

**Л. Н. Рогова, В. Н. Поветкина, Н. В. Шестернина, К. Ю. Тихаева,  
Т. В. Замечник, И. А. Фастова, В. А. Старавойтов, С. Ю. Дьячкова, Г. В. Панкова**

Волгоградский государственный медицинский университет, Россия,  
кафедра патофизиологии, клинической патофизиологии

## **ПОКАЗАТЕЛИ ГРУППОВОЙ СТРЕСС-РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ИНТАКТНЫХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕССОРА**

УДК 616.45-001.1/3-092.4

В экспериментах на лабораторных крысах линии Вистар под анестезией определяли показатели групповой стрессоустойчивости на уровне изменения поведения животных, гуморальных механизмов, клеточных и биохимических критериев при воздействии физиологического стрессора (помещение в ярко освещенную камеру). Стрессоустойчивые крысы характеризуются высокой двигательной активностью, низким уровнем магния в эритроцитах и плазме крови, сопряженном с большим числом eNOS-позитивных клеток на фоне минимальной интенсивности экспрессии в слизистой оболочке желудка.

**Ключевые слова:** стрессоустойчивость, тест «открытое поле», магний, эндотелиальная нитроксидсинтаза.

**L. N. Rogova, V. N. Povetkina, N. V. Shesternina, K. Y. Tikhaeva,  
T. V. Zamecnik, I. A. Fastova, V. A. Staravoitov, , Y. S. Dyachkova, G. V. Pankova**

## **INDICATORS OF GROUP STRESS RESISTANCE IN INTACT RATS UNDER THE INFLUENCE OF A PHYSIOLOGICAL STRESSOR**

In experiments on laboratory Wistar rats under anesthesia, indicators of group stress resistance were determined at the level of changes in animal behavior, humoral mechanisms, cellular and biochemical criteria under the influence of a physiological stressor (putting in a brightly lit chamber). Stress-resistant rats are characterized by high motor activity, low level of magnesium in red blood cells and blood plasma, associated with a large number of eNOS-positive cells against a background of minimal expression intensity in the stomach mucosa.

**Key words:** stress resistance, «open field» test, magnesium, endothelial nitric oxide synthase.

Известно, что стресс – это возможность организма неспецифическим образом адаптироваться и приобрести устойчивость к воздействию любых факторов необычного характера, интенсивности или продолжительности действия [6].

Индивидуальная стрессоустойчивость, с одной стороны, определяется особенностями центральных и периферических стресс-реализующих механизмов, таких как нейрохимические и электрофизиологические изменения в нервной системе. К значимым эффекторным механизмам относят базальный уровень выработки в гипоталамусе кортикотропин-рилизинг-гормона и адреноркортикотропного гормона в гипофизе, состояние аргинин-вазопрессиновой системы; общий уровень симпатикотонии и высокая реактивность адренергической системы в центральных и периферических структурах стресс-системы; активность периферической продукции кортикостероидов и катехоламинов. С другой стороны, устойчивость к стрессу зависит от состояния стресс-лимитирующих механиз-

мов: состояния ГАМК-ергической системы; активности опиодергической системы с выработкой эндогенных опиатов,  $\beta$ -эндорфинов и энкефалинов; центрального и периферического синтеза субстанции P; состояния дофаминергической, серотонинергической и глицинергической систем; синтеза адениннуклеотидов и простагландинов; состояния антиоксидантной системы клеток; общего уровня активности парасимпатической нервной системы и уровня ацетилхолина; общего состояния активности NO-ергической системы и, соответственно, базальной и стимулированной продукции оксида азота; локальной резистентности периферических тканей и органов, которые находятся под большим риском их стрессового поражения, например тканей пищеварительного тракта [5].

На клеточном уровне механизмы стрессовых изменений реализуются за счет активности белка p53 и mPNCp53, способных инициировать репарацию поврежденной ДНК или включение механизмов апоптоза [10]; сохранения клеточного протеостаза при активации «Развернутого

белкового ответа» (UPR) в эндоплазматическом ретикулуме; инициации транскрипционного ответа через ядерный фактор NF- $\kappa$ B [7]; прекращения ресурсоемкого синтеза рибосомной РНК (рРНК) с помощью длинных некодирующих РНК (lncRNAs) [9].

