

УДК 57.016.4:57.05

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-3-32-38

Погребняк Т.А.¹
Горшков Г. И.²

**К МЕТОДИКЕ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ПТИЦ
К ДЕЙСТВИЮ НЕЙРОГЕННЫХ СТРЕССОРОВ**

1) доцент кафедры биологии, кандидат биологических наук, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия,

E-mail: pogrebnyak@bsu.edu.ru

2) профессор кафедры морфологии и физиологии, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина», ул. Вавилова, 1, п. Майский, Белгородский район, Белгородская область, 308503, Россия, *E-mail: pogrebnyak@bsu.edu.ru*

Аннотация

В работе подробно изложена методика экспериментального изучения механизмов адаптации домашних птиц к действию нейрогенных стрессоров в условиях моделей острого (трехсуточного) и хронического (скученности) нейрогенного стресса. Описаны стереотаксический эксперимент вживления микроэлектродов в глубинные структуры мозга (передний и задний отделы гипоталамуса, гиппокамп, ретикулярную формацию головного мозга). Изложена схема записи электрокардиограммы (ЭКГ) и электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и соответственно оценка электрической активности миокарда сердца и структур мозга. Изложен процесс моделирования острого и хронического стресса; обоснован выбор точек контроля и коррелятов функционального состояния птиц в процессе стрессирования и адаптации к действию стрессора.

Ключевые слова: модели нейрогенного стресса; стереотаксическая методика; параметры электрической активности ЭЭГ и ЭКГ; корреляты нейрогенного стресса

Pogrebnyak T.A.,¹
Gorshkov G.I.²

**TO THE METHOD OF STUDY OF THE BIRDS ADAPTATION MECHANISMS
TO THE INFLUENCE OF NEUROGENIC STRESSORS**

1) PhD in Biology, Associate Professor, Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia, *E-mail: pogrebnyak@bsu.edu.ru*

2) Doctor of Science in Biology, Professor of the Department of Morphology and Physiology, Belgorod State Agricultural University named after V. Gorin, 1 Vavilov St., Mayskiy v., Belgorod district, Belgorod region, 308503, Russia
E-mail: pogrebnyak@bsu.edu.ru

Abstract

The method of experimental study of the adaptation mechanisms of poultry to the effect of neurogenic stresses in the conditions of acute (three-day) and chronic (density) neurogenic stress models is stated in detail in the paper. Stereotaxic experiment of microelectrodes implantation in the deep structures of the brain (front and back parts of the hypothalamus, hippocampus, reticular formation) is described. The schemes of the electrocardiogram and electroencephalogram registration are stated and the estimation of the electrical activity of the heart myocardium and brain structures is described. The process of acute and chronic stress modeling is stated; the choice of the points of control and correlates of birds' functional state during the stress and the adaptation to the stressor influence is founded.

Key words: neurogenic stress models; stereotaxic method; electrical activity parameters EEG and ECG; correlate of neurogenic stress

Промышленное птицеводство является наиболее динамичной отраслью агропромышленного производства. Её эффективность и продуктивность связаны с модернизацией естественных технологий выращивания птицы, внедрением биологически активных соединений (лекарственных препаратов, кормовых добавок,

витаминов и др.), основанных на целесообразности их применения и тестирования безопасности [2]. Оценить текущее психоэмоциональное состояние и поведение птиц, механизмы регуляции их приспособления к условиям выращивания, обоснование проведения профилактических мероприятий по предупреждению стрессов и

заболеваний у птиц различной природы позволяют нейрофизиологические исследования [9].

Цель работы: описать методику подготовки птиц к нейрофизиологическому эксперименту исследования механизмов адаптации организма птиц к нейрогенным стрессам, схему проведения, выбор и анализ коррелятов функционального статуса птиц в условиях нейрогенных стрессов.

Материалы и методы исследования

Ключевым объектом исследования являлась динамика ЭА структур головного мозга и сердца 46 половозрелых петухов белой русской породы в возрасте 1-1,5 года при их адаптации к условиям десинхронозов. Объём и этапы выполнения работы представлены в табл. 1.

Петухов содержали с соблюдением основных зоогигиенических норм: в принудительно вентилируемом помещении в одиночных одноярусных проволочных клетках с сетчатым полом площадью 1350 см², со свободным

доступом к корму и воде, получали сбалансированный рацион по нормам ВНИТИП.

