

ИЗМЕНЕНИЯ В ПОВЕДЕНИИ И БИОХИМИЧЕСКОЙ КАРТИНЕ КРОВИ У МЫШЕЙ, ПОДВЕРГНУТЫХ ОСТРОМУ КОМБИНИРОВАННОМУ СТРЕССУ КРОТКОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

И.В. Мухина, д-р биол. наук, профессор

К.Н. Конторщикова, д-р биол. наук, профессор

И.Г. Стельникова, д-р мед. наук, профессор

Л. Г. Никонова, д-р мед. наук, доцент

В.Е. Савельев, канд. мед. наук

Н.В. Сгибнева, канд. биол. наук

Д.М. Кузьмина, мл. научный сотрудник

Е.Р. Эрастов, д-р мед. наук, доцент

В.А. Шарова, студент

О.М. Матясова, студент

А.А. Малиновкина, студент

И.А. Корнилова, студент

М.М. Палкин, студент

Приволжский исследовательский медицинский университет
(Россия, г. Нижний Новгород)

DOI: 10.24411/2500-1000-2020-10204

Аннотация. Работа проведена на 20 нелинейных мышах-самцах, которым моделировали острый комбинированный стресс путем сочетания трех факторов – иммобилизации, шума и резкого света. До и после стресса животных тестировали при помощи двух классических нейробиологических методик – «открытого поля» и «принудительного плавания». После стресса брали кровь для определения конечных продуктов перекисного окисления липидов. Обнаружены значительные изменения как в поведенческих реакциях, так и в биохимической картине крови.

Ключевые слова: острый комбинированный стресс; «открытое поле»; «принудительное плавание»; перекисное окисление липидов.

Одной из особенностей современной общественной ситуации является резкое увеличение не только количества стрессовых нагрузок, но и их качественной составляющей. Поэтому изучение многофакторного комбинированного стресса особенно привлекает исследователей [1]. У абсолютного большинства особей острый комбинированный стресс (ОКС) приводит к тревоге и депрессии, о коморбидности которых свидетельствуют многочисленные как отечественные, так и зарубежные источники [2].

Цель исследования состояла в изучении поведенческих реакций и состояния периферической крови отдельных животных, связанных с воздействием ОКС.

Материал и методы. Работа проведена на 20 нелинейных мышах-самцах, средний вес которых составил 25-30 г. Все живот-

ные находились в стандартных условиях вивария и имели постоянный доступ к воде и пище. 10 животных были интактными. Оставшимся 10 животным моделировали ОКС путем сочетания трех факторов – иммобилизации, шума и резкого света. Иммобилизацию осуществляли в течение двух часов путем помещения каждого животного в специальный фалькон объемом в 50 мл с отверстием на дне. Первый час иммобилизацию сочетали с сильным звуком мощностью в 120 дБ. Второй час воздействовали ярким светом мощностью в 60 Вт. Во время эксперимента зарегистрирована смерть одной мыши (животное 18). До эксперимента и после него проводили классические нейробиологические тесты, позволяющие судить о поведенческой реакции животных – «Открытое поле» (ОП) и «Принудительное плавание» (ПП). Вре-

мя каждого теста составило 5 минут. На 11 день после стресса животным брали кровь для дальнейшего определения концентраций продуктов перекисного окисления липидов – начальных диеновых и триеновых конъюгатов (ДК и ТК) и конечных оснований Шиффа (ОШ) спектрофотометрическим методом в гептан-изопропанольных фракциях по методу И.А. Волчегорского [3]. Результаты представлены в относительных единицах. Исследование проводили на основании Директивы Европейского Сообщества 86 – 609 от 24 ноября 1986 г. Результаты обрабатывали при помощи специально составленной компьютерной программы.

Результаты исследования и их обсуждение. Тест ОП применяется с 1934 года.