Экспериментальное изучение индивидуумов с разной прогностической устойчивостью к стрессу дает возможность устанавливать показатели групповой стресс-резистентности, прогнозировать возникновение повреждений стрессового характера и предотвращать их появление своевременным назначением патогенетической терапии.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить показатели теста «Открытое поле» у экспериментальных крыс с разной устойчивостью к стрессу, с одновременным измерением содержания ионизированного кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и магния ( $\text{Mg}^{2+}$ ) в эритроцитах и плазме крови из подключичной вены (Vs), иммуногистохимических показателей интенсивности экспрессии эндотелиальной нитрооксидсинтазы (eNOS) в слизистой оболочке желудка.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Белых крыс линии Вистар разделили на две подгруппы (стрессоустойчивых и стрессонеустойчивых) по показателям теста «Открытое поле».

Тест «Открытого поля» проводился внутри квадратной белой площадки размерами 1 м<sup>2</sup> (100 × 100 см) с непрозрачными бортами высотой 40 см. На белом полу вольера была нанесена черная координатная сетка, делящая поле на 25 (5 × 5) равных квадратов. Помимо этого, красным цветом была выделена центральная зона (внутренние 9 квадратов в центре арены). В центрах пересечения основных линий были сделаны отверстия. Экспериментальный вольер освещался лампой мощностью 50 Вт, расположенной на высоте 150 см над центром поля. Тестирование проводилось в тихой комнате в течение 3 минут и начиналось с помещения лабораторного животного в центральную зону. Наблюдение за животным велось через зеркало, закрепленное над площадкой, в котором отражалась поведенческая активность лабораторных крыс. Регистрировались следующие показатели:

- горизонтальная активность (ГА) определялась как число пересеченных квадратов в площадке «открытое поле» всеми четырьмя лапами крысы через разделяющую линию;

- вертикальная активность (ВА) устанавливалась как число подъемов животного на зад-

ние лапы со свободными передними конечностями или вставаний с опорой на стенку арены;

- поисковая активность (ПА) подсчитывалась при засовывании головы животным внутрь отверстий на пересечении разграничивающих линий «по глаза» или число обнюхиваний краев этих отверстий;

- центральная зона (ЦЗ) – регистрировалось количество выходов крысы в центральный сектор площадки «открытого поля», выделенный красной краской;

- груминг (Г) – оценивались быстрые непродолжительные движения лап вокруг носа и морды животного (короткий груминг) и длительный груминг (умывание области глаз, зоны за ушами и умывание всей головы, лап, туловища, боков, области ануса и гениталий, а также хвоста);

- болюсы (Б) – подсчитывалось число болюсов, оставленных в экспериментальной установке животным по окончании тестирования.

После тестирования каждой крысы арену протирали влажной губкой.

Для определения макроэлементного состава у животных под нембуталовым наркозом (40 мг/кг массы) производили забор крови из подключичной вены (Vs).

Содержание  $\text{Mg}^{2+}$  в эритроцитах крови определяли по В. С. Камышникову [1].

Уровень  $\text{Mg}^{2+}$  в плазме крови определяли реактивами набора фирмы «Лахема»; содержание  $\text{Ca}^{2+}$  – с помощью наборов фирмы «Ольвекс-диагностикум» (Россия).

После этого у всех экспериментальных животных забирали ткани из препилорического отдела желудка с последующей идентификацией моноклональных антител к эндотелиальной нитрооксидсинтазе («Novocastra», Великобритания). Оценка реакции проводилась полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и удельного числа антиген-позитивных клеток в слизистой оболочке желудка (СО).

Иммуногистохимическая реакция оценивалась как негативная – «0» (нет реакции), слабо-позитивная – «1» (слабо окрашенные клетки), умеренно-позитивная – «2» (клетки средней интенсивности окраски) и сильнопозитивная или сверхэкспрессия – «3» (клетки высокой интенсивности окраски) [2].

Для статистической обработки результатов исследования при нормальном распределении использовался t-критерий Стьюдента ( $M \pm m$ ), при распределении отличном от нормального использовали T-критерий Уилкоксона при уровне значимости  $Q < 0,05$  (Me [25 и 75 перцентили]).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице. Тестирование животных методом «Открытого поля» [7] позволяет оценить поведение животных в ответ на стимулы стрессового характера и определить устойчивость экспериментальных животных к воздействию стресса.

того поля» [7] позволяет оценить поведение животных в ответ на стимулы стрессового характера и определить устойчивость экспериментальных животных к воздействию стресса.

