

УДК 616:619 574.4

НЕКОТОРЫЕ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ У МЫШЕЙ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ДОЗАМИ *T. SPIRALIS*

Жданова О. Б.^{1,2}, Написанова Л. А.¹, Мутшвили Л. Р.², Ашихмин С. П.²

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт паразитологии
им. К. И. Скрябина, Москва, Россия

ГБОУ ВПО Кировский государственный медицинский университет Минздрава, Киров, Россия
E-mail: oliabio@yandex.ru

Изучены некоторые морфо-функциональные изменения при трихинеллезе у мышей. В экспериментах на половозрелых лабораторных мышах установлено, что наибольшие различия в группах здоровых и инвазированных животных отмечены в группе экспериментального моделирования сильного заражения (250 ± 20 личинок трихинелл). Мыши отличались меньшей подвижностью в тесте «открытое поле», уменьшалось время груминга, что, по нашему мнению, было обусловлено механическим и токсическим воздействием возбудителя на мышцы и нервную систему животного. Наблюдали значительное уменьшение времени при принудительном плавании с нагрузкой у зараженных мышей. Обнаружены изменения массы и формы сердца: у зараженных трихинеллами в дозах 50 ± 5 и 150 ± 15 личинок – конусовидная, при сильной интенсивности инвазии (ИИ) – эллипсовидная. При исследовании массы сердца установлено, что при средней и высокой ИИ она уменьшается, пропорционально уменьшению массы тела. При инвазии 50 ± 5 и 150 ± 15 личинками трихинелл масса печени практически не изменяется, а масса селезенки незначительно уменьшается; при средней ИИ, при высокой ИИ отличия ярко выражены. Применение используемых методов может быть перспективным для оценки терапевтической активности оригинальных экспериментальных лекарственных форм препаратов и разработки схем лечения трихинеллеза.

Ключевые слова: мыши, терапия, паразит, трихинелла, сердце, печень, селезенка.

ВВЕДЕНИЕ

Мышиные наиболее часто используются для моделирования гельминтозов, и трихинеллеза в частности. Для лабораторных целей используют чаще всего белую мышь *Mus musculus L.*, которая является альбиносом серой, домашней мышью. Главная цель заражения мышей — использование их в качестве подопытных животных в доклинических исследованиях и модельных организмов при изучении заболеваний. Кроме того, они используются для накопления личинок трихинелл при получении антигена, что предопределено такими факторами, как высокая скорость их размножения и относительно низкая стоимость. Трихинеллез является наиболее актуальным в изучении гельминтозом из группы зоонозных нематодозов, характеризующийся лихорадкой, миалгиями, отеком лица, кожными сыпями, эозинофилией, а при тяжелом течении — поражением внутренних органов и нервной системы [1, 2].

Важным направлением в паразитологии является создание профилактических препаратов, что особенно актуально в отношении антропоозоонозных заболеваний. Разработка средств для профилактики трихинеллеза является важной и пока еще нерешенной проблемой [2, 4, 14–16]. Важно учитывать, что использование лабораторных животных в доклинических исследованиях без учета их физиологического состояния приводит к тому, что исследователи получают ложные результаты. Сложность учета морфо-функциональных изменений при трихинеллезе у мышей обусловлена, прежде всего, малыми их размерами, а также, биологическими особенностями различных видов линий [5–8, 10]. Большинство современных линий лабораторных мышей являются гибридами разных подвидов, что следует учитывать при моделировании гельминтозов, т.к. ряд параметров жизнеспособности и устойчивости к заражению могут варьироваться. [4, 5, 10].

Таким образом, проведенные нами исследования были направлены на изучение ряда морфологических параметров органов (сердца, селезенки и печени) и особенностей поведения в тестах «поведения в открытом поле», «принудительного плавания с 10 % грузом от массы тела» при трихинеллезе у экспериментально зараженных лабораторных животных, с разной интенсивностью инвазии, с целью оценки их перспективности в доклинических исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты выполнены в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [12]. Исследования проводились на 40 половозрелых мышах 2-х месячного возраста. Животные были разделены группы: контрольную (интактная, n=10, К-группа) и опытные (n=30), мыши которые подвергались инвазированию личинками трихинелл в дозах 50 ± 5 , 150 ± 15 и 250 ± 20 , полученных перевариванием по методу П. А. Владимировой, отмыты и подсчитаны [3]. Наблюдение продолжали на протяжении 75 дней.

