

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ
ФИЗИЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО СТРЕССА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Общая биология

Биологического факультета

Ващенко Татьяны Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

А. А. Галицкая

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

С. А. Коннова

Саратов 2020

Актуальность работы. Жизнь человека в современном обществе характеризуется значительными стрессовыми воздействиями со стороны окружающего мира. Это и перенаселение современных мегаполисов, и высокая интенсивность труда, нарушение режима питания и сбалансированной диеты и т.д. Социально-психологические, физические и химические воздействия носят постоянный характер и зачастую действуют одновременно, что усиливает их губительное действие.

Среди химических факторов стресса следует отметить в первую очередь длительную химическую интоксикацию, вызванную постоянным поступлением в организм человека с пищей и водой различных токсических соединений. Особое значение многие исследователи придают нитритам и соединениям аминной природы, так как они широко распространены и являются высокотоксичными веществами, представляющими опасность для всех живых существ.

Среди физических факторов, действующих на человека в современном мегаполисе, следует отметить нарушение светового режима, вызванное длительным использованием искусственного освещения, многочисленных приборов и устройств со светящимися экранами и т.д. Все это приводит к нарушению режима отдыха и сна. При длительных нарушениях сна развивается хронический стресс, результатом которого является развитие патологических процессов тех или иных физиологических систем.

Цель работы. Определить влияние хронического физического и химического стресса на некоторые биохимические показатели сыворотки крови лабораторных животных, связанные с приспособлением к интоксикации.

Задачи исследования:

1. Оценить изменение показателей интенсивности окислительного стресса в сыворотке крови лабораторных животных при физическом, химическом стрессе, а также при их сочетанном воздействии.

2. Определить влияние физического, химического стрессов и их сочетания на изменение активности анаэробного гликолиза.

Научная новизна и научная значимость работы: впервые было показано влияние сочетанного действия длительной химической интоксикации нитритами и аминами и нарушения светового режима как стрессовых факторов на интенсивность окислительного стресса и метаболизм углеводов в организме. Полученные данные носят прогностический характер и могут быть использованы для дальнейшего анализа клинической картины, которая развивается в результате хронического стресса, вызванного физическими и химическими стресс- факторами.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Длительная химическая интоксикация и темновая депривация приводят к активации окислительного стресса и нарушению углеводного обмена.

2 Сочетание физического и химического стресса приближает показатели окислительного стресса и углеводного обмена к контрольным значениям, что свидетельствует об активации защитных механизмов и адаптации к воздействию.

Основное содержание работы

Структура магистерской работы. Работа изложена на 61 странице и состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя следующие главы: обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение. Список использованных источников содержит 51 публикацию.

В обзоре литературы описаны следующие вопросы: азотосодержащие соединения (нитриты, нитраты, амины) как экотоксиканты; перекисное окисление липидов как результат свободнорадикального окисления; использование показателей интенсивности перекисного окисления для оценки патологических состояний; изменение содержания оксида азота (NO)

при патологии; молочная кислота как показатель патологических состояний, изменение показателей активности процессов перекисного окисления и обмена углеводов при физическом и химическом стрессе.

В разделе Материалы и методы описаны структура эксперимента и основные методы, использованные при выполнении работы. Эксперименты проводили в два этапа. Первый этап эксперимента длился в течение 9 месяцев в период с января по октябрь 2016 года. Животным, входившим в опытную группу, моделировали длительный химический стресс путем хронической интоксикации нитритом и амином. Второй этап эксперимента проводили на самцах белых мышей BALB/c в течение 7 месяцев. В этой части эксперимента изучали влияние на показатели сыворотки крови физического стресса и сочетания физического и химического стрессов. Физический стресс моделировали нарушением светового режима, химический – хронической интоксикацией нитритом и амином. В работе использовали стандартные наборы для определения концентрации ТБК- активных продуктов (ТБКП), молочной кислоты и NO.

Все измерения проводили не менее чем в пяти биологических и трех аналитических повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007. Полученные результаты представлены в виде средних значений и их погрешностей для уровня достоверности $p \leq 0,05$ по t- критерию Стьюдента.

