

Генерация активных форм кислорода при экспериментальном стрессе у мышей и ее коррекция

Д.И. Гильдилов, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры общей патологии им. В.М. Коропова (Gildikovdmiv@mail.ru).

ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина (109472, РФ, г. Москва, ул. Ак. Скрябина, д. 23).

Целью работы являлось изучение генерации активных форм кислорода при экспериментальном стрессе у мышей и ее коррекция. Объектом исследований были мыши ($n=57$). В опыте «Отчаяния» изучали влияние антиоксиданта Мексидол-Вет[®] на локомоторную активность и слизистую оболочку 12-перстной кишки мышей, генерацию активных форм кислорода лейкоцитами в крови. Установлено, что внутримышечное введение мышам 5%-го раствора Мексидол-Вет[®] в дозе 40 мг/кг/сутки на протяжении 3 дней до форсированного плавания способствует достоверному увеличению продолжительности горизонтального плавания и снижению вертикальной локомоторной активности в 3,26 раза, по сравнению с особями, получавшими плацебо. В стрессовой модели установлен стресспротективный эффект препарата Мексидол-Вет[®] в отношении надпочечников, слизистой оболочки 12-перстной кишки (индекс Паулса составил 0,66), «респираторного взрыва» и генерации активных форм кислорода лейкоцитами крови (максимальная интенсивность и светосумма хемилюминесценции были достоверно выше значения мышей с плацебо на 233,25 и 231,28 %, соответственно. Линейная зависимость вариации кинетики хемилюминесценции крови отражена в формуле: $y = -3020,7x + 10793$. Величина достоверности аппроксимации линии тренда составила 0,991.

Ключевые слова: стресс, форсированное плавание — опыт «Отчаяния», мыши, индекс Паулса, Мексидол-Вет[®], активные формы кислорода, хемилюминесценция.

Generation of reactive oxygen species under experimental stress in mice and its correction

D.I. Gildikov, Ph.D in Veterinary Science, Associate Professor of the Department of General Pathology named after V.M. Koropov (Gildikovdmiv@mail.ru).

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — Moscow Veterinary Academy named after K.I. Skryabin (23, Ac. Skryabina str., Moscow, RF, 109472).

The aim of the work was to study the generation of reactive oxygen species under experimental stress in mice and their correction. The object of research were mice ($n=57$). In the experience of «Despair», we studied the effect of the antioxidant Mexidol-Vet[®] on locomotor activity, on the duodenal mucosa of mice, and the generation of reactive oxygen species by leukocytes in the blood. It was found that intramuscular administration of a 5 % solution of Mexidol-Vet[®] to mice at a dose of 40 mg/kg/day for 3 days before forced swimming contributes to a significant increase in the duration of horizontal swimming and a decrease in vertical locomotor activity by 3.26 times, compared with individuals receiving placebo. In the stress model, the stress-protective effect of the drug Mexidol-Vet[®] was established in relation to the adrenal glands, duodenal mucosa (Pauls index was 0.66), «respiratory burst» and generation of reactive oxygen species by blood leukocytes (the maximum intensity and light sum of chemiluminescence were significantly higher than the value mice with placebo by 233.25 % and 231.28 %, respectively. The linear dependence of the variation in the kinetics of blood chemiluminescence is reflected in the formula: $y = -3020.7x + 10793$. The significance value of the approximation of the trend line was 0.991.

Keywords: stress, forced swimming — experience of "Desperation", mice, Pauls index, Mexidol-Vet[®], reactive oxygen species, chemiluminescence.

Сокращения: АТФ — аденозинтрифосфат (аденозинтрифосфорная кислота), АФК — активные формы кислорода, ИП — индекс Паулса, ХЛ — хемилюминесценция

Введение

По современным данным, стресс представляет собой неспецифическую реакцию организма на любое сильное воздействие, нарушающее его гомеостаз.

