

УДК 612.822.04

КОРТИКОСТЕРОН КРОВИ И ЛИКВОРА У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ В ОТКРЫТОМ ПОЛЕ ПРИ СТРЕССОРНОЙ НАГРУЗКЕ**Умрюхин П.Е., Григорчук О.С.**¹*Первый московский государственный медицинский университет**им. И.М. Сеченова, Москва, e-mail: o.grigorchuk@nphys.ru;*²*НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, e-mail: o.grigorchuk@nphys.ru*

Работа посвящена изучению изменения концентрации кортикостерона в крови и цереброспинальной жидкости у активных и пассивных в открытом поле крыс. Обнаружено, что активные крысы отличаются достоверно более низкой концентрацией кортикостерона в плазме крови по сравнению с пассивными животными. Трехчасовая иммобилизация вызвала достоверное увеличение концентрации кортикостерона в крови только у активных крыс. Уровень кортикостерона в цереброспинальной жидкости после стрессорной нагрузки оказался примерно в 30 раз ниже, чем в плазме крови. Концентрация кортикостерона в цереброспинальной жидкости у активных и пассивных крыс достоверно не различалась. У пассивных в тесте открытого поля животных отмечена тенденция к большему объему образцов цереброспинальной жидкости, которые удавалось получить в эксперименте.

Ключевые слова: эмоциональный стресс, кортикостерон, кровяное давление, открытое поле, ликвор**BLOOD AND LIQUOR CORTICOSTERONE LEVEL IN THE RATS WITH DIFFERENT OPEN FIELD BEHAVIOR: EFFECTS OF THE STRESS****Umriukhin P.E., Grigorchuk O.S.**¹*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow e-mail: o.grigorchuk@nphys.ru;*²*P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow e-mail: o.grigorchuk@nphys.ru*

It is found, that the active in the open field (low-anxiety) rats in control conditions before stress are characterized by the lower corticosterone concentration in the blood plasma in comparison with the passive in the open field (emotional) animals. Acute 3 hour immobilization stress induces the significant corticosterone concentration increase only in the group of active rats. Corticosterone concentration in the liquor after immobilization stress was approximately 30 times lower than in the blood plasma. No differences in the corticosterone concentration were found after the immobilization stress between the active and passive rats neither in the liquor, nor in the blood plasma.

Keywords: emotional stress, corticosterone, blood pressure, open field, liquor

Известно о существовании выраженных индивидуальных различий чувствительности к стрессорным нагрузкам в популяции [3; 13]. Механизмы различной устойчивости к стрессу остаются во многом неизученными. Она зависит от ряда генетических факторов, также определяется неблагоприятными жизненными обстоятельствами, которые организм пережил в детском или взрослом возрасте [7]. Животные с различной устойчивостью к стрессу различаются особенностями электрической активности мозга [6], уровнем кортикостерона в плазме крови [4; 10]. Фундаментальная роль при этом принадлежит гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе, нарушения в ее работе обнаруживаются у 50% больных депрессией [11]. Регуляция гипоталамо-гипофизарной оси в значительной мере обеспечивается глюкокортикоидами в головном мозгу. Кортикостерон обнаружен в цереброспинальной жидкости организма [9], однако его роль в организации механизмов стресса недостаточно изучена. Будучи липофильными соединениями, глюкокор-

тикоиды легко проникают через клеточные мембраны и, несмотря на наличие гематоэнцефалического барьера, кортикостерон способен проникать в мозг. В связи с этим целью исследования стало изучение динамики концентрации кортикостерона в плазме крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) у крыс с разным поведением в тесте открытого поля при стрессорной нагрузке.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы 20 крыс самцов Вистар массой 280–320 г. Животных содержали в условиях свободного доступа к пище и воде, а исследования проводили в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Оценку поведения животных проводили в тесте «открытое поле». После чего осуществляли расчет индекса двигательной активности (ИА) как отношения суммы пересеченных периферических и центральных секторов к сумме латентных периодов первого движения и выхода в центр. К активным (прогностически устойчивым к стрессу) особям были отнесены 14 животных со значением ИА менее 0,8, к пассивным (прогностически предрасположенным к стрессу) – 4 крысы с ИА более 1,5 [1].

Первый забор крови из хвостовой вены осуществляли с использованием кратковременной эфирной анестезии. Плазму отделяли центрифугированием (3000 оборотов/мин в течение 3 мин) и хранили при -80°C . Через двое суток животных помещали в условия конфликтной ситуации, порождающей у них эмоциональный стресс. Ее моделировали с помощью тесного пенала, вызывающего трехчасовую иммобилизацию. В течение этого времени осуществляли постоянный мониторинг АД и ЧСС с помощью неинвазивного метода на установке TSE Non-Invasive Blood Pressure Monitoring System «Fully-Automated», Germany. При этом регистрировали систолическое, диастолическое, среднее $((2(\text{АДд}) + \text{АДс})/3$, где АДд – это диастолическое давление, а АДс – систолическое давление) и пульсовое давление крови, ЧСС. После стрессорной нагрузки осуществляли забор цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) у животных под анестезией хлоралгидратом из большой цистерны головного мозга по ранее разработанной методике [2]. Полученные образцы ликвора быстро замораживали и хранили при -20°C .

