

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

Кафедра биофизики и биохимии

**СТРЕССОВЫЕ ФАКТОРЫ В ИНДУКЦИИ МАРКЕРОВ
ВОСПАЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ
ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 – Биология

Биологического факультета

Мустафиной Нурии Наилевны

Научный руководитель:

Зав. кафедрой

профессор, док. биол. наук _____ С. А. Коннова

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук _____ С. А. Коннова

Саратов 2020

ВВЕДЕНИЕ

Современная жизнь характеризуется чрезвычайной потребностью в адаптации человека из-за влияния быстро изменяющихся социальных и технологических условий. Изменяющиеся условия жизни служат причиной стрессов. Одной из актуальных проблем в настоящее время является постоянное воздействие различных стрессовых факторов на человека, но большинство людей не могут с ними справиться. Неспособность или неумение совладать со стрессом является основой для расстройства здоровья или, по крайней мере, ухудшения жизни в различных сферах.

В качестве причин стресса может выступать угроза либо биологической целостности организма, либо психологическому статусу человека. На этом основании выделяют две группы стрессовых состояний – физиологический и психологический стрессы. Физиологический стресс вызывают разного рода препятствия, а также сильные звуки, интенсивное освещение, повышенная температура воздуха, вибрация. Даже незначительный стресс повышает риск возникновения воспалительных реакций в организме.

Воспаление относится к фундаментальным патологическим процессам, которые составляют патофизиологическую основу большинства заболеваний человека (энцефалит, миокардит, пневмония, стоматит, грипп, дифтерия и др.). Таким образом, изучение воспаления и механизмов его развития является актуальным для понимания патогенеза многих заболеваний человека.

Цель работы - выявить развитие воспалительных процессов у мышей - самцов при хроническом стрессовом воздействии.

Для реализации цели решались следующие *задачи*:

- 1) провести хронический эксперимент воздействия на мышей – самцов стрессовых факторов как индукторов воспалительных процессов;
- 2) выявить влияние стрессовых факторов (химического стресса и светового воздействия) на развитие воспалительных процессов на основе тестирования содержания интерлейкинов в сыворотке крови и моче животных, а также активности липоксигеназы в гомогенате тканей желудка.

Структура магистерской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 81 источника, в нем рассмотрены следующие вопросы: влияние стрессовых факторов на индукцию воспалительных реакций ЖКТ лабораторных мышей; влияние ароматических аминов на организм белых мышей; воздействие круглосуточного освещения на организм белых мышей; характеристика цитокинов; интерлейкины, характеристика и роль в развитии воспалительной реакции; липоксигеназа, характеристика, роль в метаболизме.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Для проведения эксперимента в качестве объекта исследования были взяты 150 самцов мышей весом около 20 г инбредной линии BALB/c, получены из питомника РОСНИПЧИ «Микроб». Содержали животных на обычном рационе вивария со свободным доступом к воде и еде. Эксперимент проводили в течение 7 месяцев.

Экспериментальные животные были разделены методом случайного отбора на 3 группы. Группа 1 – контрольная, которую не подвергали никаким стрессовым воздействиям. Животных 2 группы подвергали круглосуточному воздействию яркого освещения с интенсивностью 800 люкс. Световой стресс также был дополнен химическим – добавлением в кормовой рацион *m*-толуидина с рыбным паштетом (учитывая плохую растворимость амина в воде) - и нитрита натрия (с водой). Животные 3 группы были подвержены только световому стрессу.

Выведение из эксперимента проводили декапитацией животных при легком эфирном наркозе. Для дальнейших исследований отбирались мышечные стенки желудка, моча из мочевого пузыря и сыворотка крови.

После декапитации кровь отбирали в пробирки (с гепарином), центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут, отбирали надосадочную жидкость (сыворотку), дополнительную очистку проводили

центрифугированием при 14000 об/мин (на центрифуге Эппендорф) в течение 10 минут.

Пунктированием мочевого пузыря отбирали мочу, переносили в индивидуальные пробирки.

Желудки промывали дистиллированной водой и замораживали в индивидуальных стерильных пробирках.

