РАЗВИТИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МИКОТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ И ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

¹Л.И. Дроздова, доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ

¹Л.И. Тимина, кандидат биологических наук

²Н.М. Семенихина, кандидат ветеринарных наук

¹Уральский государственный аграрный университет,
Екатеринбург, Россия

²Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

E-mail: drozdova43@mail.ru

Ключевые слова: микология, микромицет, пенициллез, лабораторные животные, мыши, биологические модели, стресс, воспаление, иммобилизационный стресс, патанатомия

Реферат. Представлены данные о способах моделирования полиэтиологического стресса у лабораторных мышей и его влиянии на развитие воспалительной реакции и характер патолого-анатомических изменений. На первом этапе у двух групп животных был смоделирован полиэтиологический стресс. Для этого животных заражали микромицетом внутривентрально и оставляли в неподвижном состоянии по несколько часов в день. После этого проводили оценку заражения путем обнаружения микромицета в периферической крови животных. На втором этапе изучали степень возникновения и характер патолого-анатомических изменений при разных способах введения микромицета. Было отмечено, что в результате одновременного воздействия двух стрессовых факторов микромицет в периферической крови выявлялся на 8-е сутки исследования. В то же время влияние одного стресс-фактора приводило к генерализации процесса только на 17-е сутки. При разных способах заражения у лабораторных мышей были выявлены характерные изменения во внутренних органах, которые у всех групп животных были представлены в основном в виде единичных и множественных абсцессов различной локализации, а также свищей в левой каудальной части брюшины. Абсцессы в области левого предплечья были заполнены характерным гнойным содержимым: творожистая масса светло-серого цвета с неприятным запахом либо без запаха. Данные патолого-анатомические изменения отмечали у 90 % животных от общего их количества в эксперименте. Введение Р. суслоріит с последующим воздействием на организм белых мышей ИМО-стресса приводит к 100 %-й гибели животных на 1–2-е сутки от начала стрессирования. Животные, которым только вводили Р. суслоріит, оставались живы до конца исследования.

DEVELOPMENT OF AN INFLAMMATORY RESPONSE IN LABORATORY ANIMALS AT EXPERIMENTAL MYCOTIC INFECTION AND IMMOBILIZATION STRESS

¹L.I. Drozdova, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation¹L.I. Timina, Candidate of Biological Sciences²N.M. Semenikhina, Candidate of Veterinary Sciences¹ Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia² Altai State University, Barnaul, Russia

Key words: mycology, mycomycet, penicillosis, laboratory animals, mice, biological models, stress, inflammation, immobilization stress, pathology

Abstract: The data on the methods of modeling polyetiologial stress in laboratory mice and its effect on the development of the inflammatory response and the nature of pathological and anatomical changes are presented. At the first stage, two groups of animals simulated polyetiologial stress. For this, the animals were infected with micromycete intraperitoneally and left stationary for several hours a day. After that, infection was assessed by detecting micromycete in the peripheral blood of animals. At the second stage, the degree of occurrence and the nature of pathological and anatomical changes were studied with different methods of micromycete administration. It was noted that as a result of the simultaneous exposure to two stress factors, micromycetes in the peripheral blood were detected on the 8th day of the study. At the same time, the influence of one stress factor led to the generalization of the process only on the 17th day. With different methods of infection in laboratory mice, characteristic changes were revealed in the internal organs, which in all groups of animals were represented mainly as single and multiple abscesses of different localization, as well as fistulas in the left caudal part of the peritoneum. Abscesses in the region of the left forearm were filled with characteristic purulent contents: a curdled mass of light gray with an unpleasant odor or odorless. These pathological and anatomical changes were noted in 90% of the animals of their total number in the experiment. The introduction of *R. syclopium* followed by the exposure of white mice to IMO stress leads to 100% death of animals on days 1-2 from the onset of stress. Animals that were only injected with *P. cyclopium* remained alive until the end of the study.

В настоящее время стрессы остаются актуальной проблемой животноводства. Наиболее часто к возникновению такого состояния у сельскохозяйственных животных приводят технологические процедуры, такие как частые перегруппировки, транспортировки, передвижения по конвейеру со сменой рациона и микроклимата, ранний отъем молодняка, гиподинамия и другие факторы [1].