Затем проводили повторный забор крови после декапитации животных. Исследование уровня кортикостерона в плазме крови и ликворе в контроле и после стресса проводили методом ИФА с использованием тест-системы «IDS Corticosterone EIA» (Великобритания) на ИФА ридере Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) в соответствии с протоколом производителя. Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программного пакета Statistica 6.0. Для проверки гипотезы о различии независимых выборок использовали непараметрические методы статистического анализа, U-критерий Манна – Уитни и коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

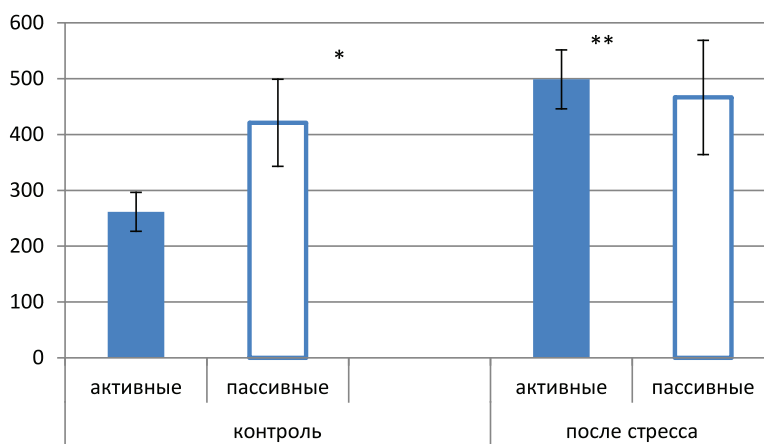
У животных с высокой и низкой поведенческой активностью в тесте открытого поля концентрация кортикостерона в плазме крови достоверно отличалась по данным первого забора крови в обычных условиях домашней клетки. У высокоактивных (прогностически устойчивых в условиях стрес-

сорного напряжения) животных [1] средняя концентрация кортикостерона в плазме крови составила $261,6 \pm 34,9$ нг/мл. У пассивных в открытом поле (предрасположенных к стрессу) особей средняя концентрация кортикостерона равнялась $421,2 \pm 78,0$ нг/мл (рисунок). Таким образом, животные из группы активных отличаются достоверно меньшей концентрацией кортикостерона в плазме крови по сравнению с пассивными крысами ($p < 0,05$).

Средняя концентрация кортикостерона в плазме у активных и пассивных животных в обычных условиях содержания составила $301,5 \pm 36,0$ нг/мл, а после стрессорной нагрузки средний уровень кортикостерона у этих крыс достоверно ($p < 0,005$) вырос до $491,7 \pm 45,5$ нг/мл. Однако у пяти животных из восемнадцати был обнаружен прямо противоположный эффект – уменьшение уровня кортикостерона в плазме крови после иммобилизации.

После трехчасовой иммобилизации средний уровень кортикостерона в плазме крови составил у активных крыс $498,9 \pm 52,7$ нг/мл, у пассивных животных $466,4 \pm 102,4$ нг/мл (рисунок). У активных крыс после стрессорной нагрузки отмечено достоверное ($p < 0,001$) увеличение средней концентрации кортикостерона в плазме крови, у пассивных животных средний уровень кортикостерона плазмы достоверно не изменился.

Не наблюдалось достоверных отличий в уровне кортикостерона в ЦСЖ у активных и пассивных животных. Средняя концентрация кортикостерона в ЦСЖ у активных крыс равна $16,0 \pm 3,5$ нг/мл, а у пассивных животных $14,5 \pm 4,2$ нг/мл. Средний объем образца ЦСЖ, выделенного у активных крыс составил $107,6 \pm 11,6$ мкл, а у пассивных $131,5 \pm 15,4$ мкл.



Концентрация кортикостерона в крови у активных и пассивных животных в состоянии покоя и после стресса, где * – $p < 0,05$ по сравнению с активными крысами, ** – $p < 0,001$ по сравнению с концентрацией кортикостерона до стресса

Стрессорная нагрузка, по литературным данным, вызывает достоверное увеличение уровня кортикостерона в плазме крови у крыс [10; 12], однако у пяти животных был обнаружен противоположный эффект – уменьшение уровня кортикостерона в плазме крови. Таким образом, трехчасовая иммобилизационная стрессорная нагрузка неодинаково влияет на индивидуальные значения уровня кортикостерона в плазме крови у различных крыс. Хотя средняя его концентрация в этих условиях достоверно возросла, но у 30% особей уровень кортикостерона, наоборот, снизился. Корреляция между уровнем этого гормона после стресса с исходным его уровнем в обычных условиях содержания (коэффициент корреляции Спирмена – 0,18) не обнаружена. Данные факты мы объясняем выраженными и неучтенными в настоящем исследовании ритмическими колебаниями концентрации кортикостерона в течение суток. Как известно, в результате ультрадианных ритмов содержание кортикостерона в плазме крови может изменяться в несколько раз, что может вносить существенный вклад в результаты измерений уровня кортикостерона при обычных нестрессорных условиях [15].