В сыворотке крови и моче животных определяли содержание интерлейкинов по методу ТИФА, используя наборы реагентов «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» и «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ»; активность липоксигеназы в гомогенате желудка лабораторных животных с помощью спектрофотометрического метода.

Результаты и их обсуждение. В эксперименте для исследования влияния стрессовых факторов на развитие воспалительных процессов, возникающих в организме мышей, были использованы толуидин в пище и нитриты в воде, которые в процессе совместного действия в ЖКТ образуют сильные канцерогены. Клетки с животными круглосуточно освещались на протяжении длительного времени.

Для доказательства стрессового воздействия названных выше факторов на организм животных были исследованы изменения показателей состояния системы поддержания гомеостаза внутренней среды животных. Поэтому по окончании эксперимента было произведено определение содержания интерлейкинов в сыворотке крови и моче мышей контрольных и опытных групп. Исследования показали, что в результате воздействия комплекса факторов -продолжительного химического и светового стрессовых воздействий, содержание ИЛ-6 в сыворотке крови самцов белых мышей инбредной линии BALB/c достоверно возрастает. Полученные данные представлены на рисунке 1 в виде гистограммы.

Воздействие химического и светового стресса (группа 2) приводит к увеличению содержания ИЛ-6 на 43,6 %, а действие света (круглосуточно) (группа 3) – на 89,9 % по сравнению с контролем. Достоверные различия по

этому показателю выявлены и между опытными группами – второй и третьей на 32,1 %. Полученные данные указывают на развитие воспалительной реакции у животных при хроническом воздействии в целом щадящих стрессовых факторов.

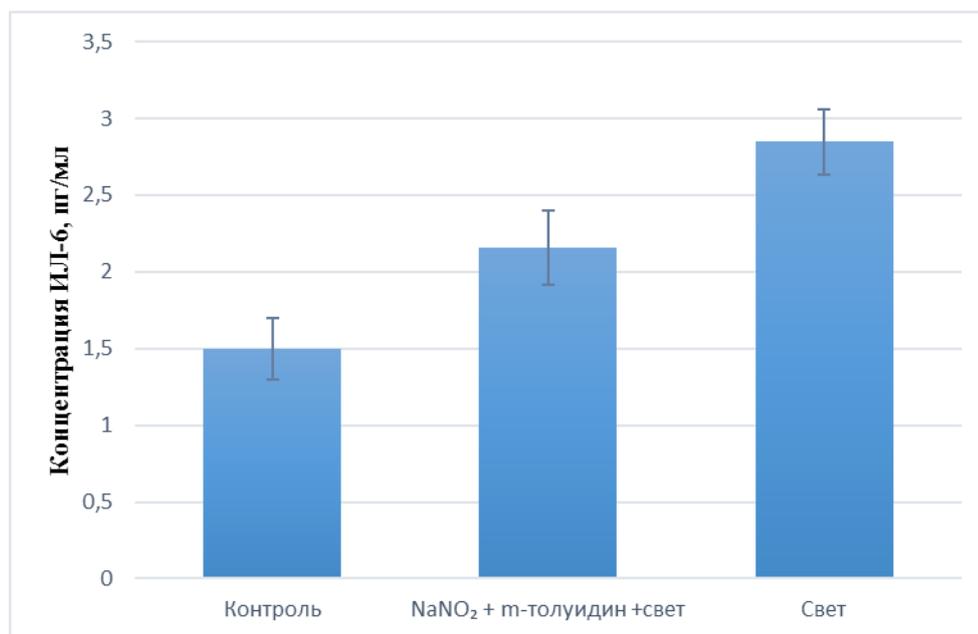


Рисунок 1 – Концентрация ИЛ-6 в образцах сыворотки крови мышей в нормальных условиях содержания и при хроническом воздействии стрессовых факторов.

Учитывая, что метод ТИФА в используемой нами комплектации позволяет проводить анализы содержания ИЛ в моче, были выполнены и эти исследования. Для человека изучение ИЛ в моче является неинвазивным анализом и, возможно, предпочтительным при исследованиях уровня активации реакции воспаления. Для мышей этот показатель мало изучен из-за меньшей доступности материала исследования неинвазивным путем. Поэтому проведение анализа мочи было интересно и с точки зрения выявления корреляции этого показателя в крови и моче.