С целью изучения влияния трихинелл на жизнеспособность животных нами были исследованы особенности «поведения в открытом поле». Тест заключается в количественном измерении компонентов поведения животного в новом открытом пространстве, что позволяло оценить динамику и выраженность элементарных поведенческих актов у грызунов в стрессогенных условиях, возникающих в ответ на помещение лабораторного животного в установку, имеющую большую площадь и интенсивность освещения, чем место его повседневного содержания. Мышей помещали в центр «Открытого поля» и засекали время выхода из центрального квадрата. Эмоциональный статус животного оценивали по числу болюсов. Подсчитывали число пересеченных квадратов как показатель горизонтальной двигательной активности, число вертикальных стоек – показатель вертикальной двигательной активности, число дефекаций и уринаций, рассчитывали сумму дефекаций и уринаций. Определяли время реакции замирания, время реакции обнюхивания и время груминга, для изучения возможного влияния токсинов и антигенов трихинелл на центральную нервную систему [9]. Так как значения времени груминга, числа дефекаций и уринаций не подчинялись закону

нормального распределения, сравнение их средних проводили с помощью критерия знаков. При исследовании физиологии поведения крыс методом принудительного плавания с 10 % грузом от массы тела, каждое животное по одному помещали в цилиндр с водой, диаметром 18 см, высотой 40 см, т.е. достаточного размера для того, чтобы они в нем могли свободно плавать. Температуру воды поддерживали в пределах +29 +30 °С. [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента изучалось поведение мышей и выяснилось, что каждое животное совершало движения в различных направлениях, сочетания этих движений разнообразны: были серии пробежек вдоль стенки ОП и только потом – различные повороты и наоборот. Наибольшие различия в группах здоровых и инвазированных мышей отмечены в группе экспериментального моделирования сильного заражения (250±20 личинок трихинелл). Мыши отличались меньшей подвижностью, уменьшалось время груминга, что, по нашему мнению, было обусловлено механическим и токсическим воздействием возбудителя на мышцы и нервную систему.

Инвазированные трихинеллами мыши показали меньшую продолжительность плавания (здоровые животные плавают с 10 % грузом от массы тела более 12 минут, крысы умеренно инвазированные гельминтами плавали 8,5±3 минуты, инвазированные трихинеллами в средней дозе менее 5 минут, при сильной инвазии мыши начинают тонуть вскоре после погружения их в воду, т.е. на плаву находились не более минуты даже при отсутствии груза).

Отмечали увеличение частоты дыхательных движений (ЧДД) и пульса после принудительного плавания: на 8 % дыхания и на 5 % пульса при средней интенсивности инвазии (ИИ), при высокой ИИ пульс возрастал на 7,5 %, а дыхание 11,5 %, что свидетельствует о напряжении систем, обеспечивающих гомеостаз. В связи с тем, что помимо поражения мышц, адаптационные резервы снижены у всех животных, инвазированных трихинеллами, изменяются функции ряда органов и систем. После забоя животных были проведены морфометрические исследования органов иммуногенеза (табл. 1).

Таблица 1
Масса тела и некоторые органые показатели здоровых и зараженных трихинеллами нелинейных мышей (P<0,05*)

№ п/с	Количество личинок на животное	Возраст (сут)	Масса тела при забое	Сердце	Селезенка	Печень
1	50±5	65	21,2±0,51*	0,38±0,06*	0,210±0,05*	1,24±0,55*
2	150±15	60	23, 2±0,62*	0,37±0,08*	0,165±0,04*	1,22±0,57*
3	250±20	65	20,1±0,53*	0,37±0,05*	0,140±0,05*	1,11±0,65*
	Контроль	65	24,2±0,57*	0,38±0,05*	0,210±0,05*	1,24±0,45*

При постмортальном исследовании было проведено полное макроморфометрическое описание сердца, селезенки и печени. После извлечения сердце освобождали от сгустков крови и взвешивали на электрических весах, тем самым определяя абсолютную массу. После взвешивания проводилось измерение длины сердца (от места отхождения аорты до верхушки), ширины (расстояние между боковыми поверхностями сердца на уровне оснований желудочков) и толщины сердца (наибольший переднезадний размер, на уровне основания желудочков). На основе полученных результатов определялась форма сердца методом визиографии с определением индекса: сердца $ИС = (\text{ширина} / \text{длина}) \times 100 \%$, сердца. Если индекс был до 65 %, то форму сердца считали конусовидной, от 65 % до 75 % – эллипсовидной, и более 75 % – шаровидной.