Подверженность стрессовым воздействиям является одной из главных проблем как в медицине человека, так и в ветеринарии. В результате этого воздействия формируется общий адаптационный синдром к действию стрессора [8], но по мере истощения адаптационных возможностей происходит срыв регуляторных систем организма, возникают метаболическая иммуносупрессия и иммунодефицит [9].

Продукция лейкоцитами крови АФК направлена на уничтожение чужеродных объектов, при этом, недостаточное образование АФК может свидетельствовать о слабости защитных сил организма [3, 5]. Таким образом, способность лейкоцитов образовывать достаточное количество АФК может служить прогностическим признаком для оценки дальнейшего хода стресс-реакции, а ответ на стандартный стимул может характеризовать активность защитных сил организма животных. В связи с этим актуальной задачей является поиск стресспротекторов с широким диапазоном терапевтических эффектов [2]. Применение препаратов с антиоксидантным действием представляет значительный интерес в связи с тем, что эффект антиоксидантов обусловлен лимитирующим воздействием при стрессорных воздействиях на ряд звеньев патогенеза, позволяя ограничить их развитие и степень выраженности [1].

Цель исследования

Целью работы являлось изучение генерации АФК при экспериментальном стрессе у мышей и ее коррекция.

Материалы и методы

Перспективная плацебо-контролируемая экспериментальная работа была выполнена на половозрелых аутбредных самках мышей средней массой 39 г. Содержание животных в виварии на стандартном кормлении и эксперименты проводились при строгом соблюдении требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.) и Федерального закона Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г.

Особей разделили на 3 группы: контрольная группа (n=25), в опытные группы № 1 и 2 входили по 16 мышей.

Стрессовое состояние у мышей воспроизводили форсированным плаванием — тест «Отчаяния», помещая мышей на 300 с в стеклянный цилиндр, заполненный на 1/3 водой (27 °С). Для коррекции стрессорных нарушений у мышей опытной группы № 2 использовали 5%-й раствор Мексидол-Вет®, который вводили внутримышечно, в дозе 40 мг/кг/сутки на протяжении 3 суток до эксперимента. Мышам группы № 3 в идентичном объеме инъектировали стерильный физиологический раствор.

Видеофиксацию экспериментальной работы осуществляли при помощи видеокамеры Sony HDR-PJ410 (Япония), регистрировали продолжительность

фаз активности и пассивности мышей, количество погружений их носа в воду. Видео контент анализировали посредством программы «RealTimer», версия 1.21, 2013 г.

По завершению теста «Отчаяния» мышей декапитировали, брали пробы крови. Функциональную способность лейкоцитов определяли посредством метода ХЛ в течение 30 минут на хемилюминометре «Lum-1200», (Россия). Использовали цельную разведенную в 22 раза кровь раствором Хенкса без фенолового красного («ПанЭко», Россия). Для усиления интенсивности свечения использовали 1 мМ раствор люминола («Sigma-Aldrich», США). В качестве индуктора респираторного «взрыва» использовали опсонизированный, по классической методике, на белках плазмы крови крыс зимозан («Sigma-Aldrich», США). Расчетными параметрами хемилюминесценции являлись: светосумма — общее количество фотонов, образующихся в течение всего времени измерения, рассчитывается как интеграл кривой ХЛ; максимальная интенсивность — максимальное значение интенсивности свечения в течении всего времени измерения.

Для оценки стрессорного влияния у мышей изучали слизистую оболочку фрагмента 12-перстной кишки длиной 10 см посредством видеоскопа «UB Cam 2.0», (KRUUSE, Дания). ИП, или индекс изъязвления, вычисляли по общепринятой формуле: $ИП = A \times B / 100$, где А — среднее количество язв на 1 животное; В — количество, %, животных с язвами в группе. Массу левого и правого надпочечников определяли на лабораторных весах («ML-CF3», Китай).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы AnalystSoft Inc., «STATPLUS», версия 2015 г. Статистическую достоверность оценивали путем применения t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В опыте «Отчаяния» установлено, что выживаемость у исследуемых мышей составляет 100 %. При анализе их поведения установлено (рис. 1, табл. 1), что мыши на фоне антиоксидантной поддержки препаратом Мексидол-Вет® после погружения в воду быстрее успокаивались, дольше плавали, временной период горизонтального плавания был достоверно выше на 11,41 %, по сравнению с животными без коррекции.

