

УДК 619+616-092.9

## ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННО-БОЛЕВОГО СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНЫМ ФЕНОТИПОМ РЕАГИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ NO-СИНТАЗ

Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Прокофьев И.И.

ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: int1943@mail.ru

Исследовано влияние иммобилизационно-болевого стрессорного воздействия на животных с различным фенотипом реагирования. Выявлено, что стресс приводит к подъему среднего артериального давления (срАД) у высокоустойчивых животных через 6 часов – на 7,8%, 12 часов – на 9,6%, 24 часа – на 16,0%. У низкоустойчивых животных через 6 часов срАД повысилось на 7,3%, 12 часов – на 9,8% и через 24 часа оно осталось на том же уровне. У стрессустойчивых крыс, которым до стрессорного воздействия и через 12 часов после начала вводился неселективный ингибитор NO-синтаз L-NAME в дозе 10 мг/кг, в первые 6-12 часов наблюдалось незначительное повышение срАД, а к 24 часам стрессового воздействия – срАД снизилось на 8,9% по сравнению с исходными данными. У низкоустойчивых к стрессу самок, получавших L-NAME, АД значительно снижалось уже через 6 часов иммобилизационно-болевого воздействия, к 12 часу – не определялось и животные погибали. В группе высокоустойчивых погибла 1 крыса из 8, низкоустойчивых – 7 из 8. Общее время активности во время стрессирования было несколько больше у низкоустойчивых животных: за 12 часов – на 11,1%, за 24 ч – на 16,4% по сравнению с показателями группы высокоустойчивых. Блокада синтеза оксида азота приводила к уменьшению двигательной активности во время подвешивания как высоко-, так и низкоустойчивых самок относительно контрольной группы стрессированных крыс.

**Ключевые слова:** стресс, блокада NO-синтаз, артериальное давление, двигательная активность

## INFLUENCE OF IMMOBILIZATION-PAINFUL STRESS ON ANIMALS WITH DIFFERENT PHENOTYPES RESPONSE IN THE CONDITIONS NO-SYNTASE BLOCKADE

Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Prokofiev I.I.

Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: int1943@mail.ru

The influence of immobilization-painful stress on the animals with different phenotypes response was investigated. It was shown that stress results to a rise in mean arterial pressure (MAP) of highly resistant animals in 6 hours by 7.8%, 12 hours by 9.6%, 24 hours by 16.0%. MAP of low resistant animals increased in 6 hours by 7.3%, in 12 hours by 9.8% and preserved at the same level for 24 hours. It was shown a slight increase of MAP of stress-resistant rats that were injected non-selective NO-synthase inhibitor L-NAME in the dose of 10 mg/kg before stress exposure and in 12 hours after the beginning of stress. It was noticed a slight increase of MAP in the first 6-12 hours. By 24 hours of stress – MAP decreased by 8.9% as compared with the original data. It was also tested MAP of low stress-resistant females, that were injected L-NAME, reduced significantly already in 6 hours of immobilization-painful stress. By the 12th hour MAP was not determined and the animals died. In the group of highly resistant females 1 of 8 rats died, in the group of low resistant females 7 of 8 rats died. The total time during the activity of stressing was somewhat longer of low resistant animals within 12 hours of stressing – by 11.1%, within 24 hours – by 16.4% compared with the data of a group of highly resistant females. The blockade of nitrogen oxide synthesis resulted to a reduction of motor activity during suspension of both high and low resistant rats, compared with the control group of stressed rats.

**Keywords:** stress, blockade of NO-synthase, blood pressure, motor activity

Влияния факторов окружающей среды вызывают стресс-реакцию, которая в зависимости от интенсивности и продолжительности оказывает различное действие на биологические системы, может служить сигналом угрозы нарушения гомеостаза с развитием физиологических и патологических изменений [12, 14]. При адекватной стресс-реакции происходит усиленный выброс стресс-гормонов, опосредующих развитие адаптации [5]. Вместе с тем, при высокой интенсивности действия стрессора адаптационные реакции могут оказывать повреждающие эффекты и приводить к развитию патологии [6].

Стресс влияет на многие системы организма, в том числе и лимбическую, модулируя обучение, память, эмоции; двигательные функции, участвует в механизмах их нарушений [15]. Иммобилизационный стресс является причиной тревоги, снижения локомоторной активности, приводит к дисфункции памяти [13]. Помимо этого, стресс-индуцированное повышение активности гипофизарно-адренокортикальной и симпатoadреналовой систем вызывает развитие гипертонии [2, 9].