Микроорганизмы – возбудители болезней также рассматриваются с позиции стрессового воздействия. Вирусы, микробы, грибы и простейшие в нормальных условиях и при высокой резистентности животных находятся в организме постоянно и не вызывают патологических изменений. Однако при нарушении условий содержания и кормления, а также при снижении резистентности и иммунологической реактивности они способны вызвать дис-

бактериоз, а условно-патогенные микроорганизмы приобретают вирулентные свойства.

Одними из наиболее частых этиологических агентов, способных индуцировать заболевание, являются условно-патогенные микроорганизмы грибковой природы (микромикеты). Самыми распространенными из них являются плесневые грибы рода *Penicillium* [2].

Одновременное или последовательное воздействие двух или нескольких стрессоров, один из которых обусловлен попаданием в организм условно-патогенной микрофлоры, например микромикетов, приводит к повышению чувствительности и очень сильной стрессовой реакции. Развивается так называемый полиэтиологический стресс, в процессе которого у животных интенсифицируются процессы распада в обмене веществ, прекращается рост молодняка, уменьшается масса тела взрослых живот-

ных, возникает ареактивное состояние, истощение жизненных сил и гибель животного [3, 4].

Патологический процесс начинается с появления первых клинических признаков болезни. Он складывается из ухудшения здоровья, уменьшения продуктивности сельскохозяйственных животных всех видов и возрастов, снижения плодовитости и качества продукции. Ухудшение здоровья обусловлено снижением уровня общей резистентности организма и необходимостью приспособления к новым условиям существования [5].

Несмотря на то, что полиэтиологический стресс – явление довольно частое в современном животноводстве, изучен он недостаточно и возникает чаще всего при интенсивном ведении промышленного животноводства, предусматривающем максимальное использование биологического потенциала сельскохозяйственных животных.

Цель работы – изучить особенности развития воспалительной реакции при сочетанном стрессе, обусловленном экспериментальной грибковой инфекцией у лабораторных мышей на фоне психоэмоционального иммобилизационного стресса.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная работа выполнена с использованием беспородных белых мышей-самцов массой 18–22 г. Животные содержались в соответствии со стандартом GLP (принципы надлежащей лабораторной практики) [6–8].

На первом этапе исследования у лабораторных мышей моделировали инфекционный процесс путем однократного внутрибрюшинного введения культуры микромицета *Penicillium cyclopium* в дозе $183,0 \cdot 10^6$ клеток. В качестве психоэмоциональной нагрузки применяли экспериментальную модель иммобилизационного стресса, которая часто используется для исследования характера дисфункции иммунной системы при воздействии экстремальных факторов [9, 10].

Для первого этапа исследований животных разделили на три группы по 10 голов: 1-ю

группу составили животные, у которых моделировали иммобилизационный стресс, а затем вводили возбудитель. Продолжительность стрессирования белых мышей составила 8 суток по 7 ч ежедневно. Животным 2-й группы вводили *P. cyclopium* без использования стрессирующего фактора. Белые мыши 3-й группы были подвержены воздействию экспериментального стресса после введения изучаемого возбудителя. При этом учитывали выживаемость животных в эксперименте, а также динамику проникновения микромицета *P. cyclopium* в кровяное русло.

Забор крови у лабораторных белых мышей 1–3-й групп на наличие возбудителя в крови производили каждые трое суток.

Учитывая, что достоверным подтверждением пенициллезной инфекции является прорастание возбудителя в мицелий, выделяли чистую культуру путем посева на плотную питательную среду отпечатков органов экспериментальных животных.