Результаты анализов приведены на рисунке 2. Исследования мочи животных показали, что воздействие комплекса стрессовых факторов приводит к увеличению активности ИЛ-6 на 41,5 % (группа 2), а только

светового стресса (группа 3) – на 17,7 % по сравнению с контролем. Это также указывает на наличие воспаления в организме. Однако в моче распределение уровня индуцирования продукции ИЛ-6 по группам иное, по сравнению с кровью – показатель в группе 2 выше такового в группе 3 на 20,3%.

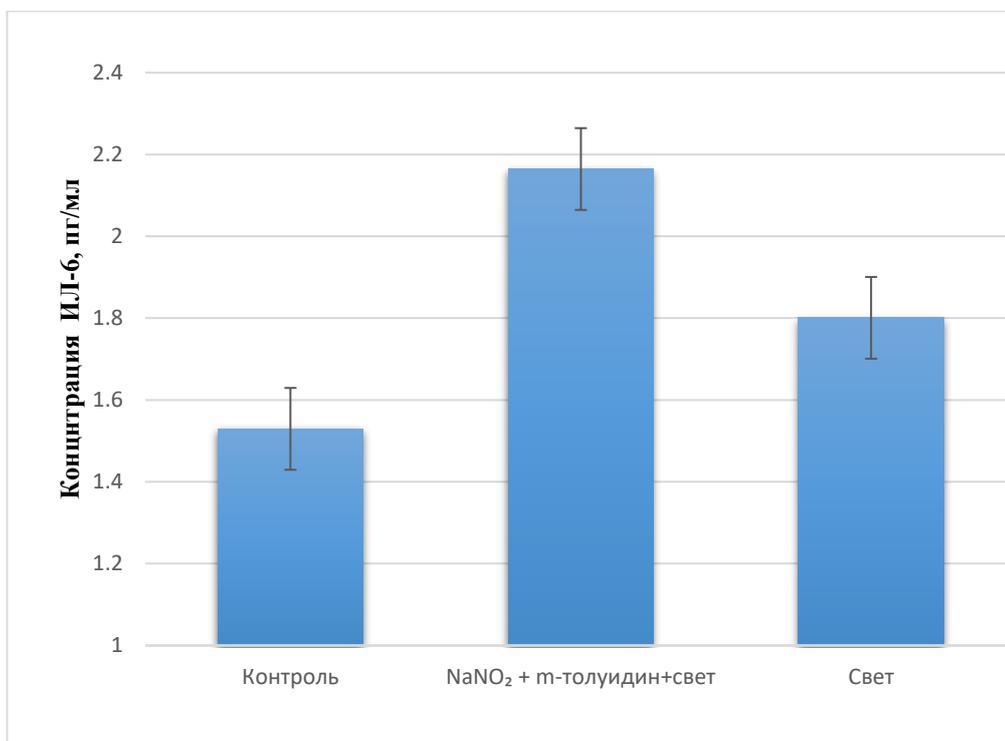


Рисунок 2 – Концентрация ИЛ-6 в образцах мочи мышей в нормальных условиях содержания и при хроническом воздействии стрессовых факторов.

Важным показателем как острых, так и хронических воспалительных состояний, кроме ИЛ-6, является и уровень индуцирования ИЛ-8 в биологических жидкостях. ИЛ-8 – является ярким представителем класса хемокинов, способствующих активации респираторного взрыва, усиливающего бактерицидные свойства нейтрофилов. На рисунке 3 представлено изменение концентрации ИЛ-8 в образцах сыворотки крови при воздействии стрессовых факторов. Показано, что действие комплекса стрессовых факторов не приводило к увеличению содержания ИЛ-8 у животных второй группы, но у животных 3 группы, подвергавшихся

световому стрессу, концентрация ИЛ-8 в крови увеличивалась более чем в 7 раз по сравнению с контролем.