Все живые организмы по-разному реагируют на стрессорные изменения окружающей среды. Имеются данные, что высоко-

устойчивые к стрессу животные обладают большими способностями к адаптации, чем низкоустойчивые [11]. Ряд авторов объясняют это генетически обусловленным уровнем эффективности стресс-лимитирующих систем [7, 8].

Одной из основных стресс-лимитирующих систем в организме является NO-ергическая система. Оксид азота ограничивает активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем и тем самым снижает повреждающие эффекты стресс-реакции [5]. Также показано, что устойчивость к стрессорным повреждениям находится в прямой зависимости от уровня реактивности NO-системы [7].

В связи с этим, целью исследования явилось изучение влияния блокады NO-ергической системы на устойчивость животных с различным фенотипом реакции на стрессорную ситуацию к 6-ти, 12-ти и 24-х часовому иммобилизационно-болевому воздействию.

#### Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 60 беспородных крысах-самках массой 230-250 г в возрасте четырех месяцев, предварительно отобранных по их устойчивости к стрессу, в фазу диэструса, которая определялась по влагилищным мазкам. Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово» (Ленинградская область) и со-

держались в условиях вивария ВолгГМУ. Уход за ними осуществлялся согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Международных рекомендаций «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [The European Convention, 1986]. Протокол экспериментального исследования был одобрен Региональным Независимым Этическим Комитетом (ГУ Волгоградский Медицинский Научный Центр) (протокол № 198-2014 от 25.04.2014 г.).

Стресс моделировали путем подвешивания крысы за дорсальную кожную шейную складку на 6, 12 и 24 часа [1]. Потенциальная устойчивость животных к стрессу определялась по отношению суммы горизонтальной двигательной активности в центре и на периферии к сумме латентных периодов первого движения и выхода в центр (коэффициент стресс-резистентности, КСР) [4]. В зависимости от величины КСР животные были разделены на высокоустойчивых (высокоактивных) (КСР = 1,1 – 4,0) и низкоустойчивых (низкоактивных) (КСР = 0,27 – 0,70) к стрессу. Было сформировано 8 групп: 1 и 2 – высоко- и низкоустойчивые интактные самки (в обеих группах по 8 животных); 3 и 4 высоко- и низкоустойчивые интактные самки, получавшие неселективный ингибитор NO-синтазы L-NAME в дозе 10 мг/кг дважды (после измерения исходного уровня артериального давления и через 12 часов) (в обеих группах по 6 животных); 5 и 6 – высоко- и низкоустойчивые стрессированные животные (в обеих группах по 8 животных); 7 и 8 – высоко- и низкоустойчивые стрессированные крысы, получавшие L-NAME за 10 мин до и через 12 часов после подвешивания (в обеих группах по 8 животных).

Таблица 1

Влияние иммобилизационно-болевого стресса и блокады NO-синтаз на уровень сРАД животных с различными типами реагирования на стрессорные воздействия

Группы животных	Среднее АД			
	Исход	6 часов	12 часов	24 часа
Высокоустойчивые к стрессу животные				
Интактная	103,3 ± 7,0	98,2 ± 5,2	98,1 ± 3,9	97,8 ± 8,3
Интактная + L-NAME	104,1 ± 5,4	108,8 ± 5,2	122,1 ± 6,4*	137,9 ± 7,1*
Стресс + физ. р-р	98,4 ± 4,7	106,1 ± 5,0\$	107,9 ± 5,2*\$	114,2 ± 10,9*
Стресс + L-NAME	101,9 ± 3,7	106,5 ± 4,4	106,6 ± 6,1	92,8 ± 4,5#^
Низкоустойчивые к стрессу животные				
Интактная	103,3 ± 5,7	100,9 ± 6,8	97,3 ± 5,4	98,5 ± 3,0
Интактная + L-NAME	103,8 ± 4,1	118,2 ± 5,4*	123,1 ± 3,5*	127,8 ± 4,5*
Стресс + физ. р-р	99,8 ± 4,1	107,1 ± 2,9	109,6 ± 3,1*\$	107,2 ± 5,9&
Стресс + L-NAME	100,8 ± 7,3	86,5 ± 6,1»*	Не определялось	

П р и м е ч а н и е . \* – изменения достоверны по сравнению с исходным уровнем сРАД (критерий Краскела-Уоллиса, Сигела-Кастеллана при  $p \leq 0,05$ ).

^ – изменения достоверны по сравнению с уровнем сРАД через 6 и 12 часов стрессирования (критерий Краскела-Уоллиса, Сигела-Кастеллана при  $p \leq 0,05$ ).