В I серии проведено 3 варианта опытов (см. табл. 1). Для определения временных этапов и подготовки птиц к электрофизиологическому эксперименту: купирования задней части гребня; стереотаксической техники вживления электродов в Нрт_н и Нрт_з, Нip, РФсм; изготовления, визуального и микроскопического анализа микротомных срезов головного мозга для корректировки координат изучаемых структур мозга у петухов данной породы; запись и анализ ЭЭГ и ЭКГ. На этом этапе исследования определяли и оценивали корреляты физиологического и стрессового состояния животных – уровень гликемии в периферической крови [4]; ЭКГ-показатели активности сердца [1, 13]; ЭЭГ-активности структур ЦНС [3, 6]; выраженность стереотипного поведения, оценки габитус и поедаемости корма [1, 9].

Таблица 1

Схема исследования

Table 1

The scheme of the study

Серия и варианты опытов	Число птиц	Оценка поведения	Габитус		Уровень гликемии	Запись и анализ	
			Состояние оперения	Живая масса		ЭКГ	ЭЭГ
Отработка методик исследования	6	+	+	+	+	+	+
I серия							
Оценка общего состояния птиц:							
а) в физиологических условиях;	8	+	+	+	+	+	-
б) на 8-е сут после операции по удалению части гребня;	8	+	+	+	+	+	-
в) на 8-е сут после вживления электродов в структуры мозга	8	+	+	+	+	+	+
II серия							
Фотодесинхроноз (острый стресс):							
а) интактная группа (контроль);	6	+	+	+	+	-	-
б) подопытная группа:							
– до стрессирования (фон);	10	+	+	+	+	+	+
– в ходе стрессирования;	10	+	+	+	+	+	+
– на 1, 3, 7, 15, 23 и 30-е сут после перевода птиц на естественный фоторежим (опыт)	10	+	+	+	+	+	+
III серия							
Скученность (хронический стресс):							
а) интактная группа (контроль);	6	+	+	+	+	-	-
б) подопытная группа:							
– до стрессирования (фон);	10	+	+	+	+	+	+
– на 1, 3, 7, 15, 23 и 30-е сут скученности (стрессирования, опыт)	10	+	+	+	+	+	+

При подготовке животных к эксперименту большое внимание уделялось хэндлингу, поэтому опыты проводили в одно и то же время суток: петухов взвешивали до кормления и взятия крови на анализ – с 8⁰⁰ до 9⁰⁰, запись ЭКГ и ЭЭГ – с 10⁰⁰ до 14⁰⁰ часов. Кровь получали капельно из гребня. Уровень гликемии определяли в периферической крови птиц по цветной реакции орто-толуидиновым реактивом. Габитус оценивали по

живой массе, плотности перьевого покрова, состоянию маховых перьев первого порядка – объективным показателям выраженности стресс-состояния у кур [2].

ЭКГ записывали в течение 3-5 мин. в горизонтальной плоскости – оба крыла, левая нога [13], в трех стандартных отведениях на ЭКГТ-02 (рис. 1) через 25 мин. после помещения животных в станок.