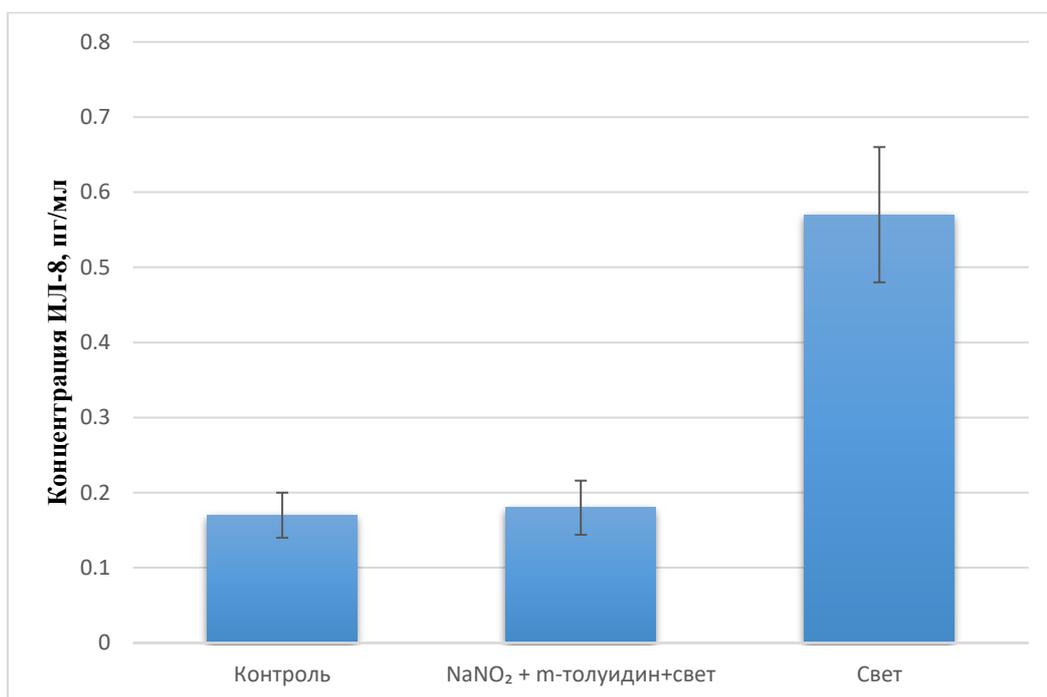


Рисунок 3 – Концентрация ИЛ-8 в образцах сыворотки крови мышей в нормальных условиях содержания и при хроническом воздействии стрессовых факторов.

Изменение содержания ИЛ-8 в образцах мочи мышей представлено на рисунке 4. Хронический стресс (химическое и световое воздействие) привело к увеличению содержания ИЛ-8 в моче на 154,5 % (в 2,6 раза) по сравнению с контрольной группой. Что касается 3 группы, где было использовано только световое воздействие, к сожалению, не удалось собрать достаточного количества образцов для получения статистически достоверного результата исследований.