Особь 1-й опытной группы во время теста были более тревожны. Сразу после погружения их в воду активно перемещались по всей площади стеклянной емкости, быстро уставали и принимали вертикальное положение. Они чаще опускали нос в воду, захлебывались и фыркали, чтобы освободить носовые ходы от попавшей воды. Количество вертикальных локомотивов было выше в 3,26 раза ($p \leq 0,05$), чем у особей на фоне коррекции препаратом Мексидол-Вет®.

При исследовании фрагмента 12-перстной кишки мышей контрольной группы были отмечены единичные гиперемизированные очаги слизистой оболочки.

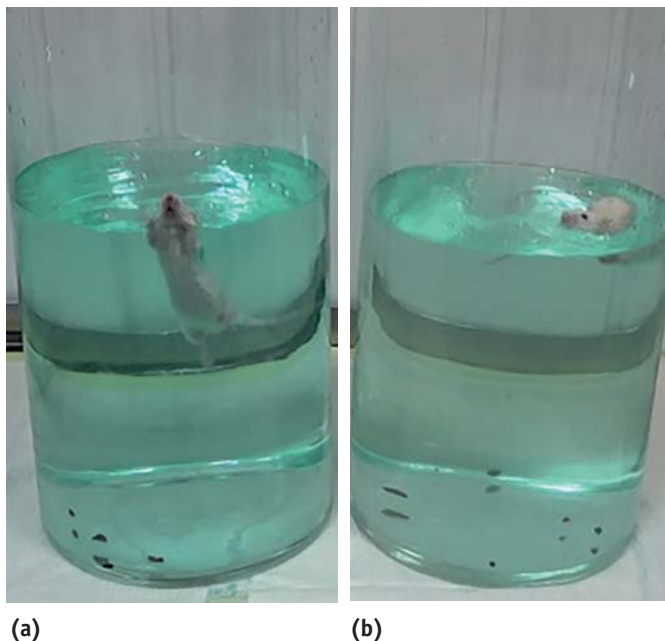


Рис. 1. Мыши в тесте «Отчаяния» на 300 сек опыта: а — вертикальная локомоторная активность у мыши с плацебо; б — горизонтальная активность у животного на фоне антиоксидантной поддержки

Mice in the «Desperation» test for 300 seconds of experience: a — vertical locomotor activity in a placebo mouse; b — horizontal activity in the animal against the background of antioxidant support

1. Изменение локомоторной активности у мышей при форсированном плавании
Changes in locomotor activity in mice during forced swimming

Исследуемый параметр	Опытная группа № 1 (n=10)	Опытная группа № 2 (n=10)
Фаза пассивности, с	114,13±19,1	92,9±11,04
Фаза активности, с	185,87±21,2	207,08±16,1*
Вертикальная активность, количество локомоций	10,6±1,3	3,25±0,8*

Примечание: * $p < 0,05$ — сравнение с контрольной группой мышей; ** $p < 0,05$ — сравнение с данными особей 1-й опытной группы