Он является одним из классических нейробиологических тестов и позволяет оценивать реакции, связанные с индивидуальным и общественным поведением различных экспериментальных животных в ответ на многочисленные факторы суперсистемы [4]. До ОКС эти тесты показали значительные колебания ключевых показателей, свидетельствующих о стрессоустойчивости. Характерно, что и в предыдущих исследованиях, выполненных на экспериментальных мышах-самцах линии C57BL/6, мы также наблюдали очень большой разброс этих показателей [5]. Так, количество выходов в центр поля у различных мышей колебалось в течение тестирования от 1 до 18, а время нахождения в центре – от 0 до 80,5 с.

Таблица 1. Количество поведенческих актов мышей до и после ОКС в тесте «Открытое поле» (мыши, номера которых отмечены знаком*, не подвергались ОКС)

№ жив.	Число выходов в центр		Число актов груминга		Число стоек		Число замраний		Число принохи-ваний		Число дефекаций	
	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС
1*	5	6	2	3	40	32	0	1	32	33	66	56/1м
2*	18	0	1	4	45	19	0	0	42	29	36	106
3*	12	11	5	3	46	39	0	0	38	36	36	86/1м
4*	17	5	6	2	33	3	2	4	34	30	16	46/1м
5*	0	5	3	13	9	0	1	2	31	17	56	46
6*	6	4	1	1	42	18	1	1	36	17	26/1м	96
7*	3	14	2	3	42	23	0	1	35	28	16	116
8*	12	10	3	6	32	35	0	0	39	34	06	76/2м
9*	4	12	3	3	8	25	4	3	21	39	06	36
10*	1	7	4	4	19	32	1	2	13	30	16	36/1м
11	0	6	3	1	22	42	1	0	30	39	46	56
12	0	0	4	2	14	18	3	4	16	30	26/1м	96
13	7	11	5	3	49	46	0	1	36	34	86	76
14	1	6	2	4	28	30	2	4	32	39	26	116
15	7	4	4	6	45	13	0	2	34	21	26/1м	76/1м
16	9	16	3	4	31	36	2	0	32	27	56	106/2м
17	5	13	2	2	33	49	4	5	18	27	56/2м	96/1м
18	0	-	1	-	29	-	2	-	12	-	1м	-
19	15	14	3	2	45	43	1	3	35	24	36/1м	146/1м
20	0	11	4	7	16	13	5	5	20	33	2м	46/2м

Значительно увеличивается после ОКС число дефекаций. Большинство исследователей оценивают увеличение уринаций и дефекаций как состояние неустойчивости вегетативной нервной системы, свидетельствующее о психоэмоциональном напряжении [6]. Более эмоциональными считаются животные, которые меньше передвигаются и у которых больше дефекаций в

тесте ОП, чем те, которые много передвигаются, но имеют низкий уровень дефекации. Так, только у животного 13 число дефекаций после ОКС уменьшилось на одну, у всех же остальных их количество увеличилось от 1 до 11 (табл. 1).

Число актов груминга до ОКС принимало значения от 1 до 13, а общее время – от 1,03 до 142,0 с (табл. 1, 2). Общее время

груминга после ОКС уменьшилось только у двух из десяти экспериментальных особей. У всех остальных мы обнаружили увеличение этого показателя. Так, у животного 15 он увеличился в 3,7 раза, у животного 16 – в 4,35 раза, у животного 17 – в 2,24 раза, у животного 20 – в 3,13 раз. Несмотря на то, что в настоящее время нет общепринятой трактовки такого сложного рефлекторного акта высших животных, которое описано под названием «груминг», тем не менее, абсолютное большинство исследователей трактует груминг

как форму собственно смещенной активности, которая уменьшает психическое напряжение и, таким образом, напрямую свидетельствует о тревожности животного [7].

Метод ПП, известный в науке с 1977 года, оказался наиболее удобным для определения изначального уровня тревожности. Были обнаружены большие колебания показателей времени поведенческих актов мышей как до ОКС, так и после него (табл. 3).

