Моделирование оксидативного и психоэмоционального стресса у крыс с влиянием производных пиримидина

Розенфельд И. И.

к.м.н., доцент, кафедра патологической физиологии

Лобынцева Е. А.

студентка, 3 курс, лечебный факультет

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, 170100, город Тверь, улица Советская, дом 4.

Автор для корреспонденции: Розенфельд Игорь Игоревич; **e-mail:** iiggo@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Аннотация

В экспериментальном исследовании было использовано 60 особей животных. В зависимости от количества тиамина в рационе животные были разделены на следующие 3 исследовательские группы (по 20 в каждой): контрольная группа I – с нормальным рационом питания; группа II – в рационе питания полностью отсутствовал тиамин, были исключены продукты, содержащие витамин B₁; группа III – в рационе преобладали продукты, богатые витамином B₁. Для оценки результатов были использованы искусственное воздействие горячим потоком воздуха с шумом, установка «открытое поле», установка «приподнятый крестообразный лабиринт». В ходе экспериментов установлено, что снижение суточного тиамина негативно сказывается на когнитивных способностях, уменьшается резистентность организма к стрессовому фактору.

Ключевые слова: оксидативный стресс, психоэмоциональный стресс, производные пиримидина, тиамин, витамин B₁

doi: 10.29234/2308-9113-2018-6-2-94-105

Введение

Витамины группы В занимают важное место в клинической практике. Они используются в различных областях медицины у разных категорий пациентов, однако наибольшее применение получили в лечении заболеваний периферической и центральной нервной системы, поскольку оказывают метаболическое влияние на аксональный транспорт и процессы миелинизации в периферических нервных волокнах. В наибольшей степени такие свойства из группы присущи трём витаминам: тиамину (B₁), пиридоксину (B₆), цианкобаламину (B₁₂) [5].

Тиамин (антиневротический витамин; витамин B₁) – это органическое гетероциклическое соединение, производное пиримидина, представляющее собой водорастворимый витамин. Тиамин участвует в таких важных и необходимых процессах, как дигидрогеназные комплексы цикла Кребса, регуляция активности пентозофосфатного

цикла утилизации углеводов, проведение нервного импульса, обеспечение аксонального транспорта и регенерация нервной ткани, модуляция нервно-мышечной передачи в Н-холинорецепторах, а также регуляция «болевой» активности нерва [1,6].

Проблема недостатка тиамина заключается в пониженном употреблении цельнозерновых культур, а также низкой осведомлённости населения о ценности данного витамина и степени его потери при очистке зерна от зародыша и при тепловой обработке на производстве.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось моделирование избытка и недостатка производных пиримидина, а именно витамина В₁, и влияние его на оксидативный и психоэмоциональный стресс у крыс, а также проведение аналогии содержания в пище витамина В₁ и стрессоустойчивости взрослого человека.

Материал и методы исследования

Все эксперименты на лабораторных животных были выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утверждёнными приказом Министерства здравоохранения СССР №755 от 12.08.1977 года, и основываясь на положениях Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 года, дополненной в 1975, 1983, 1989 и 2000 годы.

Исследовательская работа проводилась на базе экспериментальной лаборатории и вивария ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава России.

Экспериментальное исследование проводилось на половозрелых белых лабораторных крысах обоего пола.

В опыте использовались животные с массой тела от 150 до 170 грамм.

Животных содержали с изменённым пищевым рационом в период 3-х месяцев, со свободным доступом к воде и пище, при температуре помещения плюс 20-22°C.

Всего было использовано 60 особей животных, которые были разделены на 3 исследовательские группы (по 20 в каждой). Изменение рациона проводилось на основе норм кормления из приказа от 10.03.1966 года № 163 Министерства здравоохранения СССР «О нормах кормления лабораторных животных и продуцентов» [7].

Группа I являлась контрольной, её суточный рацион был стандартным и не изменялся согласно приказу.

Группа II (группа гиповитаминоза B_1) находилась на рационе, в котором отсутствовал витамин B_1 , путём полного исключения таких продуктов, как зерновая смесь, пшеничный хлеб из муки 2 сорта, овсяная крупа. Содержание зелени было уменьшено на 90%.

Группа III (группа гипervитаминоза B_1) имела рацион, в котором количество витамина B_1 было увеличено практически в три раза, за счёт увеличения массы таких продуктов, как зерновая смесь, пшеничный хлеб из муки 2 сорта, овсяная крупа, зелень. Кроме того, каждые двое суток в воду этой группы добавлялось по 4 мл 5% раствора хлорида тиамина.