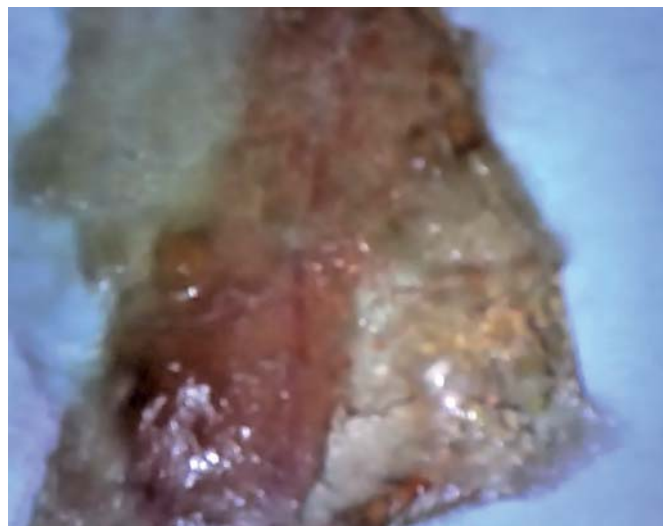
У мышей 1-й опытной группы очаги кровоизлияний в слизистой оболочке были зафиксированы в 100 % случаях (рис. 2, табл. 2), слизистая оболочка была увеличена в размерах, ее поверхность была влажной и гиперемированной, наблюдали язвенные дефекты в виде прерывистых полос.

У мышей на фоне применения Мексидол-Вет® слизистая оболочка 12-перстной кишки была незначительно гиперемирована, единично встречались полосовидные деструктивные очаги. Общее количество деструктивных очагов у животных на фоне коррекции препаратом Мексидол-Вет® было меньше на 51,6 % ($p < 0,05$). Индекс изъязвления у животных

на фоне антиоксидантной поддержки был ниже в 3,3 раза, по сравнению с животными 1-й опытной группы.

Установлено, что у мышей контрольной группы в среднем масса левого надпочечника составляет 5,7 мг, а правого — 5,5 мг. У мышей 1-й опытной группы стрессовое состояние, инициированное форсированным плаванием, способствует увеличению суммарной массы левого и правого надпочечников на 9,1 %, по сравнению с контрольной группой животных. У мышей в опыте с предварительным введением препарата Мексидол-Вет® масса левого и правого надпочечников была больше лишь на 3,4 %, по сравнению с особями контрольной группы. Разница между опытными группами составляет 0,64 мг.

При оценке кинетики ХЛ разведенной крови мышей (рис. 3, 4) установлено, что у мышей контрольной группы интегральное значение составило $1895,72 \pm 325,8$ усл. ед. У мышей с плацебо, подвергшимся действию стрессора, достоверно снижается



а



б

Рис. 2. Фрагмент слизистой оболочки 12-перстной кишки мышей в тесте «Отчаяние»: а — мыши с плацебо; б — мыши с коррекцией препаратом Мексидол-Вет®

A fragment of the mucous membrane of the duodenum of mice in the «Despair» test: a — mice with placebo; b — mice with drug Mexidol-Vet® correction

2. Изменение слизистой оболочки 12-перстной кишки у мышей в опыте «Отчаяния»
Changes in the mucous membrane of the duodenum in mice in the experience of «Despair»

Группа наблюдения	Количество деструктивных изменений слизистой оболочки 12- перстной кишки	Количество язвенных дефектов	Количество животных с язвенными дефектами, %	Индекс Паулса
Контрольная группа (n=10)	1,04±0,11	-	-	-
Опытная группа №1 (n=6)	8,42±1,01 *	2,17±1,03*	100	2,17
Опытная группа №2 (n=6)	4,07±1,25 */**	1,1±0,43*	60	0,66

Примечание: * $p < 0,05$ — сравнение с контрольной группой мышей; ** $p < 0,05$ — сравнение с данными особей 1-й опытной группы.