Таблица 2. Время поведенческих актов мышей до и после ОКС в тесте «Открытое поле» (мыши, номера которых отмечены знаком*, не подвергались ОКС)

№ жив.	Время нахождения в центре, с		Общее время груминга, с		Общее время стойки, с		Общее время замирания, с		Общее время приюхивания, с	
	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС
1*	18,44	5,68	13,07	20,81	55,94	52,87	0	0,84	59,1	68,94
2*	16,75	0	4,97	41,25	58,14	24,68	0	0	47,99	106,95
3*	20,25	37,37	10,02	12,37	77,41	79,32	0	0	73,54	75,41
4*	36	30,56	18,76	15,05	63,67	4,32	1,69	7,41	60,36	168
5*	80,5	13,44	11,95	142,08	11,44	0	1,03	2,3	144,54	104,83
6*	0,69	3,08	11,1	14,44	89,88	34,85	1,64	0,84	58,56	96,5
7*	5,81	28,6	1,03	30,57	90,59	49,63	0	0,61	64,12	84,08
8*	24,31	24,72	8,49	28,9	71,24	60,35	0	0	63,84	59,86
9*	6,48	11,25	52,64	28,23	11,57	31,4	5,54	4,96	65,14	89,72
10*	3,69	9,06	120,21	42,9	32,53	53,8	1,83	7,65	24,57	65,44
11	0	18,87	4,55	6,7	27,82	68,6	3,15	0	62,02	68,01
12	0	0	25,07	19,74	26,31	42,87	10,28	8,76	56,08	113
13	4,19	29,86	21,39	10,79	74,47	85	0	2,48	53,1	61,75
14	0,25	7,8	22,59	26,16	39,89	42,23	6,98	5,21	59,32	76,59
15	8,68	11,52	29,43	108,98	75,87	27,87	0	2,34	55,66	63,21
16	18,81	30,96	7,78	33,89	57,05	85,13	3,1	0	50,91	54,68
17	20,05	4,62	3,51	7,87	73,7	88,76	5,44	7,69	35,85	50,52
18	0	-	5,16	-	53,33	-	2,91	-	23,21	-
19	28,55	14,69	10,23	13,88	94,97	79,8	0,61	4,56	49,47	52,45
20	0	6,37	14,05	44,03	47,84	35,8	9,3	8,58	42,84	75,41

Как и в тесте ОП, почти у всех мышей (кроме животного 17) количество дефекаций увеличилось. Особенно значительно возросло их число у животного 16. Характерно, что у этой мыши обнаружено увеличение в два раза числа дефекаций и в предыдущем поведенческом тесте (табл. 1, 3). У большинства исследуемых особей увеличилось также время пассивного плавания (дрейфования), классический показатель состояния «поведенческого отчаяния» [8]. Общее время карабкания, свидетельствующее о стенических проявлениях

животного и попытке изменить ситуацию при помощи собственных усилий, резко уменьшается у каждого животного после ОКС (табл. 3).

Известно, что при любом стрессе активируются процессы свободнорадикального окисления, причиной которых являются воздействия активных форм кислорода. При значительном и запредельном напряжении защитных систем клеток количество этих форм возрастает настолько, что вызывает необратимые изменения мембранных структур. Молекулярные продук-

ты перекисного окисления липидов (ПОЛ) в настоящее время принято подразделять на первичные (гидроперекиси, диеновые конъюгаты (ДК), эндоперекиси), вторич-

ные (малоновый диальдегид, триеновые конъюгаты (ТК)), и конечные, полимерные соединения – основания Шиффа (ОШ) [9].