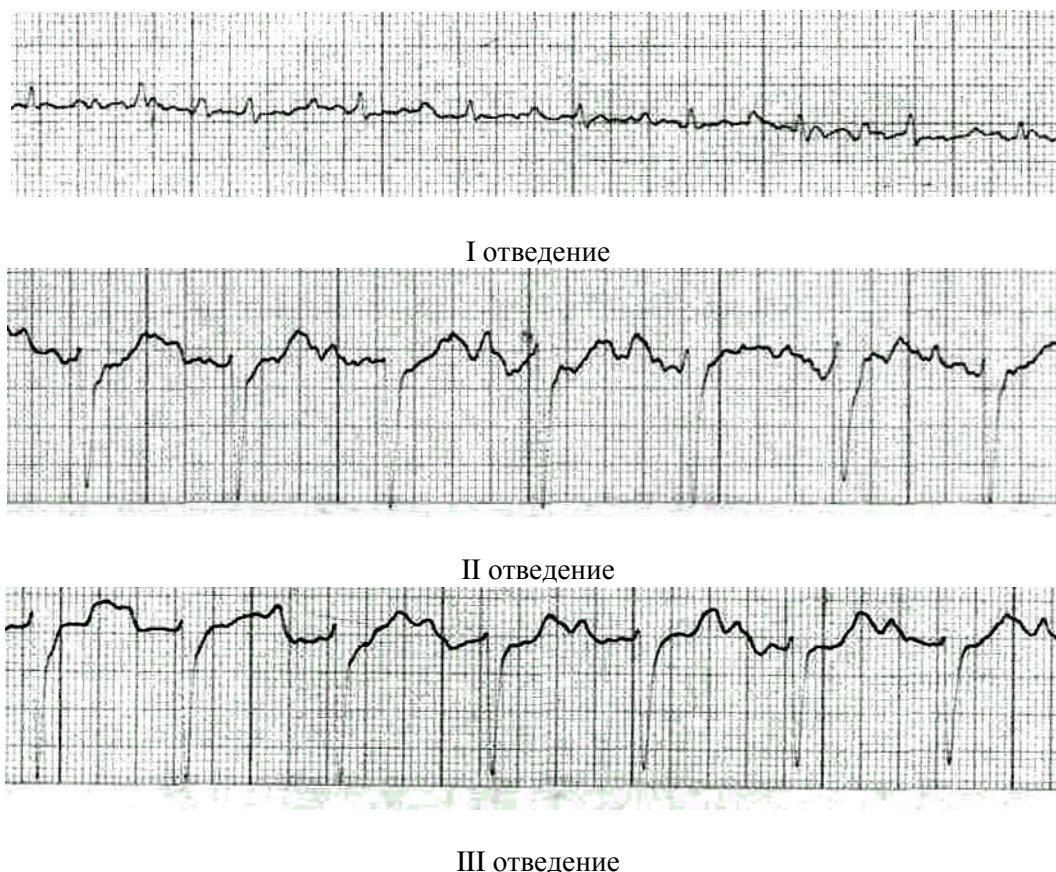


Рисунок 1. ЭКГ петуха 12 в трех стандартных отведениях
Figure 1. Electrocardiogram of the cock 12 in the three standard leads

Во время регистрации ЭКГ и ЭЭГ петухи находились в специально изготовленном станке в относительно звукоизолированной камере с постоянной освещенностью, равной 500 лк. Поскольку ограничение активных движений отражается на кривой ЭЭГ глубинных структур мозга в виде депрессии θ -ритма [6], птицу фиксировали в станке только в области цевки с сохранением естественного рефлекса – опоры тела на нижние конечности [3]. Такой характер фиксации в станке позволял петухам свободно изменять позу (положение головы, крыльев,

туловища), не нарушая тем самым частотно-амплитудную структуру ЭА на ЭЭГ.

Визуально расшифровывали ЭКГ II отведения (от правого крыла и левой ноги) [1] как совокупность комплексов PQrST с минимальными интервалами T-P, отражающими диастолический статус миокарда (рис. 2).

На основе полученных количественных и качественных ЭКГ-параметров рассчитывали: интегральный показатель (ИП) – процентное отношение амплитуды зубцов P и T; систолический показатель (СП) по формуле Фогельсона-Черногорова: $(Q-T) / (rS-rS) \cdot 100 \%$.

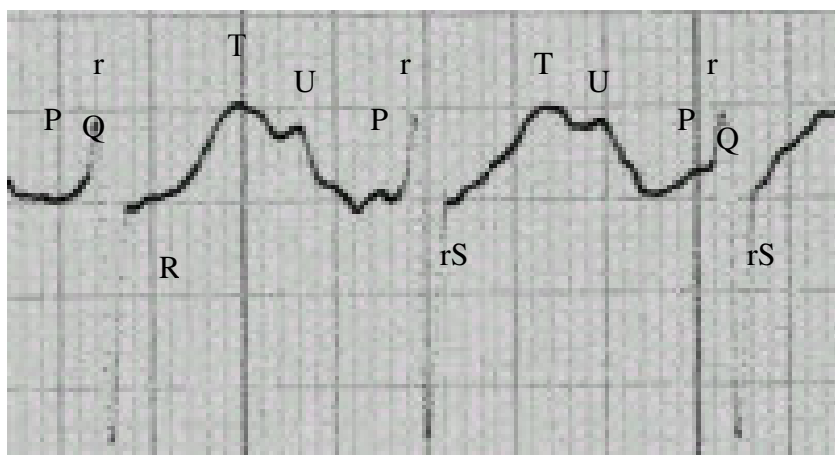


Рисунок 2. Фрагмент фоновой электрокардиограммы петуха № 7: зубцы ЭКГ – P, Q, rS, T, U (II отведение)
Figure 2. The fragment of the background electrocardiogram of the cock №7: P, Q, rS, T, U waves (II lead)