### Содержание макроэлементов в крови из $V_s$ ( $M \pm m$ ), удельное число и интенсивность экспрессии eNOS-позитивных клеток слизистой оболочки желудка и показатели теста «Открытое поле» у стрессоустойчивых и стрессонеустойчивых крыс в исходном состоянии (Me[25 и 75 перцентили])

Показатель	Стрессоустойчивые крысы	Стрессонеустойчивые крысы
$Mg^{2+}$ в эритроцитарной массе крови из $V_s$ , ммоль/л	1,42 ± 0,101	1,91 ± 0,074 ###
$Mg^{2+}$ в плазме крови из $V_s$ , ммоль/л	0,83 ± 0,022	0,88 ± 0,012 #
$Ca^{2+}$ в плазме крови из $V_s$ , ммоль/л	1,62 ± 0,036	1,64 ± 0,037
Интенсивность экспрессии eNOS-позитивных клеток	1 [1;1]	2 [2;2] *
Удельное число eNOS-позитивных клеток	65 [50;82,5]	17,5 [10;25] *
Вертикальная активность в тесте «Открытое поле»	16 [12,5;17]	19 [18;20]
Горизонтальная активность в тесте «Открытое поле»	66 [61;70]	42 [39,5;46,5] *
Поисковая активность в тесте «Открытое поле»	5 [3;6]	2 [1,5;3,5]
Центральная зона в тесте «Открытое поле»	2 [0,5;2]	1 [0,5;1,5]
Болюсы в тесте «Открытое поле»	0 [0;1]	0 [0;0]
Груминг в тесте «Открытое поле»	8 [4,5;9,5]	3 [1;6]

\* –  $Q < 0,05$  – достоверность различий между показателями интенсивности и удельного числа eNOS-позитивных клеток в СО желудка и показателями в тесте «Открытое поле» у стрессоустойчивых и стрессонеустойчивых крыс;

# –  $P < 0,05$ ;

### –  $P < 0,001$  – достоверность различий между содержанием магния в эритроцитарной массе и плазме крови у стрессоустойчивых и стрессонеустойчивых крыс.

Необычность и новизна ситуации (помещение крысы в ярко освещенную непривычную камеру, которая значительно больше, чем клетка, где живет крыса; белый цвет и открытость площадки) воспринимается животным как стрессовый фактор и сопровождается кратковременной реакцией замирания и «убегания» в зависимости от уровня стрессоустойчивости животного [4]. Такое поведение в природных условиях имеет адаптивный характер, так как кратковременная неподвижность уменьшает возможность зрительного или акустического обнаружения животного хищниками и дает возможность сориентироваться в необычной ситуации с последующим убеганием из зоны риска.

Исследование крысой центральной зоны арены «Открытое поле» является признаком уменьшения страха, сопровождающего развитие стресса. Уровень дефекации отражает изменение эмоционального восприятия стрессовой ситуации и позволяет оценить активность вегетативной функции. Вертикальные стойки отражают уровень исследовательской активно-

сти, чувствительный к уровню тревожности. Короткий и продолжительный груминг оценивается как «смешанный» индекс поведенческой активности, сопровождающий снижение двигательной активности [3].

Таким образом, малоподвижных крыс отнесли к стрессонеустойчивым и предрасположенных к развитию стресса. Стрессоустойчивых животных оценивали, как крыс с высоким уровнем двигательной активности, так как подвижное и активное поведение дает возможность избегать потенциальной или реальной опасности и выживать в естественной среде.

У стрессоустойчивых крыс горизонтальная двигательная активность в тесте «открытое поле» (66[61;70]) достоверно выше ( $q < 0,05$ ) по сравнению со стрессонеустойчивыми животными (42[39,5;46,5]). Вертикальная активность у стрессоустойчивых крыс недостоверно ниже, а поисковая активность, выход в центральную зону и груминг – выше, чем у стрессонеустойчивых животных. Одновременно определено, что в исходном состоянии у стрессоустойчивых

животных по отношению к стрессонеустойчивым крысам содержание  $Mg^{2+}$  в плазме и эритроцитарной массе крови из Vs ниже на 6,6 % ( $p < 0,05$ ) и на 25,9 % ( $p < 0,001$ ) соответственно.