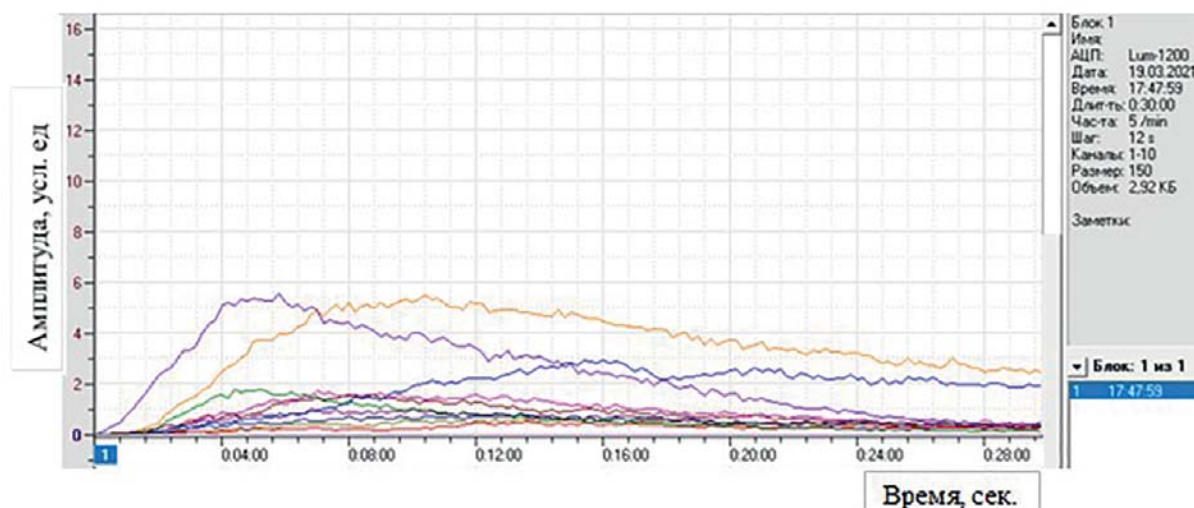


Рис. 3. Вариация кинетики хемилюминесценции у мышей при форсированном плавании
Variation in chemiluminescence kinetics in mice during forced swimming

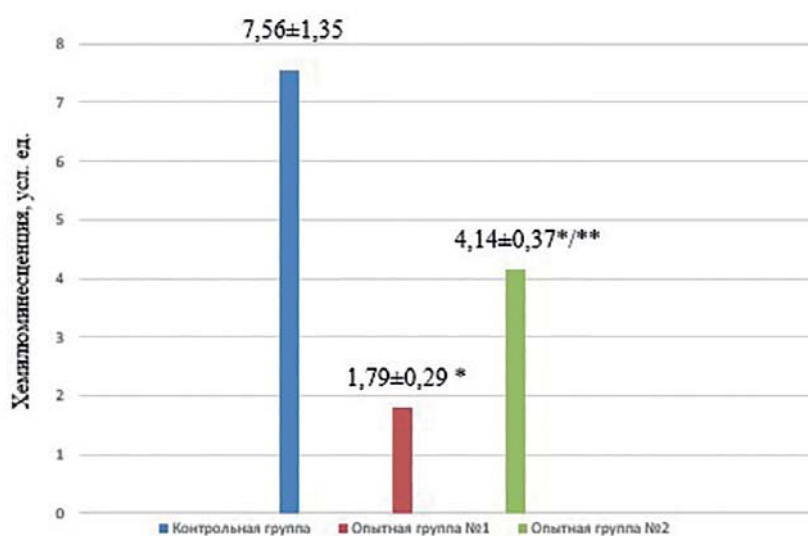


Рис. 4. Изменение максимального значения интенсивности хемилюминесценции крови мышей в тесте «Отчаяния»
Change in the maximum value of blood chemiluminescence intensity in mice in the Despair test

генерация активных форм кислорода на 76,1 % и максимальное значение интенсивности ХЛ в 4,22 раза, по сравнению с особями контрольной группы.

