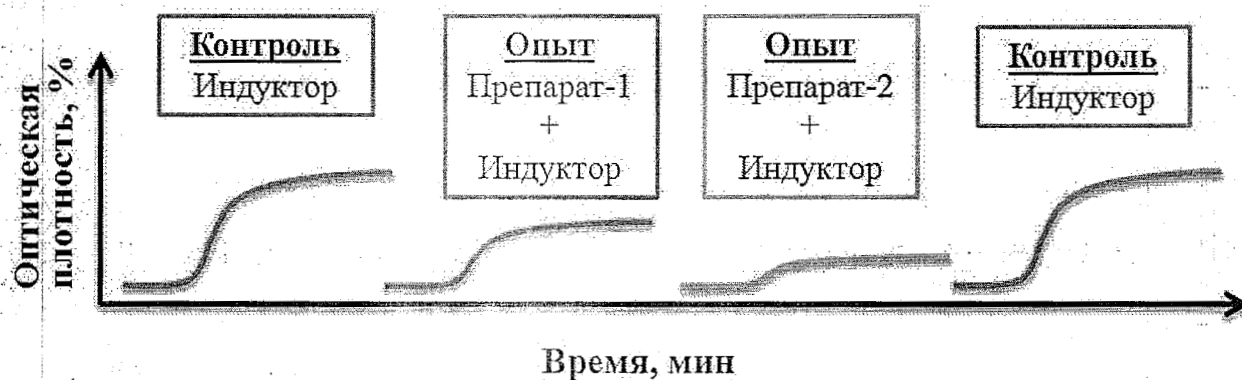


Рис.1 Схема проведения контроля чувствительности плазмы при изучении антиагрегантных свойств. По оси абсцисс - время в минутах, по оси ординат – уровень светопропускания, %, каждая кривая представляет собой новую порцию плазмы.

После получения первичных экспериментальных данных проводился расчет процента ингибирования оптической плотности при внесении в кювету изучаемых соединений. (Рис 3).

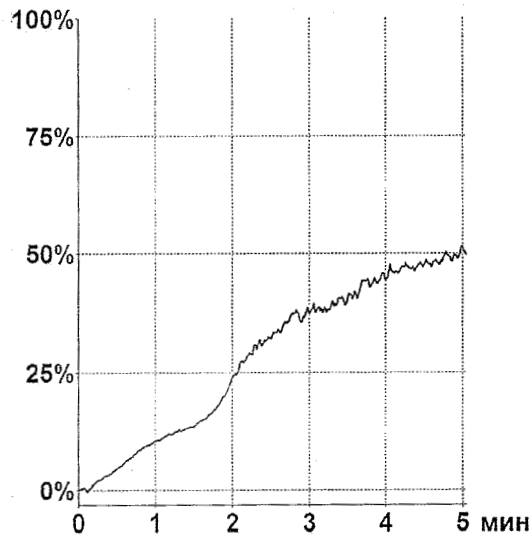


Рис.2 Агрегатограмма, полученная при внесении в кювету индуктора агрегации адреналина. По оси абсцисс время в минутах, по оси ординат – уровень светопропускания, %.

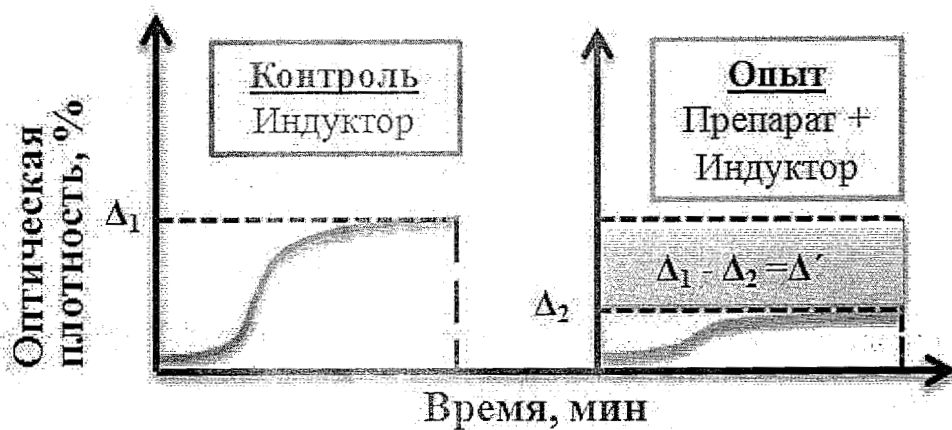


Рис.3 Схема расчета ингибирования изменения оптической плотности при внесении в кювету изучаемого препарата. По оси абсцисс - время в минутах, по оси ординат – уровень светопропускания, %, каждая кривая представляет собой новую порцию плазмы. Δ_1 – оптическая плотность при внесении в кювету индуктора агрегации, Δ_2 – оптическая плотность при предварительной инкубации в кювете изучаемого препарата и последующего добавления индуктора агрегации, Δ' - разница оптических плотностей.