На начальной стадии исследования мы определили концентрацию ТБК- активных продуктов как значимого показателя интенсивности процессов перекисного окисления. Перекисное окисление липидов является последствием окислительного стресса и приводит к образованию большого количества различных продуктов, различающихся по химической структуре, биологической активности и токсичности.

При содержании животных в стандартных условиях концентрация ТБК- активных продуктов в сыворотке крови контрольной группы составила $0,78 \pm$

0,08 мкмоль/л, при введении в рацион животных *m* - толуидина и 0,2 % раствора нитрита натрия содержание ТБКП повысилось до $2,58 \pm 0,17$ мкмоль/л. Таким образом, нами было установлено достоверное повышение концентрации ТБК- активных продуктов более чем в 3 раза.

Полученные результаты соответствуют литературным данным: развитие патологических процессов, вызванное сочетанным действием нитрита и толуидина, приводит к интенсификации окислительного стресса и, следовательно, к увеличению концентрации в сыворотке крови лабораторных животных ТБК - активных продуктов.

Далее нами было проведено определение концентрации NO, в сыворотке крови контрольной группы животных концентрация составила $9,72 \pm 2,45$ ммоль/л. При сочетанном действии нитрита и амина концентрация оксида азота (II) достоверно снизилась практически в 2 раза, и составила $4,19 \pm 0,68$ ммоль/л.

Предположительно снижение концентрации оксида азота (II) так же может быть связано с интенсификацией перекисного окисления липидов. В результате усиления ПОЛ, возрастает количество активных форм кислорода. Оксид азота(II) в свою очередь, обладая высокой реакционной способностью, вступает во взаимодействие с АФК, окисляясь при этом до нитратов или пероксинитрилов. Они в свою очередь вступают в реакцию с белками и другими биологически активными макромолекулами [1].

Во второй серии эксперимента был проведен анализ сыворотки крови лабораторных животных на содержание ТБК- активных продуктов после темновой депривации.

В результате исследования было установлено, что содержание ТБК- активных продуктов в сыворотке крови контрольной группы составило $0,732 \pm 0,043$ ммоль/л. Темновая депривация животных привела к увеличению концентрации ТБКП: она составила $1,710 \pm 0,203$ ммоль/л, что в 2,3 раза больше по сравнению с контрольной группой.

Увеличение концентрации ТБК- активных продуктов, является результатом интенсификации перекисного окисления липидов. Пребывание мышей в условиях круглосуточного освещения привело к снижению антиоксидантной защиты и иммунитета в целом [2].

На следующем этапе мы исследовали влияние длительной химической интоксикации на концентрацию в сыворотке крови молочной кислоты. Лактат часто рассматривают как важный показатель интенсивности углеводного обмена.

При определении концентрации молочной кислоты в сыворотке крови крыс, в рацион которых был введен нитрит натрия и *m*- толуидин было выявлено, что в контрольной группе концентрация молочной кислоты составила $4,92 \pm 0,35$ ммоль/л. Концентрация молочной кислоты у животных экспериментальной группы составила $4,63 \pm 0,18$ ммоль/л. Достоверной разницы не было выявлено.

Однако при выведении животных из эксперимента у некоторых особей были выявлены визуально различимые патологии желудочно- кишечного тракта, такие как опухоль пищевода, язва желудка, и опухоль печени. Мы отделили этих животных и сформировали дополнительные группы. Концентрация молочной кислоты у крыс с опухолью пищевода ($n= 3$) составила $4,92 \pm 0,35$ ммоль/л - это на 12% ниже, чем у контрольной группы. Содержание лактата у крыс с язвой желудка ($n=7$) было на 7% ниже, чем у крыс, содержащихся в стандартных условиях, и составило $4,33 \pm 0,08$ ммоль/л.

Мы предполагаем, что снижение концентрации лактата вызвано тем, что для жизнедеятельности и деления клеток злокачественных опухолей необходимо большое количество энергии. Однако из- за быстрого деления и активного роста и недостаточного кровоснабжения опухолевые клетки находятся в условиях постоянной гипоксии. Поэтому раковые клетки вынуждены перейти на анаэробный гликолиз, конечным продуктом которого является молочная кислота [3].