На фоне предварительного инъектирования мышам 5%-го раствора Мексидол-Вет® с последующим форсированным плаванием выявлено, что изучаемый

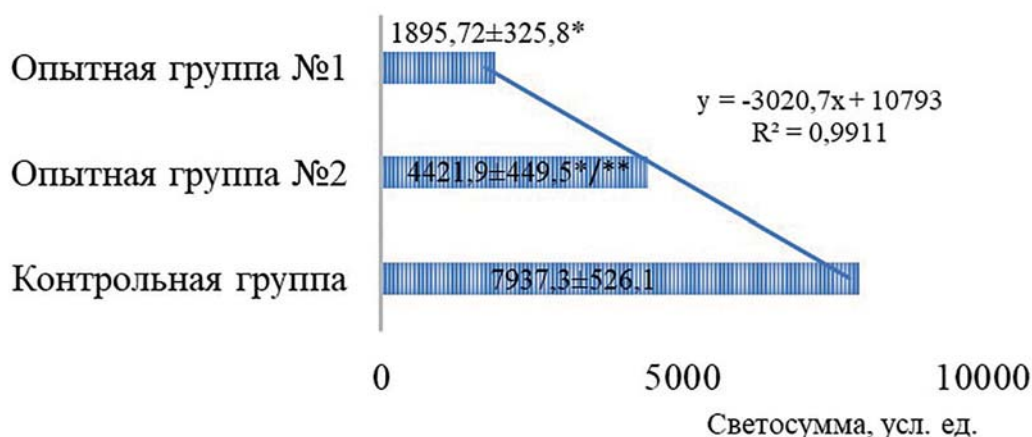


Рис. 5. Линейная зависимость генерации лейкоцитами свободных радикалов у мышей при форсированном плавании
 Linear dependence of the generation of free radicals by leukocytes in mice during forced swimming

препарат обладает стресспротективным влиянием на лейкоциты крови и стимуляцию «респираторного взрыва»: светосумма ХЛ и максимальная интенсивность были выше значения мышей с плацебо на 233,25 и 231,28 % ($p < 0,05$), соответственно.

У животных, подвергшихся плавательной физической нагрузке, в крови снижается количество активированных клеток, угнетается кислородзависимый метаболизм в фагоцитах и генерация ими АФК [9]. Напряжение метаболических процессов, снижение продукции активных форм кислорода и, следовательно, защитной функции крови при стрессах различного происхождения является негативным фактором, так как приводит к дефициту янтарной кислоты, снижению резистентности и ответной реакции организма на действие стрессора [4, 6, 10]. Как известно, устойчивость организма к воздействию различных неблагоприятных факторов во многом зависит от скорости и своевременности образования митохондриями АТФ. В таких случаях дополнительное введение янтарной кислоты может существенно помочь восстановлению жизнедеятельности организма [4]. Очевидно, что входящие в состав препарата Мексидол-Вет® этилметилгидроксипиридина сукцинат поддерживает подавляемую при стрессе функционально-метаболическую активность фагоцитирующих клеток крови. Данные подтверждаются работами отечественных исследователей [4, 7].

При математической обработке полученных данных по ХЛ разведенной крови мышей при экспериментальном стрессовом воздействии и построении линейной зависимости видно (рис. 5), что линия тренда имеет закономерность и находит свое отражение в формуле: $y = -3020,7x + 10793$. Величина достоверности аппроксимации линии тренда составляет 0,991, находится вблизи единицы, что подтверждает ее надежность.

Заключение

У мышей в тесте «Отчаяния» стрессорное действие проявляется достоверным увеличением ко-

личества деструктивных изменений на слизистой оболочке 12-перстной кишки; снижением времени плавания на 11,41 %, быстрым утомлением и достоверным увеличением количества вертикальных локомоций в 3,26 раза, угнетением генерации АФК лейкоцитами в крови экспериментальных особей. Внутримышечное введение мышам 5%-го раствора Мексидол-Вет® в дозе 40 мг/кг/сутки на протяжении 3 суток до форсированного плавания способствует:

- достоверному увеличению продолжительности горизонтального плавания и снижению вертикальной локомоторной активности в 3,26 раза, по сравнению с особями получавшими плацебо;
- развитию стресспротективного действия в отношении надпочечников, слизистой оболочки 12-перстной кишки (ИП составил 0,66), «респираторного взрыва» и генерации активных форм кислорода лейкоцитами крови. Линейная зависимость вариации кинетики ХЛ крови отражена в формуле: $y = -3020,7x + 10793$. Величина достоверности аппроксимации линии тренда составляет 0,991.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Библиография