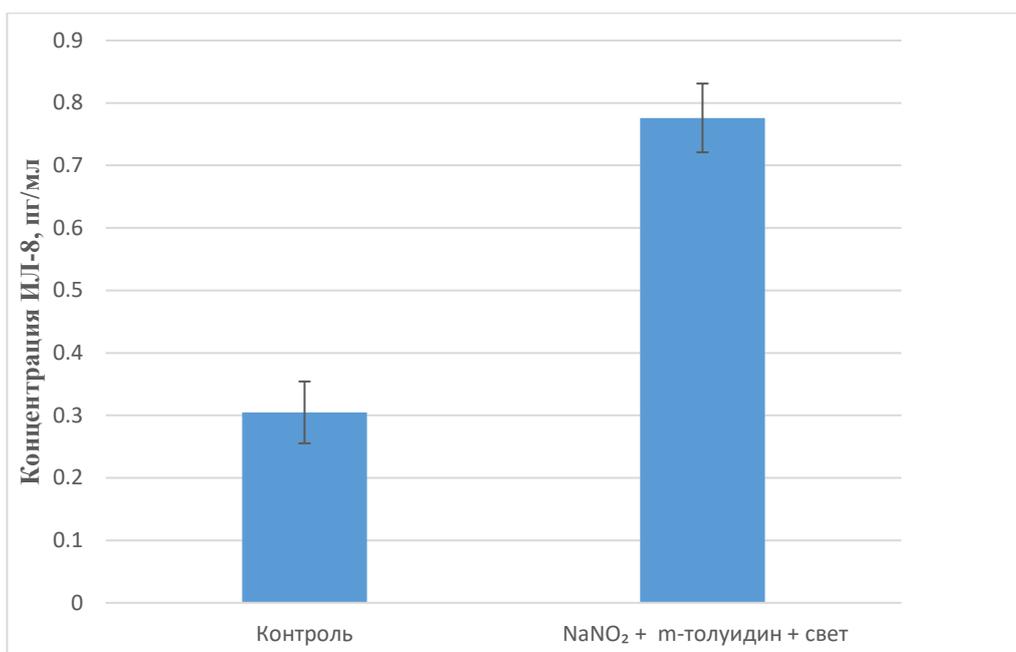


Рисунок 4 – Концентрация ИЛ-8 в образцах мочи мышей в нормальных условиях содержания и при хроническом воздействии стрессовых факторов.

Как показано в ряде работ уровень индукции ИЛ-8 значительно увеличивается при бактериальных инфекциях мочеполовой системы, в частности пиелонефрите, как следствие существенного падения иммунитета, вызванного хроническим действием стрессовых факторов. Полученные нами данные показывают, что исследования мочи модельных животных могут быть полезны при диагностике бессимптомного течения инфекционных заболеваний как вектор для поиска локализации воспалительного процесса.

Таким образом, в данной работе вполне уместно говорить о роли различных стрессовых воздействий на организм, что в дальнейшем подтверждает возможность использования выбранных показателей биохимического анализа для мониторинга развития стресса у животных при моделировании различных воспалительных состояний.

Важным фактором в формировании воспалительных реакций организма является изучение изменения активности липоксигеназы в стенках желудков мышей, подвергавшихся действию химического и светового стресса в течении длительного промежутка времени. Исследования выполняли

спектрофотометрическим методом в большом количестве биологических и аналитических повторностей. Полученные данные представлены на рисунке 5. Показано, что продолжительное световое воздействие в сочетании с ароматическим амином и нитритом приводило к активации LOX в стенках желудка самцов белых мышей инбредной линии BALB/c в 7 раз, а действие только светового стресса в 8,5 раз по сравнению с контрольной группой животных. Данный результат свидетельствует о развитии активного воспалительного процесса.

Достоверных различий по удельной активности липоксигеназы между опытными группами мышей не выявлено.