Ципрогептадин, АСК и соединение IV изучались в диапазоне концентраций (0,1 – 10 мкМ). В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали серотонин (Sigma, США) в конечной концентрации 10 мкмоль/л, аденозиндифосфат (АДФ) (Sigma, США) в конечной концентрации 5 мкмоль/л и адреналин (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкмоль/л.

Экспериментальный тромбоз, индуцированный электрическим током (ТИЭ)

Изучение антитромботической активности соединения *in vivo* проводилось по модифицированному методу Guglielmi G. [Guglielmi Getal, 1991]. Данный вид тромбоза является неспецифическим, в основе механизма тромбообразования лежит выброс большого количества медиаторов: АТФ, фактора Виллебранда, а также прямое повреждение стенки сосуда. В результате образование первичного (тромбоцитарного) тромба происходит активнее, чем при воздействии хлорида железа III, в основе механизма которого лежит реакция Габера-Вейса.

Предварительно животные рандомизированно были разделены на 3 группы: контрольную и 3 опытных. Контрольная группа интрагастрально получала дистиллированную воду в объеме 1,0 мл. Первой опытной группе вводился ципрогептадин в дозе 14,2 мг/кг за 1 час до начала оперативного вмешательства. Вторая опытная группа получала соединение IV в дозе 10 мг/кг, также за 1 час до операции. Третья – кислоту ацетилсалициловую в дозе 27 мг/кг. Дозы вводимых веществ соответствуют показателям полуингибирующих концентраций, рассчитанных в предыдущих исследованиях научными сотрудниками кафедры фармакологии и биоинформатики. [Морковина Я.В., Мальцев Д.В. Изучение токсичности и антисеротониновых свойств соединений IV и РУ-476, 2015.]

Оперативное вмешательство было произведено в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., 2012].

Методология эксперимента включала в себя следующие этапы: (Рис.5)

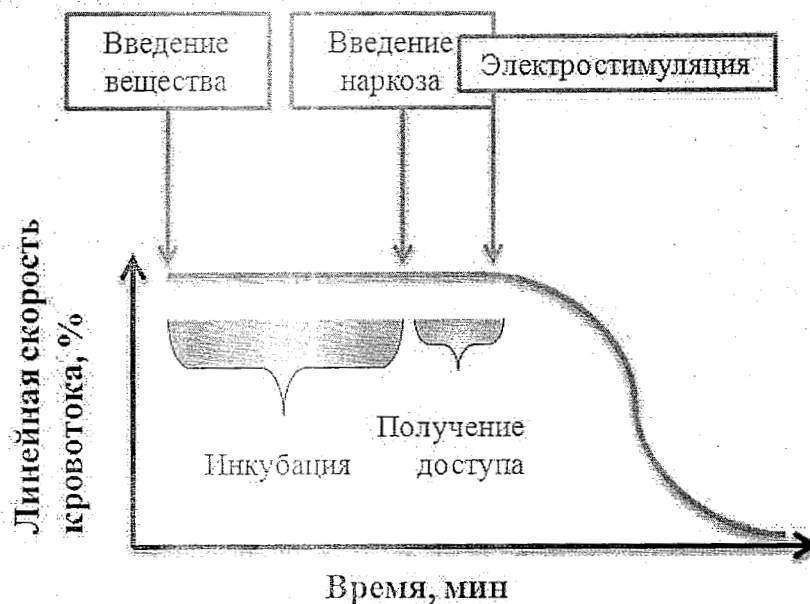


Рис.5 Схематичный дизайн исследования антитромботической активности соединения IV при моделировании ТИЭ.