\$ – изменения достоверны по сравнению с уровнем сРАД интактных животных (критерий Краскела-Уоллиса, Сигела-Кастеллана при  $p \leq 0,05$ ).

# – изменения достоверны по сравнению с уровнем сРАД высокоустойчивых крыс через 24 часа стрессирования без блокады NO-синтаз (критерий Краскела-Уоллиса, Сигела-Кастеллана при  $p \leq 0,05$ ).

« – изменения достоверны по сравнению с исходным уровнем сРАД низкоустойчивых крыс (критерий Краскела-Уоллиса, Сигела-Кастеллана при  $p \leq 0,05$ ).

& – изменения достоверны по сравнению с уровнем сРАД высокоустойчивых крыс через 24 часа стрессирования (критерий Манна-Уитни при  $p \leq 0,05$ ).

У всех самок до эксперимента и через 6, 12 и 24 часа регистрировалось среднее артериальное давление (срАД) с помощью прибора для неинвазивного измерения Kent Scientific Cognition (Канада). После подвешивания крыс с помощью веб-камер с датчиками движения производили видеозапись двигательной активности крыс в течение всего времени иммобилизационно-болевого воздействия. Время активности животного выражали в процентах от общей продолжительности стрессирования.

Статистическую обработку результатов проводили в программе «Statistica 6.0» с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни, Краскелла-Уоллиса и Сигела-Кастеллана. Нормальность распределения оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка.

### Результаты исследования и их обсуждение

Подавление синтеза оксида азота с помощью неселективного ингибитора NO-синтаз вызывало значительное снижение устойчивости к стрессу и гибель животных. В группе высокоустойчивых крыс, получавших L-NAME, погибла одна самка через 22 часа после начала стрессирования, в группе низкоустойчивых крыс на фоне дефицита оксида азота во время 6- и 12-часового стрессирования погибли по две крысы, во время 24-часовой иммобилизации – ещё три. Гибели не наблюдалось в группах стрессированных животных без блокады синтеза NO (см. табл. 1).

У интактных высоко- и низкоустойчивых самок срАД в течение 24 часов существенно не изменялось, а на фоне блокады синтеза NO значительно повышалось ( $p \leq 0,05$ ) относительно исходного уровня. При стрессовом воздействии у высокоустойчивых крыс исследуемый показатель повышался по сравнению с исходными данными с увеличением времени стрессирова-

ния; у одной самки из восьми срАД снижалось. У 6 из 8 низкоустойчивых животных после 6- и 12-часового подвешивания наблюдался подъем срАД ( $p \leq 0,05$ ) относительно исходных данных, к 24 часу показатель оставался на уровне 12-часового, у 2 самок из 8 срАД снижалось на протяжении всего времени стрессирования.

У высокоактивных стрессированных самок прирост срАД к 6, 12 и 24 часам был статистически достоверно выше по сравнению с таковым интактной группы; у низкоактивных – существенно не отличался, за исключением 12 часового показателя (см. табл. 1).

У высокоустойчивых крыс, получавших блокатор NO-синтаз L-NAME, срАД через 6 и 12 часов иммобилизационно-болевого стрессорного воздействия не изменялось по сравнению с исходными данными, к 24 часу отмечена тенденция к снижению. Через 6 часов стрессирования у 5 из 8 низкоустойчивых самок с блокадой синтеза оксида азота срАД было ( $p \leq 0,05$ ) ниже относительно фоновых значений, у одной крысы – выше исходного уровня. Через 12 часов срАД не определялось, что сопровождалось впоследствии гибелью животных (см. табл. 1).

При сравнении изменений срАД у высокоустойчивых самок в условиях стресса и при введении L-NAME отмечено, что дефицит оксида азота способствует достоверному снижению срАД к 24 часу. У низкоустойчивых стрессированных животных с блокадой синтеза оксида азота резкое снижение исследуемого показателя по сравнению с самками, находившимися в условиях только стрессорного воздействия, наблюдался уже к 6 часу, а к 12 часу не определялся и животные погибали.

Таблица 2

Влияние блокады NO-синтаз на время активности животных во время стрессирования

Группы животных	Время активности, % от общего времени стрессирования		
	6 ч	12 ч	24 ч
Высокоустойчивые к стрессу животные			
Стресс + физ. р-р	76,7 ± 6,2	73,8 ± 12,4	60,8 ± 8,1*
Стресс + L-NAME	75,4 ± 7,0	66,3 ± 8,4	48,5 ± 6,5*#
Низкоустойчивые к стрессу животные			
Стресс + физ. р-р	83,4 ± 5,6	82,0 ± 13,8	70,8 ± 6,4*
Стресс + L-NAME	81,4 ± 6,2	69,0 ± 7,5^#	-

Примечание. В группе низкоустойчивых стрессированных животных, получавших L-NAME, выжила только одна крыса.