При исследовании мышцей контрольной (К) и опытной (ОП) групп были получены следующие результаты: $ИС(К)=57 \%$; $ИС(ОП-1)=60 \%$; $ИС(ОП-2)=62 \%$; $ИС(ОП-3)=65 \%$. Следовательно, форма сердца у здоровых особей и животных, зараженных трихинеллами в дозах 50 и 150 личинок – конусовидная, при сильной ИИ – эллипсовидная. При патанатомических исследованиях многие авторы указывают на развитие миокардитов при трихинеллезе, отмечают миогенную дилатацию желудочков, особенно при осложненных течениях [2, 13, 14].

При исследовании селезенки и печени установлено, что при высокой ИИ масса вышеуказанных органов уменьшается, пропорционально уменьшению массы тела (табл.1). При инвазии 50 и 150 личинками трихинелл масса печени практически не изменяется, а масса селезенки незначительно уменьшается при средней ИИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В настоящее время большинство экспериментальных работ по проблемам трихинеллеза (изучение особенностей патогенеза инвазии, скрининг и доклиническое изучение специфических лечебных и профилактических препаратов) проводится на лабораторных белых мышах, с оценкой ИИ путем подсчета личинок. В то же время тест «принудительное плавание с 10 % грузом от массы тела» позволяет оценить степень пораженности мышц и может являться прижизненным маркером уровня (интенсивности) инвазии.
2. Выявлены закономерности манифестации при увеличении дозы личинок, основных качественных и количественных морфо-функциональных параметров при экспериментальной инвазии *T. spiralis* в виде изменения массы тела животного и некоторых органов. Известно, что личинки не развиваются в миокарде из-за особенностей структуры кардиомиоцитов, однако при высокой ИИ, механическое и токсическое воздействие трихинелл приводят к развитию миокардита, с последующими дистрофическими изменениями и развитием некроза мышечных волокон [2, 13, 14]. Таким образом ИС может применяться для оценки тяжести патологических процессов в миокарде при моделировании инвазии.
3. Высокая информативность, малая трудоемкость и быстрое осуществление тестов «поведение в открытом поле» и «принудительное плавание животных»

обеспечивают ускорение оценки течения трихинеллеза и снижение затрат на проведение исследований.