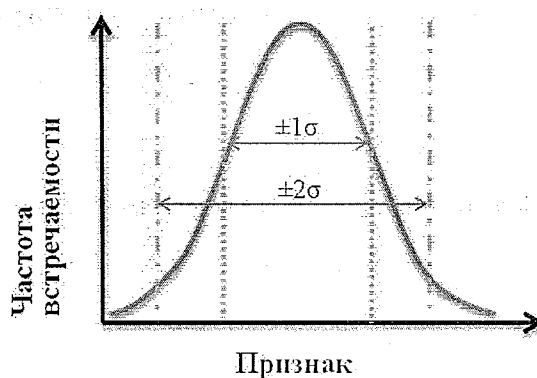
Дизайн проведения эксперимента

1. Наркотизация животных хлоралгидратом внутривенно (400 мг/кг).
2. Получение доступа к общей сонной артерии и освобождение её от сопутствующих тканей (не менее 4 см).
3. Установка ультразвукового датчика диаметром 2мм на 1-2 см дистальнее места наложения электродов.
4. Исследование линейной скорости кровотока ультразвуковым доплерографом («Минимакс-Допплер-К», Россия).
5. Закрепление электродов вплотную к сосуду таким образом, чтобы не нарушить скорость кровотока. Нанесение акустического геля на место контакта.
6. Подача постоянного электрического тока (12 В, 10 мА).
7. Регистрация изменений проводится до полной окклюзии сосуда.
8. Фиксирование показателей снижения линейной скорости кровотока на 50%, 90% и 95% от первоначального.
9. Регистрация первичных данных в протоколе эксперимента.

Методы статистической обработки данных и обоснование их использования

Для обработки первичных данных, полученных в серии экспериментов, использовались алгоритмы, описанные в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Сергиенко В.И., 2012] при помощи пакета программы GraphPad Prism 5.0. Проверка выборок на соответствие их Гауссовскому распределению (нормальность) проводилась по Колмогорову-Смирнову с критерием значимости Даллал-Уилкинсона-Лиллиефора.

При нормальном распределении 68% данных расположены в диапазоне ± 1 стандартное отклонение (σ) от среднего значения выборки, в диапазоне $\pm 2\sigma$ - 95% данных, трех σ - 99,5% (Рис 6).



Рисб. Схематичное представление закономерностей нормального (Гауссовского) распределения. По оси абсцисс – характеристика признак, по оси ординат – частота его встречаемости.

Проверить выборку на принадлежность её к нормальному закону распределения позволяет тест Колмогорова-Смирнова. Обычно вероятность ошибки при отклонении от нулевой гипотезы (p) принимают равной 5%. Если в ходе проверки значение $p < 0,05$ – то такое распределение нельзя считать нормальным (Рис 7) и использовать для последующей статистической обработки непараметрические критерии.

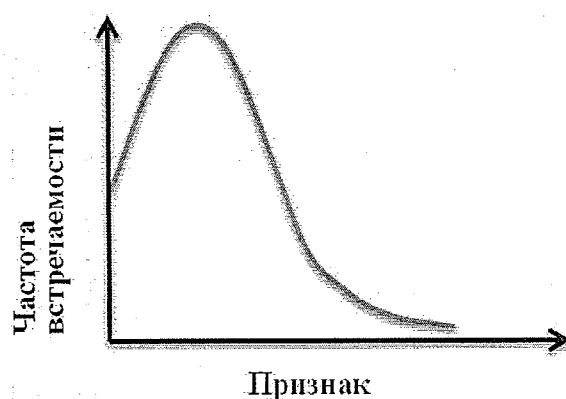


Рис.7 Схематичное представление закономерностей ненормального распределения. По оси абсцисс – характеристика признак, по оси ординат – частота его встречаемости.

Если в ходе проверки значение $p > 0,05$ – то такое распределение можно считать Гауссовским (нормальным) и использовать для последующей статистической обработки параметрические критерии.

Одним из распространенных параметрических критериев при сравнении 3х и более групп является однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA от англ. ANalysis Of VAriance). Так как в работе количество групп, в которых проводилось исследование составило 4 и более, то выбор данного критерия оправдан. Проведение посттеста Ньюмена-Кеулса после однофакторного дисперсионного анализа позволяет соотнести результат с критерием Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Расчет концентрационной зависимости при изучении антиагрегантных свойств был произведен с помощью линейного регрессионного анализа, итогом которого является выявление линейной функции, описывающей модель зависимости переменной от ряда параметров. Данная функция необходима при расчете ингибирующих концентраций (ИК) соединений.

Таким образом, в выпускной квалификационной работе при изучении нового соединения из ряда конденсированных азолов, проявляющего 5-HT_{2A}-антагонистические свойства, были использованы следующие средства статистической обработки данных:

1. при изучении антиагрегантных свойств
 - 1.1. тест Колмогорова-Смирнова
 - 1.2. критерий значимости Даллал-Уилкинсона-Лиллиефора
 - 1.3. однофакторный дисперсионный анализ
 - 1.4. посттест Ньюмена-Кеулса
 - 1.5. линейный регрессионный анализ
2. при изучении антитромботических свойств
 - 2.1. тест Колмогорова-Смирнова
 - 2.2. критерий значимости Даллал-Уилкинсона-Лиллиефора
 - 2.3. нелинейный регрессионный анализ
 - 2.4. однофакторный дисперсионный анализ
 - 2.5. посттест Ньюмена-Кеулса