

**ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ТОНУСА СОСУДОВ ПРИ  
МОДЕЛИРОВАНИИ СТРЕССА У КРЫС**

**Яцковская Н.М.**

*Старший преподаватель кафедры нормальной физиологии  
Учреждения образования «Витебский государственный медицинский  
университет»  
г. Витебск, Беларусь  
makarukk@mail.ru*

*В статье представлен сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ и тонуса сосудов при моделировании острого и хронического иммобилизационного стресса, а также посредством введения инициатора окислительного стресса параквата у крыс. В сыворотке крови определяли 13 биохимических маркеров обмена веществ. Тонус сосудов изучали на изолированных кольцах аорты с помощью установки TISSUEBATH 4CHANSYS, (Biopacsystems, США). Статистическая обработка цифрового материала проводили с помощью программ STSTISTICA 6.0 и Graphpad Prism 4.0. В статье обоснованы функциональные и биохимические критерии острого и хронического иммобилизационного стресса у крыс.*

**Ключевые слова:** стресс; иммобилизация; паракват; крысы; сыворотка крови; биохимические показатели; тонус сосудов

**PECULIARITIES OF SUBSTANCE EXCHANGE AND VESSEL TONE  
IN MODELING STRESS IN RATS**

**Yatskovskaya N.M.**

*Senior Lecturer, Department of Normal Physiology Educational institutions  
"Vitebsk State Medical University"  
Vitebsk, Belarus  
makarukk@mail.ru*

*The article presents a comparative analysis of changes in metabolic parameters and vascular tone in the simulation of acute and chronic immobilization stress, as well as through the introduction of the oxidative stress initiator paraquat in rats. In the blood serum, 13 biochemical markers of metabolism were determined. Vascular tone was studied on isolated aortic rings using a TISSUEBATH 4CHANSYS device (Biopacsystems, USA). Statistical processing of digital material was performed using STSTISTICA 6.0 and Graphpad Prism 4.0 software. The article substantiates the functional and biochemical criteria of acute and chronic immobilization stress in rats.*

**Key words:** stress, immobilization, paraquat, rats, blood serum, biochemical parameters, vascular tone.

Стрессом называют совокупность неспецифических реакций организма на воздействие различных факторов-стрессоров [1]. В последние десятилетия сформировано представление о тканевом стрессе (тканевом адаптационном синдроме) как универсальной для всех тканей организма неспецифической адаптационной реакции, которая формируется в ткани в ответ на действие различных стрессоров. Процесс повреждения клетки в результате окисления называют окислительным стрессом за счет действия токсичных реактивных форм кислорода (гидроксильный радикал, пероксид водорода, супероксидный анион-радикал и др.) [2]. С химической точки зрения окислительный стресс представляет собой значительное увеличение клеточного редокс-потенциала или существенное снижение восстановительной способности клеточных редокс-пар типа окисленный/восстановленный глутатион. Если уровень реактивных форм кислорода превышает способность антиоксидантных систем клетки их обезвреживать, возникают нарушения энергетики и метаболизма клеток, что может привести к гибели клеток (апоптоз, некроз, аутофагия и др.).

**Целью** исследования явился сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ и тонуса сосудов при моделировании острого и хронического стресса.

Эксперименты поставлены на беспородных белых крыс со средней массой тела 220 г, которые были разделены на четыре группы: первая группа – интактные крысы (контроль), вторая группа – острый стресс (фиксация в положении на спине на протяжении 6 часов или помещение крыс в пенал для иммобилизации с фиксацией шеи), третья группа – хронический стресс (ежедневная иммобилизация животных в пеналах по 90 минут на протяжении 10-14 суток), четвертая группа – животным однократно интраперитонеально вводили химический индуктор окислительного стресса паракват в дозе 20 мг/кг массы тела животного. Способ основан на циклических окислительно-восстановительных реакциях в клетке: паракват получает электрон из цепей переноса электронов и превращается в радикал-катион, который при наличии кислорода быстро его восстанавливает, образуя супероксидный анион-радикал. Затем в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой,  $O_2^{\cdot -}$  превращается в перекись водорода, а последняя в реакции с клеточным железом образует гидроксильный радикал. Образованные свободные радикалы кислорода могут инициировать изменения в геноме и его эпигеномной регуляции, истощать резервы НАДФН+H<sup>+</sup>, что ведет к нарушению биосинтезов и обезвреживания ксенобиотиков, уменьшать количество монооксида азота.