В нашем исследовании показано, что активные в открытом поле животные характеризуются меньшей концентрацией кортикостерона в плазме крови по сравнению с малоподвижными особями. При этом иммобилизационный стресс вызывает достоверное увеличение концентрации кортикостерона лишь у группы активных крыс.

В аналогичном исследовании зарубежного коллектива [8] были использованы крысы двух генетически разнородных линий с высоко (HAB) и низко тревожным фенотипом (LAB). Данные этой работы полностью совпадают с нашими результатами. Достоверное увеличение уровня кортикостерона в плазме крови обнаружено только у низко тревожных особей, которые являлись также более активными в тесте открытого поля.

Полученные в нашей работе данные относительно содержания кортикостерона в плазме крови у активных и пассивных в открытом поле животных совпали и с данными другого исследования [4], в котором также было показано, что пассивные крысы отличаются более высокой концентрацией этого гормона в плазме крови.

Взаимосвязь между уровнем кортикостерона в крови у крыс с поведением животных была изучена в работе Tilahun A. с соавторами (2009). Однако им не удалось обнаружить значительной связи между концентрацией кортикостерона и поведением, мы предполагаем, что может быть связано с использованием в качестве модели стресса менее продолжительной нагрузки – теста 15-минутного плавания [14].

Заключение

Таким образом, нами было выявлено различие уровня кортикостерона крови в условиях покоя и после стрессорной нагрузки у поведенчески активных (прогностически устойчивых к стрессу) и пассивных (предрасположенных к стрессу) животных. При этом у активных особей наблюдался более низкий исходный уровень этого гормона в крови, по сравнению с пассивными животными, достоверно повышающийся после стрессорной нагрузки. У пассивных крыс не наблюдалось увеличение концентрации кортикостерона в крови в стрессорных условиях. Уровень кортикостерона в ЦСЖ после иммобилизационного стресса не отличался у активных и пассивных особей.

Список литературы

1. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу // Вестник новых мед. технол. – 2002. – Т.9 № 1. – С. 16–18.
2. Лебедев С.В., Блинов Д.В., С. В. Петров С.В. Пространственные параметры большой цистерны мозга у крыс и новая техника ее пункции с помощью стереотаксического манипулятора // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 6. – С. 717–720.
3. Судаков К.В. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу. – М., 1998.
4. Умрюхин А.Е., Кравцов А.Н., Ветрилэ Л.А. и др. Стрессорные реакции у крыс в условиях иммунизации к селотонину // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140. № 12. – С. 604–607.
5. Умрюхин А.Е., Сотников С.В., Чекмарева Н.Ю. и др. Органы-маркеры стресса и кортикостерон в крови после иммобилизации у поведенчески активных и пассивных крыс на фоне иммунизации конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158. – № 8. – С. 136–140.
6. Умрюхин П.Е. Поведение в «открытом поле» и электрическая активность лимбических структур и коры мозга крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 1996. – Т. 46. № 5. – С. 963.
7. Füchsl A.M., Neumann I.D., Reber S.O. // *Endocrinology*. – 2014. – Vol. 155, № 1. – P. 117–126.
8. Gonik M., Frank E., Keßler M.S., et al. The endocrine stress response is linked to one specific locus on chromosome 3 in a mouse model based on extremes in trait anxiety // *BMC Genomics*. – 2012 – Vol. 13. – P. 579.
9. Mason B.L. et al. Central nervous system (CNS) delivery of glucocorticoids is fine-tuned by saturable transporters at the blood-CNS barriers and nonbarrier regions // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151, № 11. – P. 5294–5305.
10. Mora F. et al. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration // *Brain Res*. – 2012. – Vol. 1476. – P. 71–85.
11. Pariante C.M., Lightman S.L. The HPA axis in major depression classical theories and new developments // *Trends Neurosci*. – 2008. – Vol. 31. – P. 464–468.
12. Pertsov S.S. et al. Catecholamine content in the adrenal glands of August and Wistar rats after acute emotional stress // *N. Biomed. Sci*. – 2003. – № 2. – P. 44–48.
13. Stiller A.L. et al. Stress resilience and vulnerability: the association with rearing conditions, endocrine function, immunology, and anxious behavior // *Psychoneuroendocrinology*. – 2011. – 36. – P. 1383–1395.
14. Tilahun A., et al. Investigating association between behavior, corticosterone, heart rate, and blood pressure in rats using surrogate marker evaluation methodology // *J Biopharm Stat*. – 2009. – Vol. 19, № 1. – P. 133–49.
15. Qian X. et al. Circadian and ultradian rhythms of free glucocorticoid hormone are highly synchronized between the blood, the subcutaneous tissue, and the brain // *Endocrinology*. – 2012. – Vol. 153, № 9. – P. 4346–4353.