Противоположные результаты были получены при анализе сыворотки крови животных, у которых гистологически была подтверждена опухоль печени. Концентрация лактата в крови крыс с опухолью печени составила $6,28 \pm 0,04$ ммоль/л – это на 36% больше, чем у контрольной группы. По нашим предположениям увеличение концентрации молочной кислоты при опухоли печени, является результатом повреждения самих гепатоцитов [4].

Исследование содержания лактата в крови животных, содержащихся в условиях темновой депривации, выявило увеличение концентрации лактата в сыворотке крови животных до $3,477 \pm 0,553$ ммоль/л по сравнению с контрольными животными ($2,501 \pm 0,387$ ммоль/л). Таким образом, нарушение светового режима под действием физического стресса привело к увеличению концентрации молочной кислоты в 1,4 раза.

В ряде работ показано увеличение содержания лактата при различных видах физического стресса. Авторы объясняют этот факт тем, что моделирование различных видов физического стресса приводит к развитию в углеводном обмене лабораторных мышей сдвигов, типичных для действия стресс- факторов, а именно к активации гликолиза, что приводит к накоплению молочной кислоты в сосудистом русле [5].

Исходя из того, что действие экотоксикантов как постоянных факторов окружающей среды часто сочетается с влиянием других стрессовых факторов, представляло интерес оценить совместное влияние физического фактора (круглосуточное освещение) и химической интоксикации (нитрит натрия + толуидин) на состояние углеводного обмена в организме мышей в условиях хронического эксперимента. Было выявлено, что концентрация ТБКП в условиях длительного сочетания физического и химического стресса составила $1,285 \pm 0,203$ ммоль/л, что 1,7 раз выше контрольных значений.

Однако наибольший интерес вызывает сравнительный анализ этого показателя при действии отдельных факторов и их сочетания. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Следует отметить, что сочетание физического и химического факторов в меньшей степени влияет на накопление продуктов перекисного окисления. Таким образом, нами было выявлено, что под действием сочетанного физического и химического стресса концентрация ТБК- активных продуктов возрастает по сравнению с контролем, но по сравнению с действием отдельного физического или химического стресса уменьшается и приближается к контрольным значениям.