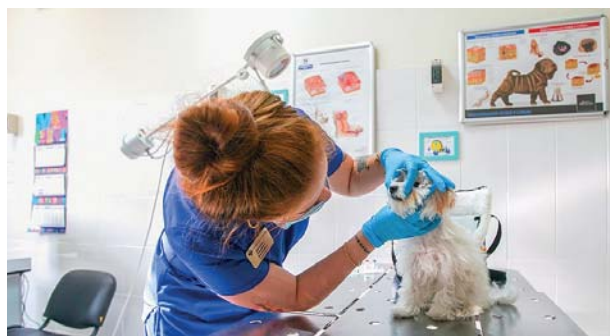
1. Батулин, В.А. Изучение уровней нейротропных аутоантител у больных шизофренией / В.А. Батулин, М.В. Батурина, Г.И. Мамцева, О.И. Боев, В.Б. Яровицкий, Е.В. Грудина, В.А. Батулин, О.В. Бородин, С.Н. Руденко, М.В. Батулин // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2016. — Т. 11. — № 2. — С. 176-178.
2. Гильдилов, Д.И. Реактивность у крыс при экспериментальном вибрационном воздействии / Д.И. Гильдилов, Т.В. Лосева, О.В. Петрова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2018. — № 2. — С. 146-149.
3. Грачева, Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток / Т.А. Грачева // Клиническая лабораторная диагностика. — 2008. — № 2. — С. 54-55.
4. Евлевский, А.А. Биологическая роль и метаболическая активность янтарной кислоты / А.А. Евлевский, Г.Ф. Рыжкова, Е.П. Евлевская, Н.В. Ванина, И.В. Михайлова, А.В. Денисова,