Для оценки результатов работы было проведено 3 эксперимента.

Эксперимент 1 – одновременное воздействие на группу крыс горячим потоком воздуха и шумом. Животных искусственно вводили в стрессовую ситуацию в течение 5 минут. Крысы находились в открытой клетке, и каждая была под контролем испытующего.

Эксперимент 2 – использование установки «открытое поле», которая предназначена для изучения поведения грызунов в новых стрессорных условиях и позволяет оценить следующие регистрируемые параметры: горизонтальная двигательная активность, вертикальная двигательная активность, исследовательская активность в виде обнюхивания отверстий, дефекация, груминг [2,3]. Груминг (от английского «groom» – «чистить лошадь, ухаживать, холить») – это активное поведение животных, направленное на очистку поверхности тела, например умывание, купание. В данном исследовании процедура тестирования включала в себя подготовительный период и непосредственный эксперимент, который длился в среднем по 7 минут для каждой группы, поскольку первые 2-4 минуты теста связаны с такими эмоциональными факторами, как внезапность, необычность и новизна. Каждая из трёх групп последовательно проходила тестирование, причём перед каждым исследованием установку протирали влажной губкой и высушивали.

Эксперимент 3 – использование установки «приподнятый крестообразный лабиринт», которая представляет собой один из популярных тестов для исследования тревожности. Лабиринт приподнят на высоту 1 метра от пола, имеет 4 рукава – 2 открытых и два закрытых, за счёт высоких стенок в качестве укрытия. Тестирование с его использованием основывается на природной тенденции крыс оставаться в укромных местах и необусловленном страхе животных к открытым местам и высоте. Кроме того, для объективизации эксперимента была использована видеосистема. Подвижное крепление видеокамеры и встроенный оптический трансфокатор позволяли работать с несколькими аренами различного типа и размера. Традиционно видеосъёмка животного производилась сверху. В данном тестировании участвовали по 2 крысы из каждой группы,

которые не были задействованы в эксперименте 2. За 24 часа до эксперимента крысы находились в покое, были исключены различные манипуляции над ними. Параметры, регистрируемые в процессе теста: горизонтальная двигательная активность, вертикальная двигательная активность – стойки на задних лапах с опорой на стенку рукава, а также самостоятельные стойки на задних лапах, время пребывания в закрытых рукавах, время пребывания в открытых рукавах [4].

При статистической обработке для корректного определения меры центральной тенденции и рассеяния осуществлялась проверка выборки на нормальность распределения с использованием средств автоматизации расчётов «MS Excel» и «VBA». Поскольку переменные выборки имели ненормальный характер распределения, то мерой центральной тенденции и рассеяния явилась медиана, верхний и нижний квартили. Для оценки одинакового признака в трёх независимых группах использовался непараметрический ранговый критерий Крускала-Уоллиса. При этом если выявлялось различие между исследуемыми группами (отвергалась нулевая гипотеза), то дополнительно при помощи непараметрического рангового Q-критерия Данна определялось, между какими именно попарными группами (I-II; I-III; II-III) есть достоверные статистически значимые различия. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В эксперименте 1 при воздействии горячего потока воздуха и шума первой подверглась испытанию I группа контроля. На протяжении всего испытания крысы активно наблюдали за раздражителем, пытались зарываться, а также активно умывались и убегали от действия раздражающего фактора. Спустя 3 минуты 50 секунд животные перестали сопротивляться действию стрессового фактора и собрались все в одном углу.

Следующими были крысы, у которых в рационе был значительный недостаток витамина B₁. Аналогичным способом крыс заставляли бегать, прятаться, умываться. Однако эта группа крыс проявляла активность небольшими промежутками. Первые 37 секунд крысы активно передвигались по территории, поднимались на задние лапы, однако вскоре падали, забивались в углы. Через 37 секунд животные сгруппировались в одном углу и в течение 8 секунд не проявляли активности. Крысы окончательно перестали сопротивляться действию стрессового фактора через 2 минуты. Данный результат был практически в 2 раза меньше, чем у группы контроля ($p < 0,05$). Такой показатель времени можно объяснить общим утомлением крыс, а также слабостью двигательных мышц. На протяжении эксперимента у крыс этой группы наблюдалась неустойчивая шаткая походка. В конце испытательного срока животные группы II стали отказываться от пищи, потеряли аппетит, произошло снижение массы тела, что было связано с тиаминовой недостаточностью.