Поскольку купирование гребня является для петухов кратковременным стресс-воздействием, то предварительно за 2 дня до операции птицы с кормом получали резерпин (1,5 мг на кг массы тела), дающий адаптивный эффект [9]. В течение этой операции (5-10 минут) петухи находились в состоянии животного гипноза. В ходе операции использовали термический коагулятор и раствор пергидроля. Физиологическое состояние петухов оценивали на 8-е сут, после затухания естественной реакции их организма на данную операцию [9]. Затем вводили биполярные электроды в глубинные структуры головного мозга – Нрт_n, Нрт₃, РФсм и Нip с помощью стереотаксического микроманипулятора для крыс [6].

Определяли стереотаксические координаты глубинных структур мозга с учетом их значений по атласу мозга кур [18]. За нулевую точку

отсчета были приняты координаты пересечения лямбды с сагиттальным швом. Полученные данные представлены в табл. 2.

Нихромовые электроды диаметром 100 мкм со стеклянной изоляцией по всей длине, кроме кончика, вживляли в условиях строгой асептики под общим нембуталовым наркозом (внутримышечно в дозе 60 мг/кг живой массы). Состояние наркоза контролировали сдавливанием бородки и гребня. Индифферентный электрод закрепляли в теменной кости черепа. Положение электродов фиксировали самозатвердевающим норакрилом. Петухи легко выходили из состояния наркоза с последующим восстановлением у них стереотипных поведенческих реакций в течение 2-3-х суток. На 8-е сутки после вживления электродов в структуры мозга оценивали физиологический статус петухов по параметрам ЭЭГ.

Таблица 2

Координаты погружения электродов в структуры головного мозга кур [9]

Table 2

Coordinates of the electrodes embedding in the structures of the chicken brain

Расстояние от кончика электрода до основной плоскости	Область вживления электродов			
	Нрт _n	Нрт ₃	Нip	РФсм
Сагиттальное расстояние, отсчет от нулевой плоскости (F), мм	- 18,0	- 16,0	- 13,0	- 11,0
Расстояние во фронтальной плоскости, отсчет от сагиттального шва (L), мм	1,0	1,0	1,0	1,0
Глубина погружения электрода, отсчет от нулевой плоскости (H), мм	-(9,5-10,0)	-(8,0-8,5)	-(3,0-3,5)	-(12,5-13,0)

По завершении опытов морфологически контролировали локализацию электродов: петухам вводили летальную дозу нембутала, затем через вживленные электроды пропускали анодный ток силой 5-10 мА в течение 10-15 с для получения электролитических меток. Головной

мозг фиксировали в 5%-ном растворе формалина в течение 7 суток. На замораживающем микротоме изготавливали срезы мозга, устанавливая по ним точную локализацию вживленных электродов сначала визуалью и при микроскопировании (рис. 3) [9].