На втором этапе эксперимента изучали патолого-анатомические изменения во внутренних органах мышей при полиэтиологическом стрессе, вызванном трехкратным заражением суспензией микромицета *P. cyclopium* с интервалом 5–7 суток между инъекциями внутрибрюшинно (1-я группа), подкожно (2-я группа) и перорально (3-я группа) в сочетании с иммобилизационным стрессом (7 ч в течение 5 суток). В качестве контроля использовали мышей 4–6-й групп, которым вводили *P. cyclopium* аналогичными способами, но без иммобилизационного стресса. Животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации через неделю после последнего заражения, проводили патолого-анатомическое вскрытие и отмечали характер макроскопических изменений во внутренних органах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения первого эксперимента при изучении крови лабораторных мышей после заражения микромицетом на 8-е сутки исследования у животных 1-й группы в маз-

Рис. 1. Плодовое тело микромицета *P. cyclopium* в крови белой мыши (1-я группа). Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение $\times 1000$
The fruiting body of *P. cyclopium* micromycete in the blood of a white mouse. (1st group). Coloring according to Romanovsky-Giemsa. zoom $\times 1000$

ках обнаруживали септированный мицелий с характерными для *Penicillium* sp. органами плодоношения, имеющими вид кисточек. На рис. 1 представлен микромицет *P. cyclopium* в периферической крови лабораторных животных. Мицелий и другие элементы гриба *P. cyclopium* выявляли также у животных 2-й и 3-й групп, однако на более поздних сроках – на 17-е сутки исследования (рис. 2).

Выявление плодовых тел, достаточно редко встречающихся при пенициллезе, является несомненным указанием на рост и развитие

возбудителя и имеет важное диагностическое значение.

Через 10 дней после посева отпечатков органов обнаруживали рост колоний *P. cyclopium* в виде белого пушистого мицелия в 1-й опытной группе. Во 2-й и 3-й группах животных без применения стрессирующего фактора также наблюдали рост колоний микромицета, но в более поздние сроки – на 2-е сутки исследования.

Раннее появление микромицета в периферической крови лабораторных животных 1-й опытной группы, вероятно, связано с предше-

Рис. 2. Конидиеносец и плодовое тело микромицета *P. cyclopium* в крови белой мыши (2-я группа). Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение $\times 1000$
Conidiophores and fruiting body of *P. cyclopium* micromycete in the blood of a white mouse (group 2). Coloring according to Romanovsky-Giemsa. zoom $\times 1000$

Рис. 3. Единичный абсцесс под кожей у лабораторной мыши (1-я группа)
Single abscess under the skin of a laboratory mouse (group 1)

Рис. 4. Абсцесс в области левого предплечья мыши (2-я группа)
Abscess in the area of the left forearm of the mouse (group 2)

Рис. 5. Множественные абсцессы в брюшной стенке лабораторной мыши после внутрибрюшинного введения *P. cyclopium* (4-я группа)
Multiple abscesses in the abdominal wall of a laboratory mouse after intraperitoneal administration of *P. cyclopium* (group 4)

ствующей введению *P. cyclopium* иммобилизацией, которая способствует снижению естественной резистентности и приводит к более раннему развитию генерализации инфекционного процесса.

В ходе изучения патолого-анатомических изменений при разных способах заражения у лабораторных мышей были выявлены признаки гнойного воспаления в форме единичных и множественных абсцессов различной локализации, а также свищей в левой каудальной части брюшины. Абсцессы в области левого предплечья были заполнены характерным гнойным содержимым: творожистая масса светло-серого цвета с неприятным запахом либо без запаха. Воспалительный процесс при внутрибрюшинном введении локализовался в брюшной полости и на брюшной стенке (рис. 3).

При подкожном введении возбудителя нами были выявлены абсцессы в области шейного отдела позвоночника и левого предплечья (рис. 4).

При пероральном введении инфекта видимых патологических изменений не обнаружили, кроме воспаления паховых лимфатических узлов.

У лабораторных мышей после введения *P. cyclopium* без стресса (группы 4–6-я) также отмечали патолого-анатомические изменения, которые носили однотипный характер в виде мелких множественных абсцессов и по

частоте случаев составили 45 % от общего числа зараженных особей (рис. 5).

Полученные результаты позволяют утверждать, что последовательное применение двух стрессирующих факторов, один из которых обусловлен введением условно-патогенного микромицета, оказывает неблагоприятное влияние на организм лабораторных животных.