В группе III, в рацион которой входило большое количество продуктов, содержащих исследуемый витамин, тестирование прошло аналогично остальным, был показан результат в 3 минуты 20 секунд. Результат эксперимента 1 при одновременном воздействии на группу крыс горячим потоком воздуха и шумом представлен на рис. 1.

Рис. 1. Воздействие на группу крыс горячим потоком воздуха и шумом

Крысы из группы со сниженным потреблением витамина В₁ обладали низкой резистентностью в сравнении с группой контроля и гипервитаминоза. Результат в группе гиповитаминоза был практически в 2 раза меньше ($p < 0,05$).

Результаты всех трёх исследовательских групп животных, полученных в эксперименте 2 при использовании установки «открытое поле», были оформлены в сравнительную таблицу 1.

Таблица 1. Результаты при использовании установки «открытое поле»

1. Оценка горизонтальной двигательной активности:			
Критерий оценки	Группа гиповитаминоза	Группа контроля	Группа гипервитаминоза
Начало активности	с первых секунд	спустя 3 минуты 14 секунд	с первых секунд
Характер активности на протяжении эксперимента	начало активное, к концу эксперимента животные скучиваются	начало пассивное, с середины теста – оптимальное, но настороженное	периодически сменяемая активность на скучиванье
Латентный период	отсутствует	½ времени теста	отсутствует
Максимальное количество пройденных секторов	11	5	5
Среднее количество пройденных секторов	7-8	4	4
Характер передвижения по арене	резкий, быстрый старт и резкая	настороженный, заинтересованный,	настороженный, заинтересованный, со

	остановка, раздражительный	со средней скоростью	средней скоростью
Конец активности	спустя 3 минуты 17 секунд после начала теста	до конца времени тестирования	до конца времени тестирования
2. Оценка вертикальной двигательной активности:			
Начало активности	спустя 3 минуты 2 секунды	с первых секунд	с первых секунд
Связь с горизонтальной двигательной активностью	вертикальная активность следует после горизонтальной, связи нет	вертикальная активность сопутствует горизонтальной, связь есть	вертикальная активность сопутствует горизонтальной, связь есть
Характер стойки	неуверенный	уверенный	уверенный
Стойка «rearing»	не более 3 секунд	4 секунды	5 секунд
Преобладание стойки	«climbing»	в равной степени обе	в равной степени обе
3. Оценка груминга:			
Первый груминг	на 15 секунде	на 45 секунде	на 1 минуте 52 секунде
Количество коротких грумингов	10	8	2
Длительный груминг	на 4/5 времени теста, единственный	в конце теста, единственный	в начале теста, единственный
4. Оценка исследовательской активности (обследование отверстий):			
Начало	с 22 секунды	с 4 секунды	с 4 секунды
Связь с горизонтальной двигательной активностью	связь есть	связи нет	связь есть
Количество обследованных отверстий	32	20	27
Характер обследования	поверхностное обследование	обследование с попыткой засунуть мордочку	обследование с попыткой засунуть мордочку
5. Оценка дефекации:			
Уровень	пониженный	средний	пониженный

Результаты оценки горизонтальной двигательной активности при использовании установки «открытое поле» для наглядности представлены в виде рис. 2.

Из рис. 2 видно, что группа гиповитаминоза с первых секунд исследовала установку, проходя большое количество секторов на поле, однако её активность угасала уже спустя $\frac{1}{2}$ времени от общего времени эксперимента ($p < 0,05$). Показатели группы гипервитаминоза идентичны группе контроля и статистически незначимы.

Рис. 2. Оценка горизонтальной двигательной активности

Результаты оценки вертикальной двигательной активности при использовании установки «открытое поле» представлены на рис. 3.

Рис. 3. Оценка вертикальной двигательной активности

На рис. 3 видно, что группа крыс с гиповитаминозом не сразу пыталась подняться на задние лапы, стойка была неуверенной и непродолжительной. Группа животных с гипервитаминозом стояла на задних лапах уверенно и продолжительно ($p < 0,05$). Вертикальная двигательная активность сопровождалась горизонтальной двигательной активностью.

Результаты оценки груминга при использовании установки «открытое поле» представлены на рис. 4.