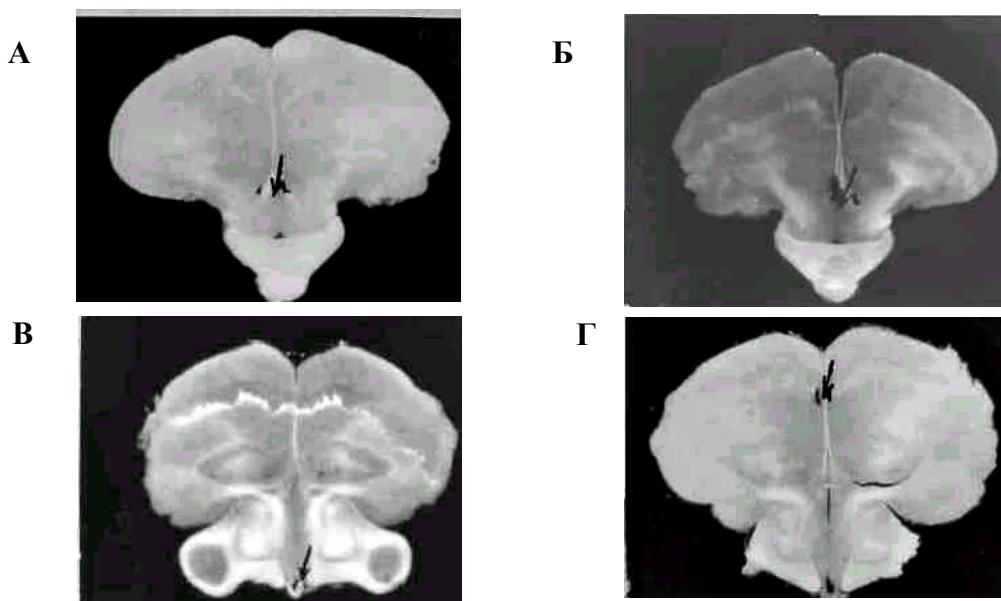


Рис. 3. Фронтальный срез мозга на уровне: А – переднего отдела гипоталамуса, В – гиппокампа, Г – ретикулярной формации среднего мозга; стрелки указывают место локализации вживленных электродов
Figure 3. Frontal section of the brain at the level: А – the front part of the hypothalamus; В – hippocampus; Г – reticular formation of the mesencephalon; the arrows indicate the place of the localization of embedded electrodes

Записывали ЭЭГ в течение 3-5 мин биполярно с использованием электроэнцефалографа ЭЭПГ 4-02 через 20 мин после помещения птицы в станок в состоянии спокойного бодрствования (СБ) и дремоты (Д) [3].

Особенности стереотипных поведенческих реакций отмечали на её кривой ЭЭГ – эмоциональное состояние, двигательную активность, позу птицы в станке. Обработывали её 10-секундные безартефактные эпохи, зафиксированные до закрытия глаз (СБ) и сразу же после их закрытия (Д), так как именно в эти моменты организм птиц минимально был подвержен внешней афферентации.

При обработке ЭЭГ использовали визуальный анализ нативных ЭЭГ и определение частотно-амплитудных характеристик ЭА [6, 14]. К α -подобной активности мы относили быстрые волны с частотой 8-13 кол./с, к θ -активности – медленные волны с повторяемостью на кривой 4-7 кол./с, к δ -активности – более медленные потенциалы с частотой 1-3 кол./с. Определяли общую ЧП; δ -фактор, α - и θ -индексы как процент времени, которое соответствующая им активность занимает на кривой ЭЭГ; амплитуду α -, θ - и δ -волн на основе усреднения пяти минимальных и максимальных их замеров [9]. Интерпретация полученных информационных ЭЭГ-показателей ЭА структур головного мозга проведена с учетом описания и анализа её

параметров у позвоночных – млекопитающих, птиц, рептилий [3, 6, 7, 14].

К десинхронизации ЭА относили усиление быстрой α -подобной активности и подавление более медленных θ - и δ -волн со снижением амплитуд всех колебаний, к синхронизирующим процессам – подавление быстрой α -подобной активности и усиление медленных θ - и δ -диапазонов с ростом амплитуды их волн. Усиление выраженности ЭА за счет значительного повышения амплитуды волн при одновременном снижении общей ЧП рассматривали как реакцию гиперсинхронизации [9, 14].

Для создания реалистических моделей нейрогенного стресса использовали хронобиологический методологический подход, направленный на сдвиг суточных эндогенных и приобретенных ритмов поведенческих и физиологических процессов организма. Нарушение ритмичности функций организма рассматривали как результат их рассогласования между собой или внешними синхронизаторами, состояния поиска успешной адаптации (физиологический десинхроноз) или развития дезадаптации (патологический десинхроноз) [15].

Во второй серии опытов изучали влияние на физиологический статус птиц острого десинхроноза (фотодесинхроноза), а в третьей – хронического десинхроноза (30-суточной скученности) на динамику ЭА структур головного мозга и сердца, поведенческих

реакций, уровня гликемии, массы тела и поедемости корма [2].