Значимой разницы в содержании  $Ca^{2+}$  в плазме крови из Vs между группами не выявлено, что, очевидно, отражает значимую роль  $Ca^{2+}$  в механизмах реализации стресса, в связи с чем его концентрация в плазме поддерживается практически на одном уровне референтных значений за счет мобилизации из депо. Чрезмерность вхождения в клетку и вследствие этого активация кальций-зависимых механизмов ее повреждения, инактивируется, нейтрализуется  $Mg^{2+}$ . При этом  $Mg^{2+}$  постоянно мобилизуется из депо, включая эритроциты крови.

Сравнительное исследование иммуногистохимических показателей у интактных животных с разной устойчивостью к стрессу выявило у стрессонеустойчивых крыс более высокую (умеренно-позитивную) реакцию в меньшем числе eNOS-позитивных клеток в слизистой оболочке препилорического отдела желудка по сравнению со стрессоустойчивыми животными, у которых наблюдалось менее интенсивная экспрессия большего числа eNOS-позитивных клеток в СОЖ ( $Q < 0,05$ ). Значительно большее число антиген позитивных клеток, очевидно, обеспечивает более стабильную функцию вазодилатации, что в условиях гипоксии любого генеза является оптимальной защитно-приспособительной реакцией организма.

Таким образом, поведенческую активность животных в тесте «Открытое поле» можно расценивать как отражение реализации центральных механизмов устойчивости к стрессу, зависящих от уровня нейротрансмиттеров в центральной нервной системе.

Тканевые механизмы стрессоустойчивости в данном случае представлены на клеточном и биохимическом уровне в виде активности экспрессии фермента местного вазодилататора NO, и, таким образом, влияющего на резистентность тканей ЖКТ к воздействию стресс-факторов.

На гуморальном уровне система крови отражает мобильность накопительных (где эритроциты выступают мобильным депо магния и кальция) и перераспределительных (плазма крови) системных механизмов, значимых для организма в условиях стресса. При этом важно подчеркнуть, что магний выступает фактором, оптимизирующим условия для активации внутриклеточных энергозависимых ферментов, в том числе и таких, как нитроксидсинтазы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным проведенного исследования можно сделать вывод, что низкая устойчивость к стрессу малоподвижных крыс сопровождается более высоким уровнем накопления магния в эритроцитах и плазме крови из подключичной вены и более интенсивной экспрессией нитроксидсинтазы в меньшем числе eNOS-позитивных клеток в слизистой оболочке желудка даже в условиях минимального стрессового воздействия на животных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Камышников, В. С.** Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Москва : МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с. – Текст : непосредственный
2. **Коржевский, Д. Э.** Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: рук-во / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, М. Н. Кирик, [и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. – Москва : СпецЛит, 2014. – 119 с. – Текст : непосредственный
3. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов. – Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 123 с. – Текст : непосредственный.
4. Поведенческие реакции у экспериментальных животных с различной прогностической устойчивостью к стрессу в тесте «Открытое поле». – Текст : непосредственный / А. А. Пермяков, Е. В. Елисеева, А. Д. Юдицкий, Л. С. Исакова // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. – 2013. – № 6 – 3. – С. 83 – 90.
5. **Пшенникова, М. Г.** Устойчивость к повреждающим воздействиям и защитные эффекты адаптации у животных разных генетических линий. – Текст : непосредственный / М. Г. Пшенникова // Патогенез. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 20 – 26.
6. **Пшенникова, М. Г.** Феномен стресса, эмоциональный стресс и его роль в патологии. – Текст : непосредственный / М. Г. Пшенникова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. – № 2. – С. 26.
7. **Galluzzi, L.** Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. – Direct text / L. Galluzzi, T. Yamazaki, G. Kroemer // Nature Reviews Molecular Cell Biology, Nature Publishing Group. – 2018. – Vol. 19 (11). – P. 731 – 745.
8. **Hall, C. S.** Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. – Direct text / C. S. Hall // J. comp. physiol. Psychol. – 1936. – Vol. 22. – P. 345 – 352.
9. **Pirogov, S. A.** Long Noncoding RNAs and Stress Response in the Nucleolus. – Direct text / S. A. Pirogov, V. A. Gvozdev, M. S. Klenov // Cells. – Vol. 8 (7). – P. 668.
10. The p53 mRNA: an integral part of the cellular stress response. – Direct text / L. Haronikova, V. Olivares-Illana, L. Wang [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2019. – Vol. 47 (7). – P. – 3257 – 3271.