- Н.Ф. Ерыженская // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии им. И. И. Иванова. — 2013. — № 9. — С. 67-69.
5. Коленчукова, О.А. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом / О.А. Коленчукова, А.А. Савченко, С.В. Смирнова // Медицинская иммунология. — 2010. — Т. 12. — № 4-5. — С. 437-440.
 6. Лукашов, М.И. Изменение свойств эритроцитов при физических нагрузках / М.И. Лукашов, И.Л. Бровкина // Человек и его здоровье. — Курск. — 1999. — Вып. 2. — С. 212-215.
 7. Маевский, Е.И. Метаболическое обоснование применения сукцинатсодержащих композиций для поддержания высокой функциональной активности организма / Е. Маевский, А. Васильева, Е. Гришина, М. Учитель, Л. Богданова, М. Кожурин // Cardiometry. — 2020. — Вып. 16. — С. 15-25.
 8. Надольник, Л.И. Стресс и щитовидная железа / Л.И. Надольник // Биомедицинская химия. — 2010. — Т. 56. — Вып. 4. — С. 443-456.
 9. Петрова, И.В. Влияние производных пиридина на фагоцитарную активность крови при физических нагрузках / И.В. Петрова, В.А. Катаев, С.А. Мещерякова, Р.П. Фархутдинов // Медицинский вестник Башкортостана. — 2014. — Т. 9. — № 6. — С. 67-69.
 10. Прокопенко, Л.Г. Метаболическая иммуномодуляция / Л.Г. Прокопенко, А.И. Конопля. — Курск, 2000. — 298 с.
3. Gracheva T.A., Sovershenstvovanie xemilyuminescentnogo metoda issledovaniya funkcional'noj aktivnosti fagocitiruyushhix kletok [Improvement of the chemiluminescent method for studying the functional activity of phagocytic cells] Klinicheskaya laboratornaya diagnostika, 2008, No. 2, pp. 54-55.
 4. Evglevsky A.A., Ryzhkova G.F., Evglevskaya E.P., Vanina N.V., Mikhailova I.V., Denisova A.V., Yeryzhenskaya N.F. Biologicheskaya rol' i metabolicheskaya aktivnost' yantarnoj kisloty [Biological role and metabolic activity of succinic acid], Bulletin of the I.I. Ivanov Kursk State Agricultural Academy, 2013, No. 9, pp. 67-69.
 5. Kolenchukova O.A., Savchenko A.A., Smirnova S.V., Osobennosti lyuminol- i lyucigenin-zavisimoy xemilyuminescencii nejtrofil'ny'x granulocitov u bol'ny'x xronicheskim rinosinusitom [Features of luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophil granulocytes in patients with chronic rhinosinusitis], Medicinskaya immunologiya, 2010, Vol. 12, No. 4-5, pp. 437-440.
 6. Lukashov M.I., Brovkina I.L., Izmenenie svojstv e'ritrocitov pri fizicheskix nagruzkax [Changes in the properties of red blood cells during physical exertion], Chelovek i ego zdorov'e, Kursk, 1999, Is. 2, pp. 212-215.
 7. Maevsky E.I., Vasilyeva A., Grishina E., Uchitel M., Bogdanova L., Kozhurin M., Metabolicheskoe obosnovanie primeneniya sukcinatsoverzhashhix kompozicij dlya podderzhaniya vy'sokoj funkcional'noj aktivnosti organizma [Metabolic rationale for the use of succinate-containing compositions to maintain high functional activity of the body], Cardiometry, 2020, Is. 16, pp. 15-25.
 8. Nadol'nik L.I., Stress i shhitovidnaya zheleza [Stress and thyroid] Biomedicinskaya ximiya, 2010, Vol. 56, Is. 4, pp. 443-456.
 9. Petrova I.V., Kataev V.A., Meshcheryakova S.A., Farxutdinov R.R., Vliyanie proizvodny'x piridina na fagocitarnuyu aktivnost' krovi pri fizicheskix nagruzkax [The effect of pyridine derivatives on blood phagocytic activity during exercise], Medicinskij vestnik Bashkortostana, 2014, Vol. 9, No. 6, pp. 67-69.
 10. Prokopenko L.G., Konoplya A.I., Metabolicheskaya immunomodulyaciya [Metabolic immunomodulation], Kursk, 2000, 298 p.

References

Сегодня в столичных ветклиниках оказывается более 180 услуг

10 марта Государственной ветеринарной службе Москвы исполнилось 89 лет. В 1933 году в столице работали 10 ветеринарных лечебниц и одна центральная ветеринарно-пищевая лаборатория. Сегодня в Москве работают 26 государственных лечебниц и 11 спецавтомобилей ветеринарной помощи. Ежегодно специалисты в городских клиниках проводят более 385 тысяч приемов, а услугой вызова врача на дом пользуются порядка 3600 москвичей. За последние пять лет в ветлечебницах появилось более 170 единиц нового оборудования. Сегодня в городской сети ветклиник оказывается более 180 услуг. Ежегодно в Москве вакцинируют около 470 тысяч домашних животных. Для удобства жителей города каждый год организуют более 2300 временных прививочных пунктов, в том числе и на выгульных площадках.



Уже более трех лет у столичных владельцев питомцев есть возможность записывать своих любимцев к врачу онлайн на портале mos.ru и через приложение «Госуслуги Москвы».

Более трех лет назад в Москве заработала ветеринарная автоматизированная система (ВетАС). Она позволяет регистрировать питомцев, вести их амбулаторные карты и фиксировать информацию о сделанных прививках в электронном виде.

Кроме того, больше года на mos.ru работает сервис «Поиск найденных и потерявшихся животных». Данный сервис — это совместный проект столичного Департамента информационных технологий и Комитета ветеринарии города Москвы. В прошлом году он был отмечен наградой в рамках агровыставки «Золотая осень», а также стал финалистом международной премии WSIS Prizes.

<https://www.mos.ru/news/item/103457073/>