Оценка физиологического статуса опытных и контрольных петухов, постоянно находящихся в физиологически комфортных условиях, осуществлялась по указанным точкам в схеме эксперимента (табл. 1). Контрольные точки установлены с учетом динамики висцеральных функций у птиц [5]: гормонального фона у кур и цыплят в условиях сдвига суточного фоторежима [8], уровня гормонов при иммобилизации у цыплят [16] и в условиях гиподинамии кур [17].

Проводили парный корреляционный анализ для оценки статуса петухов во всем его многообразии количественно-качественных показателей и их характеристик, выявления регуляторных связей между маркерами стресса и адаптации (уровнем гликемии в крови, ЭКГ- и ЭЭГ-показателями) для определения направленности сдвигов ЭА и функций структур мозга в условиях десинхронозов [9]. Сопряженность сдвигов ЭА изучаемых структур ЦНС с уровнем гликемии оценивали как отражение их центральных взаимоотношений, реализуемых через периферическое вегетативное звено регуляции висцеральных и соматических функций организма, определяя его адаптивность к среде [3, 5, 7, 13, 14]. Для интерпретации этих данных использовали коэффициенты парных корреляций при их значении не менее 0,66 ($p < 0,05$; $n = 10$) и 0,71 ($p < 0,05$; $n = 8$) [10].

Заключение

Результаты выполненного нами нейрофизиологического исследования механизмов адаптации домашних птиц к условиям острого и хронического десинхроноза показало наличие достоверных корреляций:

1) между уровнем гликемии в периферической крови, как с индексами и амплитудой волн электрической активности мозга, так и длительностью интервалов и высотой зубцов ЭКГ;

2) между изучаемыми параметрами электрической активности ЭКГ и ЭЭГ глубинных структур мозга [11, 12].

Поэтому отсутствие возможности применить технику стереотаксиса для вживления микроэлектродов в глубинные структуры мозга для записи ЭЭГ не является препятствием для проведения исследований по данной проблеме. Считаем, что учет стереотипных, поведенческих реакций и параметров ЭКГ с анализом их прямых и обратных связей с биохимическими

корреляторами интенсивности метаболизма (уровня гликемии) позволяют изучать их психоэмоциональный статус и нейрофизиологические механизмы адаптации птиц к стрессорам. Функционирование нервной системы птиц подчинено тем же закономерностям, как и у млекопитающих, но в условиях нейрогенного стресса, особенно хронического, их эволюционно обусловленные адаптации к полету, даже у нелетающих птиц, при развитии адаптаций к стрессору связаны с усиленной активацией парасимпатического отдела вегетативной нервной системы.

Список литературы

1. Аринчин Н.И. Эволюция и клиническое толкование электрокардиограммы и фаз сердечного цикла. Минск: Беларусь, 1966. 221 с.
2. Данилова А.К. Найденский М.С., Шпиц И.С., Яворский В.С. Гигиена промышленного производства яиц. М.: Россельхозиздат, 1987. 279 с.
3. Карманова И.Г. Эволюция сна. Л.: Наука, 1977. 176 с.
4. Квиткин Ю.П., Федерченко Н.Г., Кривцов И.Л. Стресс сельскохозяйственной птицы. Обзорная информация. М., 1977. 58 с.
5. Колпаков М.Г. Механизмы кортикостероидной регуляции функций организма. Новосибирск: Наука, 1978. 245 с.
6. Кратин Ю.Г., Гусельников В.И. Техника и методика электроэнцефалографии. Л.: Наука, 1971. 240 с.
7. Латаш Л.П. Гипоталамус, приспособительная активность и электроэнцефалограмма. М., 1968. 296 с.
8. Матюшников В.В. Естественная резистентность сельскохозяйственной птицы. М.: Россельхозиздат, 1985. 160 с.
9. Погребняк Т.А., Воробьева Т.М., Липунова Е.А. Методика изучения центральных нервных механизмов адаптации птиц к стрессовым воздействиям. Харьков, 1990. 10 с.
10. Погребняк Т.А. Корреляционный анализ биоэлектрической активности структур ствола мозга и вегетативных функций в процессе адаптации птиц к стрессору // Приспособления организмов к действию экстремальных экологических факторов». Белгород: БелГУ. 2002. С. 62-69.
11. Погребняк Т.А., Горошков Г.И. Особенности регуляции электрической активности сердца птиц в условиях модели экспериментального десинхроноза. // Научный результат. Серия «Физиология». 2014. №1. С. 63-70.
12. Погребняк Т.А. Особенности адаптации птиц к действию нейрогенных стрессов в условиях реалистических моделей десинхроноза // Научный результат. Физиология. 2015. Том 1. № 1. С.40-47.
13. Рощевский М.П. Эволюционная электрокардиография. Л., 1972. 252 с.