\* – изменения достоверны по сравнению с общей двигательной активностью за 6 часов стрессирования (критерий Краскелла-Уоллиса, Сигела-Кастеллана при  $p \leq 0,05$ ).

^ – изменения достоверны по сравнению с общей двигательной активностью за 6 часов стрессирования (критерий Манна-Уитни при  $p \leq 0,05$ ).

# – изменения достоверны по сравнению с общей двигательной активностью стрессированных животных без блокады NO-синтаз (критерий Манна-Уитни при  $p \leq 0,05$ ).

Выявлено, что у стрессированных высокоустойчивых животных без блокады NO-синтазы, в отличие от низкоустойчивых, через 24 часа уровень срАД был выше ( $p \leq 0,05$ ) (см. табл. 1).

Мы в литературе не нашли работ, анализирующих поведение животных (попытки избавления от болевого воздействия) с разным типом реагирования в условиях иммобилизационно-болевого стресса. Можно было предположить, что высокоустойчивые животные будут вести себя более активно при подвешивании за холку.

Однако процент времени активности крыс от общей продолжительности иммобилизации был ниже в период 12-24 часа, тогда как в остальное время практически не изменялся ( $p \leq 0,05$  по сравнению с общей двигательной активностью за 6 часов стрессирования). Наиболее выраженное уменьшение данного показателя наблюдалось в группах самок, получавших ингибитор NO-синтазы L-NAME. В группе низкоустойчивых к стрессу животных наблюдалась тенденция к более длительной активности по сравнению с высокоустойчивыми (см. табл. 2).

Таким образом, у интактных животных, получавших блокатор NO-синтазы L-NAME, уровень артериального давления достоверно повышался, что, вероятно, связано со снижением вазодилатирующей функции эндотелия, повышением чувствительности сосудов к действию ангиотензина II, обусловленного дефицитом оксида азота [16]. У стрессированных крыс исследуемый показатель возрастал с увеличением продолжительности иммобилизации, что согласуется с литературными данными и вызвано гиперактивацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпато-адреналовой систем при стрессе [6]. У животных, получавших блокатор NO-синтазы L-NAME, происходило выраженное снижение уровня АД: у крыс с высокой устойчивостью к стрессу данный показатель уменьшался к 24 часам иммобилизационно-болевого воздействия, у низкоустойчивых – уже через 6 часов. Это указывает на важную роль системы оксида азота в формировании гомеостатических реакций при воздействии стрессорных факторов и свидетельствует о зависимости устойчивости животного к стрессорному воздействию от активности NO-ергической системы [9]. Полученные нами данные согласуются с современными представлениями о том, что нитроксидергическая система ограничивает стресс-реакцию и повышает адаптацию организма к факторам стресса [5].

Показано, что оксид азота также играет важную физиологическую роль нейро-

трансммитера в ЦНС [18]. В проведенном исследовании мы наблюдали тенденцию к более длительной активности низкоустойчивых крыс во время стрессирования, что, вероятно, связано с развитием выраженного тревожного эмоционального состояния [10]. У животных с блокадой синтеза оксида азота во время иммобилизационно-болевого воздействия общее время двигательной активности было достоверно ниже: у высокоустойчивых – к 24 часам стрессирования, у низкоустойчивых – уже к 12 часам, что может свидетельствовать о более быстром истощении гомеостатических механизмов вследствие стрессорного воздействия и развивающейся гиперкатехоламинемии. По мнению некоторых авторов [2, 17], данный эффект возможно связан с изменением соотношения биогенных аминов мозга вследствие способности оксида азота модулировать высвобождение возбуждающих и тормозных нейромедиаторов [3].

В представленном исследовании неселективная блокада NO-синтазы во время стрессирования приводила к гибели крыс преимущественно группы низкоустойчивых к стрессу. Вероятно, это связано с генетически обусловленным уровнем активности стресс-лимитирующих систем, определяющих индивидуальную устойчивость организма к воздействию стрессорных факторов [7].

### Выводы

1. У высокоустойчивых животных иммобилизационно-болевого стресс приводил к увеличению уровня среднего артериального давления через 6 ч – на 7,8%, 12 ч – на 9,6%, 24 ч – на 16,1%; у низкоустойчивых данный показатель увеличился к 6 ч на 7,3%, к 12 ч – на 9,8% и далее практически не изменялся. Общее время активности низкоустойчивых крыс было несколько больше по сравнению с высокоустойчивыми: за 12 часов стрессирования – на 11,1%, за 24 ч – на 16,4%. Интенсивность движений во время стрессирования заметно не различалась.