Таблица 3. Характеристика поведенческих актов мышей до и после ОКС в тесте «Принудительное плавание» (мыши, номера которых отмечены знаком*, не подвергались ОКС)

№ животного	Общее время активного плавания, с		Общее время пассивного плавания (дрейфования), с		Общее время карабкания, с		Число дефекаций	
	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС	До ОКС	После ОКС
1*	133,39	114,9	138,11	170,65	28,5	14,45	11	10
2*	189	174,25	85	113,75	26	12	2	6
3*	140	127,02	152,5	163,28	7,5	9,7	4	6
4*	101	133,24	170	156,78	29	9,98	0	0
5*	290	195,74	7	98,7	3	5,56	2	4
6*	117,5	119,1	154,5	168,9	28	12	4	8
7*	119	34,51	168	264,88	13	0,61	3	1
8*	260	156,7	10,5	143,3	29,5	0	1	7
9*	192,5	274,28	96	20,35	11,5	5,37	0	2
10*	142,5	56,66	133,5	234,03	24	9,31	0	7
11	93,73	78,3	157,3	195,9	48,97	25,8	0	3
12	120,06	49,01	169,39	250,99	10,55	0	2	6
13	98,22	49,2	142,48	237,82	59,3	12,98	5	8
14	175,53	202,37	123,63	97,63	0,84	0	1	2
15	63,73	123,84	165,08	158,18	71,19	17,98	6	7
16	153,7	130,63	88,07	112,57	58,23	56,8	1	10
17	83,85	130,96	188,5	162,61	27,65	6,43	9	8
18	114,77	-	159,04	-	26,19	-	5	-
19	161,16	130,82	130,5	167,96	8,34	1,22	0	7
20	80,43	60,15	191,5	224,28	28,07	15,57	0	1

Стрессорные механизмы, которые развиваются у экспериментальных животных, сопровождаются разбалансировкой одной из важнейших гомеостатических систем организма – баланса свободно-радикальных реакций и антиоксидантной системы защиты. Окислительный стресс и возникающее в результате этого ПОЛ участвуют в многочисленных патологических состояниях, включая воспаление, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания и рак, вызывая резкое нарушение мембранной организации [10]. Генетически детерминированный жесткий контроль со стороны антиоксидантной системы защиты за каждой из многочисленных стадий липопероксидации позволяют исследователям,

работающим во многих смежных областях биологии и экспериментальной медицины, трактовать показатели ПОЛ в качестве неспецифического диагностического критерия тяжести стресса. В результате проведенного исследования после ОКС показатели ПОЛ, как начальные, так и конечные, статистически значительно повышались (табл. 4). Коэффициент липопероксидации ОШ/ ДК+ ТК демонстрирует направленность процесса ПОЛ [11]. Отсутствие статистически значимых изменений в этом показателе свидетельствует об активном свободнорадикальном процессе на всех этапах с одновременным образованием и начальными, и конечными продуктами ПОЛ.

Таблица 4. Количество первичных и вторичных продуктов ПОЛ в крови интактных и экспериментальных мышей (относительные единицы)

Продукты ПОЛ	Интактные животные	Экспериментальные животные
Диеновые конъюгаты	1,23 + 0,04	1,73 + 0,26*
Триеновые конъюгаты	1,12 + 0,03	1,35 + 0,11*
Основания Шиффа	509,07 + 22,15	747,45 + 43,28*
ОШ/ДК + ТК Основания Шиффа/Диеновые конъюгаты + Триеновые конъюгаты	216,62 + 16,50	242,67 + 19,80

*($p < 0,05$)

Таким образом, ОКС, представляющий собой сочетание иммобилизации с воздействием резкого шума и яркого света, приводит большинство мышей к состоянию «поведенческого отчаяния» и уменьшению стенических реакций, связанных с попытками изменить ситуацию посредством собственных усилий, к резкому повышению эмоционально-поведенческой реак-

тивности, в то время как выраженного изменения исследовательской активности у животных отмечено не было. Значительное возрастание в крови мышей после ОКС первичных и конечных продуктов ПОЛ свидетельствует о существенных изменениях физико-химических свойств клеточных мембран.