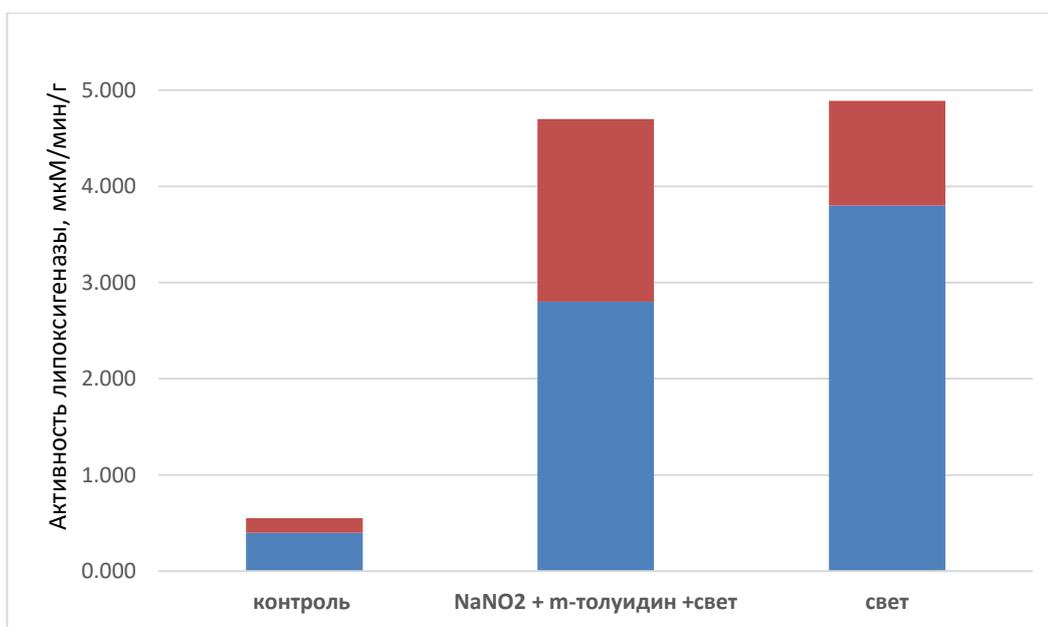


Рисунок 5 – Изменение удельной активности липоксигеназы в стенках желудков мышей как результат хронического светового и химического стресса.

Обнаруженное у опытных животных повышение активности LOX является негативным для них фактором, существенно увеличивающим риск развития различных заболеваний, возникающих на базе хронических воспалительных процессов. Опухолевое воспаление также может

способствовать патогенезу рака толстой кишки. Показано, что пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника, имеющие повышенный риск развития рака толстой кишки, характеризуются высоким уровнем активности липоксигеназы.

Кроме того, чрезвычайно востребованы модельные объекты – животные с высоким уровнем активности LOX для решения обратной задачи, а именно, для поиска различных ингибиторов липоксигеназ, способных купировать развитие связанных с этим ферментом патологических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения экспериментальной работы была опробована модель на самцах белых мышей инбредной линии BALB/c для исследования влияния хронического стресса. Показано, что для идентификации развития воспалительной реакции, которая индуцируется в условиях хронического стресса, весьма удобными показателями являются количества в сыворотке крови и моче животных интерлейкинов – ИЛ-6 и ИЛ-8, определяемых методом ТИФА с использованием моноклональных антител. Удалось выявить, что воздействие химического и светового стрессов приводит к достоверному увеличению в сыворотке крови содержания обоих провоспалительных интерлейкинов. Причем реакция на световой стресс по этим показателям порой более яркая, чем на тот же стресс в присутствии нитритов и толуидина. Такое развитие событий наводит на мысль о реализации нескольких механизмов воздействия на иммунную систему при сочетании химического и светового стресса, при которых наблюдается снижение реактивности иммунной системы и как следствие более слабый ответ на стадии индукции исследуемых типов интерлейкинов.

Было выявлено, что продолжительное световое воздействие в сочетании с химическим стрессом приводило к активации LOX в стенках желудка самцов белых мышей инбредной линии BALB/c в 7 раз, а действие только светового стресса в 8,5 раз по сравнению с контрольной группой животных. Это также

свидетельствует о наличии воспалительной реакции в организме, которая протекает с усилением окислительных процессов и образованием опасных для организма продуктов.

Таким образом, как световой, так и химический стресс оказывают пагубное воздействие на организм. Точные механизмы и конкретные физиологические эффекты на данный момент остаются недостаточно изученными, поэтому рабочие модели для анализа этих явлений востребованы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что продолжительное (в течение 7 месяцев) круглосуточное воздействие света на лабораторных мышей, а также световое воздействие, дополненное химическим стрессом (нитритами и *m*-толуидином), приводит к возникновению воспалительных процессов, течение которых можно наблюдать по индукции синтеза провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови и моче животных.

2. Установлено, что воздействие химического и светового стресса приводит к увеличению в сыворотке крови содержания ИЛ-6 на 43,6 %, а в моче на 41,5 %; действие только света увеличивало концентрацию ИЛ-6 в крови на 89,9 %, а в моче на 17,7 % по сравнению с контролем.

3. Показано, что действие светового стресса индуцировало увеличение концентрации ИЛ-8 в крови в 7 раз по сравнению с контролем, а в моче в 2,6 раза.

4. Выявлено что продолжительное круглосуточное световое воздействие на животных в сочетании с ароматическим амином и нитритом приводило к активации липоксигеназы в стенках желудка самцов белых мышей в 7 раз, а действие только светового стресса в 8,5 раз по сравнению с контрольной группой животных.