Рис. 4. Оценка груминга

На рис. 4 видно, что у группы крыс гиповитаминозом с первых секунд эксперимента проявлялся стресс, который проявляется активным грумингом. На протяжении всего эксперимента частота распространённости груминга у крыс – относительно высокая. В группе животных с гипервитаминозом возникает устойчивость к новой среде, первый груминг – спустя почти 2 минуты после начала тестирования, частота встречаемости груминга – относительно низкая ($p < 0,05$).

Результаты оценки исследовательской активности при использовании установки «открытое поле» представлены на рис. 5.

Рис. 5. Оценка исследовательской активности

На рис. 5 в группе животных с гиповитаминозом исследовательская активность проявляется спустя 22 секунды, что можно объяснить увлечением у крыс горизонтальной двигательной активности, однако со временем количество исследуемых отверстий у данной группы заметно выше остальных двух групп, но исследование имеет поверхностный характер, в отличие от этой группы, крысы групп контроля и гипервитаминоза пытаются просунуть мордочку в отверстие, проявляя больший интерес к исследованию ($p < 0,05$).

Таким образом, при проведении эксперимента 2, каждая исследуемая группа показала свои результаты. У группы животных с гиповитаминозом отсутствовал латентный период, можно предположить, что это было связано с восприятием чрезмерно сильного стрессового фактора (новая обстановка), поэтому крысы этой группы преодолевали гораздо большее количество секторов ($p < 0,05$). На фактор сильного стресса указывает также время первого выполненного груминга и общее количество. При попытках подняться на задние лапы крысы испытывали трудности, была заметна неуверенная и непродолжительная стойка, быстро завершающаяся падением. Низкая исследовательская деятельность – у крыс был незаинтересованный характер, обследование отверстий поверхностное и быстрое. Группа условного гипервитаминоза показала высокую устойчивость к стрессовому фактору установки «открытое поле»: в начале эксперимента у крыс имелся небольшой латентный период, вслед за этим крысы начали изучать окружающую их обстановку, причём горизонтальная двигательная активность сменяла вертикальную, чем можно объяснить высокую устойчивость этой группы крыс к стрессовому фактору. Процессы груминга были значительно реже, чем у группы контроля, однако количество грумингов не следует считать достоверным фактором оценки влияния стресса на организм. Вертикальная двигательная активность крыс отличалась устойчивостью, отсутствием шаткости походки. Исследовательская деятельность имела высокий уровень – крысы пытались просунуть мордочку для обследования отверстия.

Результаты всех трёх исследовательских групп животных, полученных в эксперименте 3 при использовании установки «приподнятый крестообразный лабиринт», были оформлены в сравнительную таблицу 2. Время нахождения в открытых и закрытых рукавах является общими показателем, который был получен при сложении отдельных коротких отрезков выхода.

Таблица 2. Исследование в установке «приподнятый крестообразный лабиринт»

Критерий оценки	Группа гиповитаминоза	Группа контроля	Группа гипервитаминоза
Время нахождения в закрытых рукавах (время выхода из закрытого рукава считалось, как только крыса четырьмя лапами выходит из-за стен закрытого рукава)	9 минут ± 15 секунд	10 минут	10 минут
Время нахождения в открытых рукавах	1 минута	–	–

Горизонтальная двигательная активность (количество выходов из закрытых рукавов)	5 ± 1	–	–
Вертикальная двигательная активность (отношение стойки «climbing» к «rearing»)	39 30:9	10 6:4	16 15:1

Результаты оценки вертикальной двигательной активности и соотношение стоек «climbing» к «rearing» при использовании установки «приподнятый крестообразный лабиринт» для наглядности представлены в виде рис. 6.

Рис. 6. Вертикальная двигательная активность и соотношение стоек

На рис. 6 в группе животных с гиповитаминозом проявлялась высокая горизонтальная и вертикальная двигательная активность по сравнению с двумя другими исследовательскими группами. Однако поведение группы крыс с гиповитаминозом выглядело раздражительным. Животные при этом постоянно метались, наблюдался активный груминг, что подтверждало воздействие на их организм стрессового фактора.