Список литературы

1. СанПиН 3.2.3215-14 "Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации".
2. Березанцев Б. А. Трихинеллез / Березанцев Б. А. – Лен.Мед., 1974. – 164с.
3. Владимирова П. А. Влияние различных факторов на ускорение процесса переваривания мышц в искусственном желудочном соке для выявления личинок трихинелл в свинине. Диссертация на соискание уч. степени кан. вет. наук. / Владимирова П. А. – М., 1965 – 167 с.
4. Жданова О. Б. Паразитозы плотоядных (патогенез, иммуноморфология и диагностика): дис. ... д-ра биол. наук. / Жданова О. Б. – М., 2007. – 429 с.
5. Мартусевич А. К. Биокристалломика в паразитологии: современное состояние, возможности и перспективы / Мартусевич А. К., Жданова О. Б., Написанова Л. А. // Российский паразитологический журнал. – 2012. – № 4. – С. 77–88.
6. Мартусевич А. К. Информативность исследования свободного кристаллообразования при зоонозах на модели лабораторных животных / Мартусевич А. К., Жданова О. Б. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион – 2006. – № 1. – С. 30–39.
7. Мартусевич А. К. О кристаллогенезе биосубстратов животных / Мартусевич А. К., Жданова О. Б., Зверева Т. А. // Вятский медицинский вестник. – 2006. – № 3–4. – С. 33–38.
8. Мартусевич А. К. Особенности свободного кристаллогенеза мочи здоровых и зараженных гельминтами грызунов / Мартусевич А. К., Жданова О. Б. // Труды Всероссийского НИИ гельминтологии им. К. И. Скрябина. – 2007. – Т. 45. – С. 153.
9. Мартусевич А. К. Анализ физико-химических свойств антигенов некоторых гельминтов как технология паразитологической метабономики. / Мартусевич А. К., Жданова О. Б., Хайдарова А. А., Березко В. К., Написанова Л. А. // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12–7. – С. 1437–1441.
10. Мутошвили Л. Р. Изучение активности животных в тестах принудительного плавания и открытого поля при нематодозах. / Мутошвили Л. Р., Жданова О. Б., Ашихмин С. П. // В сборнике: Современные Научно-Практические Достижения в Ветеринарии Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции. – 2017. – С. 43–45.
11. Написанова Л. А. Трихинеллез: некоторые аспекты его мониторинга и профилактики. / Написанова Л. А., Жданова О. Б., Ашихмин С. П., Окулова И. И., Андреев О. Н., Хайдарова А. А. // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2016. – № 17 (17). – С. 280–282.
12. Миронова А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронова и др. – Минздрав РФ, «Гриф», Москва – 2012. – 944 с.
13. Тихонова Е. П. Случай инфекционного миокардита при трихинеллезе / Тихонова Е. П., Кузьмин Т. Ю., Сергеев И. В. и др. // Сибирское обозрение. – 2014. – С. 91–100.
14. Скворцов В. В. Миокардиты / Скворцов В. В., Одинцов В. В., Тумаренко А. В. // Российский кардиологический журнал – 2009. – №1 (75) – С.87–96.
15. Zhdanova O. B. The possibility of using trichinella spiralis as an experimental model in the field of high dilutions International / Zhdanova O. B., Haidarova A. A., Napisanova L. A., Rossohin D., Lozhnicina O. // Journal of High Dilution Research. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 60–61.
16. Rudneva O. V. The Role Of Immunocorrection At The Treatment Of Experimental Trichinosis / Rudneva O. V., Napisanova L. A., Zhdanova O. B., Rassohin D. V. // Gistologiya. klinicheskaya i ehksperimental'naya morfologiya, sbornik trudov vtoroj nauchno-prakticheskoy konferencii studentov i molodyh uchenyh s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoj 30-letiyu Kirovskogo GMU. – 2017. – S. 69–70.

SOME MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF MICE EXPERIMENTAL INFECTED *T. SPIRALIS* IN THE DIFFERENT DOSES

Zhdanova O. B.^{1,2}, Napisanova L. A.¹, Mutoschvili L. R.², Ashichmin S. P.²

¹All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation

²Kirov State Medical University, Kirov, Russian Federation

E-mail: oliabio@yandex.ru

Trichinellosis is one of the most dangerous zoonosis. The disease caused by the gastrointestinal nematode *Trichinella spiralis* occurs in humans, domestic animals and wild animals. The best way to prevent trichinosis is to fully cook meat. But many meat delicious have been prepared without high temperature. And in this case it is necessary improve diagnostics of alive animals. The severity of symptoms caused by larval migration from the intestines depends on the number of larvae produced. As the larvae migrate through tissue and vessels, the body's inflammatory response results in muscle pain, fever, and weakness.

They may very rarely cause enough damage to produce serious neurological deficits from antigens of worms entering the brain. Trichinosis can be fatal depending on the number of the larvae; death can occur 4–6 weeks after the infection, and is usually caused by myocarditis. As is desirable with most diseases, early treatment is better and decreases the risk of developing disease. If larvae do encyst in skeletal muscle cells, they can remain infectious for months to years. That is why it is necessary study some symptoms of this stage for optimal therapy and prophylaxis.

Infection is typically treated with antiparasitic medication also the immunostimulatory drugs in recent years are widely used for helminthiasis in parasitology. Laboratory mice used for study therapy against trichinosis, that can affect the muscle phase of the parasite *T. spiralis* in mice. An assay was carried out on 40 white outbred mice. These were divided into 4 groups of ten mice each.

The group 1 was a control; mice of the group 2 were inoculated with a dose of 50 ± 5 units of *T. spiralis* larva per mouse; mice of the group 3 – 150 ± 15 larvae, mice of the group 4 – 250 ± 20 laevae.

There was the comparison of the mass of mice and some organs: heart, liver and spleen. In particular, the greatest variations are registered by us in the analysis of mass of heart, and form of heart in mice with dose 250 ± 20 larvae / mous (high invasion HI)

The result of behavior in the open field and swimming were different from healthy animals.