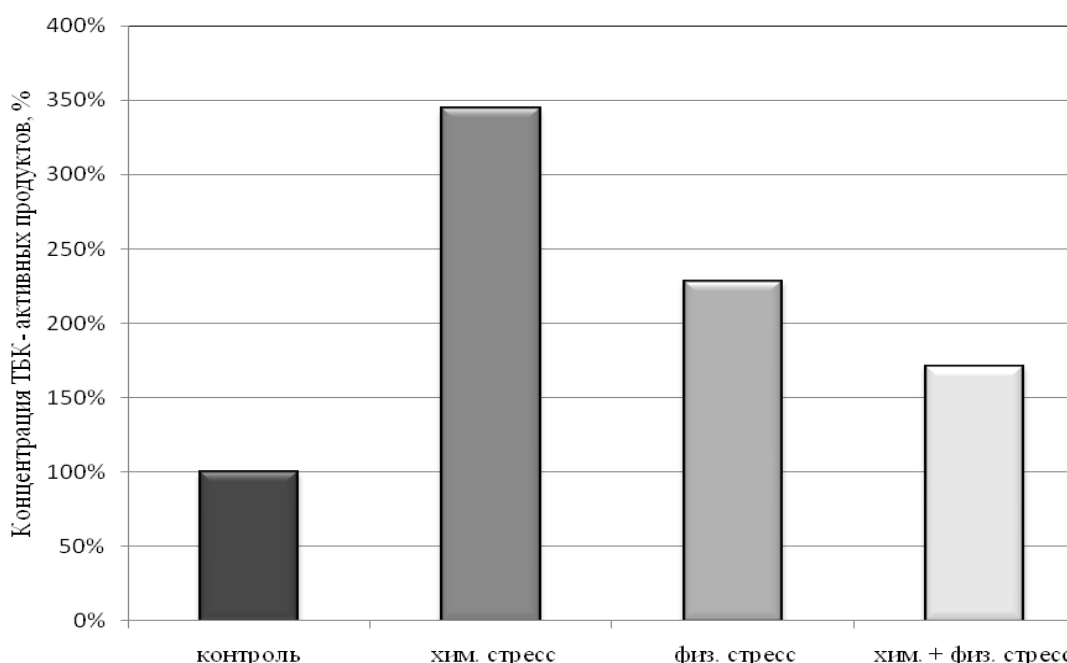


Рисунок 1- Содержание ТБК- активных продуктов в сыворотке крови мышей и крыс, подверженных физического и химического стресса, а так же их сочетанному действию.

На основании полученных данных можно высказать предположение, что длительное сочетание стрессовых факторов различной природы запускает дополнительные защитные механизмы, позволяющие организму адаптироваться к столь значительным нагрузкам [6].

Нами так же был проведен анализ на содержание молочной кислоты в сыворотке крови мышей, которые были подвержены одновременному

воздействию физического и химического стрессов. Концентрация лактата составила $3,477 \pm 0,553$ ммоль/л – это в 1,3 раза выше, чем у мышей, которых содержали в стандартных условиях и на стандартном рационе.

В результате нами было установлено, что под действием сочетанного физического и химического стресса происходило возрастание концентрации молочной кислоты. Это соответствует полученным нами данным при исследовании действия данных факторов по отдельности. Наглядно результаты представлены на рисунке 2.

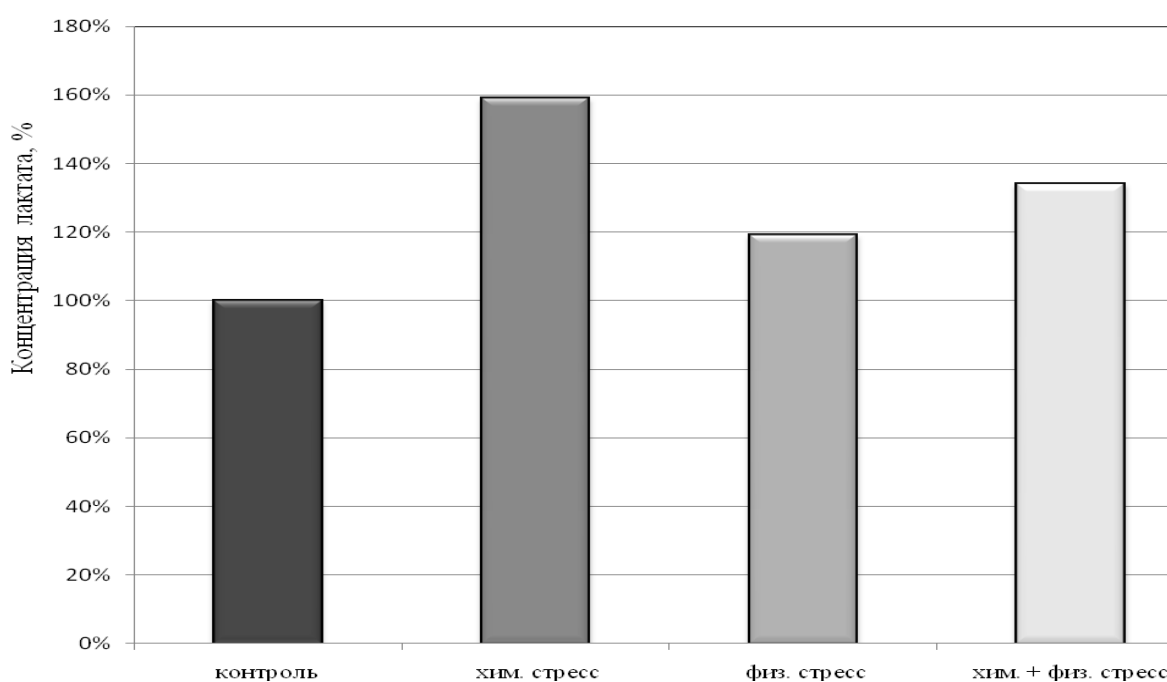


Рисунок 2- Содержание лактата в сыворотке крови мышей и крыс, подверженных физического и химического стресса, а так же их сочетанному действию.