14. Суворова В.В. Психофизиология стресса. М.: Педагогика, 1975. 208 с.

15. Хетагурова Л.Г. Хронопатофизиология системы гемостаза // Хронобиология и хрономедицина. М.: «Триада-Х», 2000. С. 140-187.

16. Fitko R., Jakubowsky K., Roszko E., Potrzuska I., Zielinsky H. Narastanie opornosci kurczat do przewleklego powtarzanego stresu // Med. Wet., 1992. Vol. 48. № 1. С. 29-31.

17. Nvota J. Effect of hypokinesia on physiological functions of the demestic fowl. 1980. Pp. 211-229.

18. Tienhoven van A., Jahas L.P. The chicken telencephalon, diencephalons and mesencephalon in stereotaxic coordinates // J. Comp. Neurol. 1962. Vol. 118. N 2. Pp. 185-197.

References

1. Arinchin N.I. Evolution and clinical interpretation of the electrocardiogram and the phases of cardiac cycle. Minsk: Belarus, 1966. 221 p.

2. Danilova A.K. Najdenskij M.S., Shpic I.S., Javorskij V.S. Hygiene of industrial production of the eggs. M.: Rossel'hozizdat, 1987. 279 p.

3. Karmanova I.G. Evolution of the sleep. L.: Science, 1977. 176 p.

4. Kvitkin Ju.P., Federchenko N.G., Krivcov I.L. Stress of the farming poultry. Review information. M., 1977. 58 p.

5. Kolpakov M.G. Mechanisms of the corticosteroid regulation of the organism's functions. Novosibirsk: Science, 1978. 245 p.

6. Kratin Ju.G., Gusel'nikov V.I. Technique and method of electroencephalography. L.: Science, 1971. 240 p.

7. Latash L.P. Hypothalamus, adaptive activity and electroencephalogram. M., 1968. 296 p.

8. Matjushnikov V.V. Natural resistance of the farming poultry. M.: Rossel'hozizdat, 1985. 160 p.

9. Pogrebnyak T.A., Vorob'eva T.M., Lipunova E.A. Method of study of the central nervous mechanisms of bird adaptation to the stress influences. Kharkov, 1990. 10 p.

10. Pogrebnyak T.A. Correlation analysis of bioelectrical activity of the brainstem structures and vegetative functions during the birds adaptation to the stressor // Adaptation of the organisms to the influence of extreme ecological factors. Belgorod: BelSU. 2002. Pp. 62-69.

11. Pogrebnyak T.A., Goroshkov G.I. The features of the regulation of the electrical activity of the birds heart in the conditions of experimental desynchronose model // Research result. Physiology Series. 2014. N. 1. Pp. 63-70.

12. Pogrebnyak T.A. The peculiarities of birds adaptation to the influence of the neurogenic stresses in the conditions of the desynchronose realistic models // Research result. Physiology Series. 2015. Vol. 1. N. 1. Pp.40-47.

13. Roshhevskij M.P. Evolutional electrocardiography. L., 1972. 252 p.

14. Suvorova V.V. Psychophysiology of the stress. M.: Pedagogics, 1975. 208 p.

15. Hetaгурова Л.Г. Chronopathophysiology of the hemostasis system // Chronobiology and chronomedicine. M.: «Триада-Х», 2000. Pp. 140-187.

16. Fitko R., Jakubowsky K., Roszko E., Potrzuska I., Zielinsky H. Narastanie opornosci kurczat do przewleklego powtarzanego stresu // Med. Wet., 1992. Vol. 48. № 1. С. 29-31.

17. Nvota J. Effect of hypokinesia on physiological functions of the demestic fowl. 1980. Pp. 211-229.

18. Tienhoven van A., Jahas L.P. The chicken telencephalon, diencephalons and mesencephalon in stereotaxic coordinates // J. Comp. Neurol. 1962. Vol. 118. N 2. Pp. 185-197.