The behavior of mice of the 4-th group (HI) was different from another group: they moved a little and the grooming decreased. The time swimming of healthy mice was more than infected mice. Also mice of 4-th group floated less a minute and quickly began to sink.

Regularities of a demonstration of the key qualitative and quantitative morfo-functional parameters at an experimental invasion of *T. spiralis* are revealed.

Keywords: mice, therapy, parasite, *T. spiralis*, heart, liver, spleen

References

1. SanPiN 3.2.3215-14 "Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации".
2. Berezancev B. A. *Trihinellez*, 164 s. (Len.Med., 1974).
3. Vladimirova P. A. *Vliyanie razlichnyh faktorov na uskorenie processa perevarivaniya myshc v iskusstvennom zheludochnom soke dlya vyyavleniya lichinok trihinell v svinine*. Dissertaciya na soiskanie uch. stepeni kan. vet. nauk., 167 s. (M., 1965).
4. Zhdanova O. B. *Parazitozы plotoyadnyh (patogenez, immunomorfologiya i diagnostika)*: dis. ... d-ra biol. Nauk, 429 s. (M., 2007)
5. Martusevich A. K., Zhdanova O. B., Napisanova L. A. Biokristallomika v parazitologii: sovremennoe sostoyanie, vozmozhnosti i perspektivy, *Rossijskij parazitologicheskij zhurnal*, **4**, 77 (2012).
6. Martusevich A. K., Zhdanova O. B. Informativnost' issledovaniya svobodnogo kristalloobrazovaniya pri zoonozah na modeli laboratornyh zhivotnyh, *Izvestiya vysshih uchebnyh zavedenij. Povolzhskij region*, **1**, 30 (2006).
7. Martusevich A. K., Zhdanova O. B., Zvereva T. A. O kristallogeneze biosubstratov zhivotnyh, *Vyatskij medicinskij vestnik*, **3-4**, 33 (2006).
8. Martusevich A. K., Zhdanova O. B. osobennosti svobodnogo kristallogeneza mochi zdorovyh i zarazhennyh gel'mintami gryzunov, *Trudy Vserossijskogo NII gel'mintologii im. K. I. Skryabina*, **45**, 153 (2007).
9. Martusevich A. K., Zhdanova O. B., Hajdarova A. A., Berezhko V. K., Napisanova L. A. Analiz fiziko-himicheskikh svojstv antigenov nekotoryh gel'mintov kak tekhnologiya parazitologicheskoy metabolomiki, *Fundamental'nye issledovaniya*, **12-7**, 1437 (2014).
10. Mutoshvili L. R., Zhdanova O. B., Ashihmin S. P. Izuchenie aktivnosti zhivotnyh v testah prinuditelnogo plavaniya i otkrytogo polya pri nematodozah. V sbornike: *Sovremennye nauchno-prakticheskie dostizheniya v veterinarii, Sbornik statej Vserossijskoy nauchno-prakticheskoy konferencii*, 43 (2017).
11. Napisanova L. A., Zhdanova O. B., Ashihmin S. P., Okulova I. I., Andreyanov O. N., Hajdarova A. A. Trihinellez: nekotorye aspekty ego monitoringa i profilaktiki, *Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami*, **17 (17)**, 280 (2016).
12. Mironova A. N. i dr., *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv*, 944 s. (Minzdrav RF, «Grif», Moskva, 2012).
13. Tihonova E. P., Kuz'min T. YU., Sergeev I. V. i dr. Sluchaj infekcionnogo miokardita pri trihinelleze, *Sibirskoe obozrenie*, 91 (2014).
14. Skvorcov V. V., Odincov V. V., Tumarenko A. V. Miokardity, *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal*, **1 (75)**, 87 (2009).
15. Zhdanova O. B., Haidarova A. A., Napisanova L. A., Rossohin D., Lozhnicina O. The possibility of using trichinella spiralis as an experimental model in the field of high dilutions, *International Journal of High Dilution Research*, **14, 2**, 60 (2015).
16. Rudneva O. V., Napisanova L. A., Zhdanova O. B., Rassohin D. V. The role of immunocorrection at the treatment of experimental trichinosis, *Gistologiya. klinicheskaya i ehksperimental'naya morfologiya*, sbornik trudov vtoroj nauchno-prakticheskoy konferencii studentov i molodyh uchenyh s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoj 30-letiyu Kirovskogo GMU, 69 (2017).