Библиографический список

1. Дерхо М.А., Серода Т. И., Хижнева О. А. Особенности стресс-реакции организма мышей при комбинированном воздействии сульфата кадмия и вибрации // Евразийский союз ученых. – 2014. – № 6-4 (6). – С. 101-103.
2. *Interaction of depression and anxiety in the development of mixed anxiety. Depression disorder. Experimental studies of the mechanisms of comorbidity (review)* / A.G. Galyamina, I.L. Kovalenko, D.A. Smagin et al. // *Neuroscience and behavioral physiology*. – 2017. – P. 1-15.
3. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Ярвинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // *Вопросы медицинской химии*. – 1989. – №1. – С. 127-131.
4. Raikhan B.R., Rauan M.S., Karlygash A.T. The study influence of cigarette smoke by using laboratory animals in behavioral test "open field" // *Journal of global pharma technology*. – 2017. – V. 9. – № 11. – P. 199-203.
5. Особенности эмоционально-поведенческой реактивности отдельных животных при воздействии острого комбинированного стресса короткой продолжительности И.В Мухина, И.Г. Стельникова, Л.Г. Никонова и др. // *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*. – 2019. – №11-2. – С. 51-56.
6. Иммунологические клеточно-молекулярные маркеры периферической крови молодых мышей линии а53т, генетически предрасположенных к болезни Паркинсона / Г. Идова, Е. Альперина, С. Жанаева и др. // *Медицинский академический журнал*. – 2019. – Т. 19. – С. 80-81.
7. *Inhibition of self-grooming induced by sleep restriction in dam rats* / G.N. Pires, T.A. Alvarenga, I.O. Maia et al. // *Indian Journal of Medical Research*. – 2012. – Vol. 136 (6). – P. 1025-1055.
8. *Individual differences in behavioural despair predict brain gsk-3beta expression in mice: the power of a modified swim test* / T. Strekalova, N. Markova, H.M. Steinbusch // *Neural plasticity*. – 2016. – V. 2016. P. 5098591.
9. *Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови* / А.В. Дерюгина, А.С. Корягин, С.В. Копылова, и др. – Н. Новгород: Издательство Нижегородского государственного университета, 2010. – 25 с.

10. Niki E. *Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects // Free radical biology and medicine.* – 2009. – V. 47. – №5. – P. 469-484.

11. *Конторщикова К.Н.* Перекисное окисление липидов в норме и патологии. – Н. Новгород, 2000. – 23 с.

CHANGES IN THE BEHAVIOR AND BIOCHEMICAL PICTURE OF BLOOD IN MICE EXPOSED TO ACUTE COMBINED STRESS FOR A SHORT DURATION

I.V. Mukhina, *Doctor of Biological Sciences, Professor*

K.N. Kontorshchikova, *Doctor of Biological Sciences, Professor*

I.G. Stelnikova, *Doctor of Medical Sciences, Professor*

L. G. Nikonova, *Doctor of Medical Sciences, Associate Professor*

V.E. Saveliev, *Candidate of Medical Sciences*

N.V. Sgibneva, *Candidate of Biological Sciences*

D.M. Kuzmina, *Junior Researcher*

E.R. Erastov, *Doctor of Medical Sciences, Associate Professor*

V.A. Sharova, *Student*

O.M. Matyasova, *Student*

A.A. Malinovkina, *Student*

I.A. Kornilova, *Student*

M.M. Palkin, *Student*

Volga Research Medical University

(Russia, Nizhny Novgorod)

Abstract. *The work was carried out on 20 non-linear male mice, which were simulated by acute combined stress by combining three factors - immobilization, noise and harsh light. Before and after stress, the animals were tested using two classic neurobiological techniques - the "open field" and "forced swimming." After stress, blood was taken to determine the final products of lipid peroxidation. Significant changes were found both in behavioral reactions and in the biochemical blood picture.*

Keywords: *acute combined stress; "open field"; "Forced swimming"; lipid peroxidation.*