ВЫВОДЫ

1. Сочетанное воздействие двух стрессоров приводит к появлению микромицета в периферической крови лабораторных животных на 8-е сутки исследования, в то время как один стрессор приводит к генерализации процесса только на 17-е сутки. Введение *P. cyclopium* с последующим воздействием на организм белых мышей иммобилизационного стресса обуславливает 100%-ю гибель животных на 1–2-е сутки от начала стрессирования. Животные, которым только вводили *P. cyclopium*, оставались живы до конца исследования.

2. Одновременное воздействие двух стрессоров приводит к возникновению воспалительного процесса в брюшной полости, образованию в организме белых мышей единичных и множественных абсцессов различной локализации, образованию наружных и внутренних свищей у 90 % животных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Данилкина О.П. Физиология стресса животных / Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2016. – 32 с.
2. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: руководство для врачей. – М.: Бином-пресс, 2003. – 440 с.
3. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты). – М., 1985. – С. 160–182.
4. Монастырский О.А. Состояние и проблемы исследования опасных микотоксинов для теплокровных животных // Вестн. РАСХН. – 1995. – № 6. – С. 26–29.
5. Плященко С.И., Сидоров В.Т. Предупреждение стрессов у сельскохозяйственных животных. – Минск: Ураджай, 1983. – 136 с.
6. ГОСТ Р-53434–2009 Принципы надлежащей лабораторной практики. – М., 2009. – 16 с.
7. Положение о государственном ветеринарном надзоре в Российской Федерации // Рос. газета. – 2001. – 28 апр.

8. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях* / под ред. Н. Н. Каркищенко. – М.: Профиль, 2010. – 358 с.
9. *Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов* / В. Н. Каркищенко, Г. Д. Капанадзе, С. Е. Деньгина, С. Н. Станкова // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 72–74.
10. Арташян О. С., Юшков Б. Г., Мухлынина Е. А. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 8. – С. 665–667.

REFERENCES

1. Danilkina O. P. *Fiziologiya stressa zhivotnykh: metod. Ukazaniya* (Physiology of animal stress), Krasnoyar. gos. agrar. un-t, Krasnoyarsk, 2016, 32 p.
2. Sergeev A. Yu., Sergeev Yu. V. *Gribkovye infektsii* (Fungal infections), Rukovodstvo dlya vrachei, M., OOO Binom presS, 2003, 440p.
3. Tutel'yan V. A., Kravchenko L. V. *Mikotoksiny (meditsinskie i biologicheskie aspekty)*, Mycotoxins (medical and biological aspects), M., 1985, pp. 160–182.
4. Monastyrskii O. A. Sostoyanie i problemy issledovaniya opasnykh mikotoksinov dlya teplokrovnykh zhivotnykh, *Vestnik RASKHN*, 1995, No 6, pp. 26–29. (In Russ.)
5. Plyashchenko S. I., Sidorov V. T. *Preduprezhdenie stressov u sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* (Stress Prevention in Farm Animals), Minsk, Uradzhai, 1983, 136 p.
6. GOST R-53434–2009 *Printsipy nadležashchei laboratornoi praktiki* (Good Laboratory Practices), 2009, 16 p.
7. *Polozhenie o gosudarstvennom veterinarnom nadzore v Rossiiskoi Federatsii* (Regulation on state veterinary supervision in the Russian Federation), M., 2001, No 295.
8. *Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh tekhnologiyakh* (Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology), pod red. N. N. Karkishchenko, M., Profil», 2010, 358 p.
9. Karkishchenko V. N., Kapanadze G. D., Den'gina S. E., Stankova S. N. *Razrabotka metodiki otsenki fizicheskoi vynoslivosti melkikh laboratornykh zhivotnykh dlya izucheniya adaptogennoi aktivnosti nekotorykh lekarstvennykh preparatov*, *Biomeditsina*, 2011, No 1, pp. 72–74. (In Russ.)
10. Artashyan O. S., Yushkov B. G., Mukhlynina E. A. Izuchenie funktsional'noi aktivnosti tuchnykh kletok pri immobilizatsionnom stresse, *Tsitologiya*, 2006, No 8 (48), pp. 665–667. (In Russ.)