На основании анализа литературных источников можно предположить, что увеличение концентрации молочной кислоты происходит в результате того, что длительное стрессовое воздействие приводит к нарушению метаболических процессов, которые возникают в результате нарушения сна и токсического воздействия нитрита и амина [7, 8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное пребывание организма в состоянии хронического стресса приводит к развитию патологических процессов в различных физиологических системах. В конечном итоге это может привести к гибели организма.

В данной работе было исследовано влияние длительной химической интоксикации, физического стресса в виде темновой депривации и их сочетания на такие показатели сыворотки крови лабораторных животных, как содержание ТБК- активных продуктов, молочной кислоты и оксида азота (II). Содержание ТБКП и оксида азота (II) рассматривались нами как показатели интенсивности окислительного стресса. Лактат является значимым показателем углеводного обмена.

В результате проведенных исследований было показано, что введение в рацион лабораторных животных толуидина в пищу в сочетании с присутствием нитрита в воде, приводит к повышению содержания в крови ТБК- активных продуктов, и снижению концентрации NO, и изменению концентрации молочной кислоты. Помимо этого было выявлено увеличение концентраций молочной кислоты и ТБК- активных продуктов в результате совместного действия физического и химического стресса. Однако, сочетание физического и химического стресса приводит к нормализации показателей окислительного стресса и углеводного обмена, что свидетельствует об активации защитных механизмов и адаптации к воздействию.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что длительная химическая интоксикация и темновая депривация привели к активации окислительного стресса, что подтверждается увеличением концентрации ТБК- активных продуктов в сыворотке крови лабораторных животных по сравнению с контролем. В условиях химического стресса практически в 3 раза, в условиях физического в 2,3 раза.

2. При гистологически подтвержденной опухоли печени после длительной химической интоксикации концентрация молочной кислоты возросла более чем на 36% относительно контрольной группы. Другие патологии привели к снижению величины этого показателя: при язве желудка концентрация лактата снижается на 12 %, при опухоли пищевода – на 7%.

3. Выявлено, что темновая депривация приводит к увеличению концентрации лактата в крови лабораторных животных в 1,4 раза относительно контрольной группы.

4. Сочетание физического и химического стресса приводит к нормализации показателей окислительного стресса и углеводного обмена, что свидетельствует об активации защитных механизмов и адаптации к воздействию.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.] // М.: Издательство Фирма "Слово". - 2006. - 556 с.

2. Корнякова В. В. Активация перекисного окисления липидов в печени крыс при интенсивных физических нагрузках: механизмы развития, коррекция / В. В. Корнякова, В. Д. Ковай, Е. В. Фомина // Омский научный вестник. - 2011. - №1. - С. 204 - 208.

3. Котик, А.В. Лактат в крови человека. Значение исследования. Интерпретация результатов / А. В. Котик //ООО "ЛАБИКС".- [Электронный ресурс]. URL: <https://labix.com.ua/files/1379078313.pdf> (Дата обращения 17.04.2018).

4. Overexpression of Glut- 1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma / R. Bos [et al.] // J. Clin. Oncol. - 2002. - V. 20. - P. 379-387.

5. Гидранович, А. В. Метаболическая активность гликолиза в сыворотке крови больных раком молочной железы / А. В. Гидранович // Новости хирургии. - 2008. - Т. 16, - №1. - С. 88-95.

6. Хасина, Э. И. Коррекция настойкой патринии скабиозолистной стресс - реакции мышцей на действие интенсивного шума / Э.И. Хасина // Известия научного центра Российской академии наук. - 2013. - Т. 15, - № 3. - С. 1980-1983.

7. Адаптивные реакции крыс после световых десинхронозов и физического переутомления / А. А. Гостюхина [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. - 2018. - Т. 17, - №3. - С. 22-34.

8. Нарушение обменных процессов в печени крыс под действием стресса / С. Е. Фоменко [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2013. - №2. - С. 67-70.