2. На фоне блокады синтеза оксида азота у высокоустойчивых самок уровень среднего артериального давления через 24 ч иммобилизационно-болевого воздействия уменьшался на 8,9%; у низкоустойчивых – на 14,2% уже через 6 часов стрессирования, впоследствии артериальное давление у этих животных не определялось и они погибли. Общее время активности и интенсивность движений как высоко-, так и низкоустойчивых к стрессу животных с дефицитом оксида азота было меньше по сравнению с контрольной группой.

3. Введение ингибитора NO-синтаз L-NAME до и во время стрессирования вызывало гибель значительной части низкоустойчивых крыс (7 из 8 животных), тогда как у высокоустойчивых погибла только одна.

#### Список литературы

1. Влияние транквилизаторов на функциональное состояние миокарда при его стрессорном повреждении / Г.В. Ковалев, К.Г. Гурбанов, И.Н. Тюренков, С.Н. Найденов // Фармакология и токсикология. – 1983. – Т. 46, № 3. – С. 41-44.
2. Влияние хронического стресса на структуру надпочечника крыс гипертензивной линии НИСАГ после превентивного лечения теразолином / И.И. Бузуева, Е.Е. Филлошина, М.Д. Шмерлинг и др. // Сибирский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 30, № 4. – С. 56-61.
3. Исмаилова Х.Ю. Индивидуальные особенности поведения (моноаминергические механизмы) / Х.Ю. Исмаилова, Т.М. Агаев, Т.П. Семенова. – Баку: «Нурлан», 2007. – 228 с.
4. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу / Е.В. Коплик // Вестник новых медицинских технологий. – 2002. – Т. 9, № 1. – С. 16-18.
5. Малышев И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота / И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 992-1006.
6. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон. – М.: Медицина, 1984. – 269 с.
7. Пшенникова М.Г. Устойчивость к повреждающим воздействиям и защитные эффекты адаптации у животных разных генетических линий / М.Г. Пшенникова // Патогенез. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 20-26.
8. Судаков К.В. Системные основы эмоционального стресса / К.В. Судаков, П.Е. Умрюхин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 112 с.
9. Характеристика функциональной активности симпатoadренальной системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ / А.Л. Маркель, Е.В. Калашникова, С.В. Горякин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 3. – С. 244-246.
10. Чуян Е.Н. Изменение двигательной активности животных с разным профилем моторной асимметрии в условиях гипокинезии / Е.Н. Чуян, О.И. Горная // Физика живого. – 2009. – Т. 17, № 2. – С. 193-199.
11. Шаляпина В.Г. Основы нейроэндокринологии / В.Г. Шаляпина, П.Д. Шабанов. – СПб.: Элби-СПб, 2006. – 472 с.
12. Effect of sulfonyleureas administered centrally on the blood glucose level in immobilization stress model / N. Sharma, Y.-B. Sim, S.-H. Park et al. // Korean Journal of Physiology & Pharmacology. – 2015. – Vol. 19, № 3. – P. 197-202.
13. Goyal R. Protective effect of alprazolam in acute immobilization stress-induced certain behavioral and biochemical alterations in mice / R. Goyal, K. Anil // Pharmacological Reports. – 2007. – Vol. 59, № 3. – P. 284-290.
14. Impairment of synaptic plasticity by the stress mediator CRH involves selective destruction of thin dendritic spines via RhoA signaling / Y. Chen, E.A. Kramar, L.Y. Chen et al. // Molecular Psychiatry. – 2013. – Vol. 18, № 4. P. 485-496.
15. Metz G.A. Stress as a modulator of motor system function and pathology / G.A. Metz // Reviews in the Neurosciences. – 2007. – Vol. 18, № 3-4. – P. 209-222.
16. Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure / M.-S. Zhou, I.H. Schulman, P.J. Pagano et al. // Hypertension. – 2006. – V. 47. – P. 81-86.
17. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain / K. Yamada, Y. Noda, S. Nakayama et al. // British Journal of Pharmacology. – 1995. – Vol. 115, № 5. – P. 852-858.
18. Selective nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole protects against cocaine-induced oxidative stress in rat brain / V. Vitcheva, R. Simeonova, M. Kondeva-Burdina, M. Mitcheva // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2015. – Vol. 2015. Article ID 157876.