Выводы

Результаты моделирования оксидативного и психоэмоционального стресса у крыс с влиянием производных пиримидина свидетельствуют о том, что недостаток тиамин в суточном рационе существенно сказывается на реакциях организма на воздействие внешнего стрессового раздражителя. Исключение продуктов, богатых витамином B₁, а также замена их на другие, значительно снижают резистентность организма к стрессу, уменьшают исследовательскую деятельность и заинтересованность; компенсация происходит за счёт необоснованной двигательной активности без определённой цели, сопровождающейся растерянностью, неуверенностью и раздражительностью. Данная модель может быть использована для проведения аналогии влияния содержания в пище витамина B₁ на стрессоустойчивость взрослого человека.

Список литературы

1. Бурешов Я., Бурешова О., Хьюсон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 2001. 122 с.
2. Калугев А.В. Проблемы и методы изучения груминга при анализе стрессорного поведения у грызунов. Киев: Научная сеть, 2008. 66 с.
3. Коплик Е.В., Салиева Р.М. Тест «открытого поля» как прогностический критерий устойчивости крыс линии Вистар к эмоциональному стрессу. *Журнал высшей нервной деятельности* 1995; 45 (4): 775-781.
4. Литвицкий П.Ф. Патопфизиология в 2-х томах. М.: Гэотар-мед, 2001. 466 с.
5. Максименя Г.Г., Кухта В.К. Побочные действия и противопоказания использования препаратов витаминов в клинической практике. *Белорусский медицинский журнал* 2008; (2): 25-77.
6. Морозова Т.Е., Дурнецова О.С. Витамины группы В в клинической практике. *Медицинский совет* 2014; (8): 73-77.
7. Носов В.Г., Петров В.К. Особенности кормления грызунов. *Ветеринарный журнал* 2018; (1): 185-190.

Modeling of oxidative and psychoemotional stress in rats with the effect of pyrimidine derivatives

Rozenfeld I. I.

MD PhD, Chair for Pathological Physiology Tver State Medical University, Tver, Russia.

Lobyneva E. A.

Student, Medical Faculty

Tver State Medical University, Tver, Russia.

Corresponding Author: Rozenfeld Igor; **e-mail:** iiggo@mail.ru

Conflict of interest. None declared.

Funding. The study had no sponsorship.

Summary

In an experimental study, 60 animals were used. Depending on the amount of thiamine in the diet, the animals were divided into following 3 research groups (20 each): control group I – with a normal diet; group II – thiamine was completely absent in the diet, products containing vitamin B₁ were excluded; group III – in the diet, foods rich in vitamin B₁ predominated. To evaluate the results, artificial impact was applied by hot air flow with noise, an «open field» installation, an «elevated cross-shaped labyrinth» installation. In the course of the experiments, it was found that a decrease in daily thiamine negatively affects cognitive abilities, the resistance of the organism to a stress factor decreases.

Keywords: oxidative stress, psychoemotional stress, pyrimidine derivatives, thiamine, vitamine B₁

References

1. Bureshov Ya., Bureshova O., Xyuson D.P. Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya [Techniques and basic experiments on the study of the brain and behavior]. Moscow: Vysshaya Shkola, 2001. (In Russ.)
2. Kaluev A.V. Problemy i metody izucheniya gruminga pri analize stressornogo povedeniya u gryzunov [Problems and methods of studying grooming in the analysis of stressor behavior in rodents]. Kiev: Nauchnaya set, 2008. (In Russ.)
3. Koplik E.V., Saliva R.M. "Test «otkrytogo polya» kak prognosticheskij kriterij ustojchivosti krysa linii Vistar k emocionalnomu stressu ["Open field" test as a prognostic criterion of resistance of Wistar rats to emotional stress]." *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti* 1995; 45 (4): 775-781. (In Russ.)
4. Litvickij P.F. Patofiziologiya v 2 tomah [Pathophysiology in 2 volumes]. Moscow: Geotar-med, 2001. (In Russ.)
5. Maksimenya G.G., Kuxta V.K. "Pobochnye dejstviya i protivopokazaniya ispolzovaniya preparatov vitaminov v klinicheskoy praktike [Side effects and contraindications to the use of vitamin preparations in clinical practice]." *Belorusskij medicinskij zhurnal* 2008; (2): 25-77. (In Russ.)
6. Morozova T.E., Durneczova O.S. "Vitaminy gruppy B v klinicheskoy praktike [B group vitamins in clinical practice]." *Medicinskij sovet* 2014; (8): 73-77.
7. Nosov V.G., Petrov V.K. "Osobennosti kormleniya gryzunov [Features of rodent feeding]." *Veterinarnyj zhurnal* 2018; (1): 185-190. (In Russ.)