**Материалы и методы.** Для исследования кровь забиралась через 24 часа после завершающей иммобилизации. Опыты на животных проводили в соответствии с протоколом по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденным Комиссией УО «ВГМУ». Выраженность стресс-реакции оценивали по изменению относительной массы стресс-чувствительных органов – надпочечников, селезенки и тимуса, а также по

концентрации в сыворотке крови кортикостерона, тироксина, трийодтиронина и тиреотропного гормона. Концентрацию диеновых конъюгатов, малонового диальдегида в миокарде определяли по методу В.Б. Гаврилова после экстракции липидов смесью гептана в изопропиловом спирте, диеновых конъюгатов в миокарде – по методу И.Д. Стальной. Содержание диеновых конъюгатов в пробе рассчитывали, учитывая величину молярного коэффициента экстинкции при 233 нм. Малоновый диальдегид определяли при помощи 0,8% тиобарбитуровой кислоты по методу Л.И. Андреевой, И.Д. Стальной. Оценку активности процесса перекисного окисления липидов и общую антиоксидантную активность в плазме крови производили на биохемилюминиметре БХЛ-06 (Россия). Стабильные продукты деградации монооксида азота ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) определяли в сыворотке крови крыс. Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди с последующим фотометрическим определением нитрит-ионов с помощью реакции Грисса. В сыворотке крови экспериментальных животных определяли содержание глюкозы, общего белка, общего билирубина, мочевины, общего холестерина, холестерина ЛПВП, триглицеридов, холестерина ЛПНП, активность аминотрансфераз АлАТ и АсАТ, щелочной фосфатазы, общей креатинфосфокиназы. Тонус сосудов изучали на изолированных кольцах аорты крыс с помощью установки TISSUEBATH 4CHANSYS, (Biopacsystems, США), датчиков силы TSD125, соединенных с системой накопления данных MP150 (программа AcqKnowledge 4.1, Biopacsystems, США). Препарат функционировал в изометрическом режиме. Данные заносили в компьютер, где обрабатывались при помощи программы AcqKnowledge 4.1 Biopacsystems, (США). Вазоконстрикцию изучали путем введения в перфузионный раствор возрастающих концентраций  $\alpha_1$ -адреностимулятора фенилэфрина (от  $10^{-15}$  до  $10^{-3}$  М), эндотелийзависимое расслабление изолированного кольца аорты крыс оценивали классическим способом: предсокращали гладкомышечные клетки кольца аорты фенилэфрином ( $10^{-6}$ М) с последующим кумулятивным добавлением в перфузионный раствор ацетилхолина от  $1 \times 10^{-10}$  до  $3 \times 10^{-5}$  М.

Обработку данных проводили с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STSTATISTICA 6.0 и при помощи программы GraphpadPrism 4.0. Для сравнения двух количественных признаков после проверки на правильность распределения использовали параметрические методы вариационной статистики путем применения t-критерия Стьюдента. Различия принимали достоверными при значении  $p < 0,05$ .

Установлено, что содержание в миокарде крыс диеновых конъюгатов и ТБК-положительных веществ достоверно увеличивалось при остром и хроническом стрессе. Однократная и десятикратная иммобилизации крыс не оказали влияния на активность процесса перекисного окисления липидов, но величина антиоксидантной активности оказалась сниженной на 16,4% только при остром стрессе. Содержание суммы нитратов и нитритов по реакции с реактивом Грисса

в сыворотке крови стрессированных животных повышалось в 1,35 раза при остром стрессе и 1,68 раза – при хроническом стрессе. Следовательно, можно предполагать, что нарушения сердечно-сосудистой системы при стрессе могут быть связаны с влиянием активных форм кислорода на NO-синтазные реакции. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы, мочевины, ХС ЛПНП и уменьшается концентрация триглицеридов и общего белка. Такие изменения биохимических показателей при остром стрессе приводят к почти трехкратному повышению величины коэффициента глюкоза/триглицериды, а также к незначительному, но достоверному повышению величины коэффициента ХС ЛПНП/ХС ЛПВП. Повышенное содержание глюкозы в сыворотке крови сохраняется и при хроническом стрессе. Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при обоих вариантах стрессового воздействия. Выявлено статистически достоверное увеличение активности АлАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса.

Под влиянием острого стресса образуются провоспалительные ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , которые способны индуцировать появление iNOS и, как следствие, усиление эндотелий-зависимой релаксации кольца аорты и ее чувствительности к ацетилхолину, а также снижение констрикторного эффекта фенилэфрина [3]. Учитывая тот факт, что изменения сосудистой реактивности при кратковременном стрессе скорее носят приспособительный характер, чем проявление патологии, можно заключить, что NO, образующийся при участии iNOS также при этом состоянии имеет протекторное значение. Хронический иммобилизационный стресс значительно уменьшает адренореактивность аорты в ответ на действие фенилэфрина и снижает ответную реакцию гладкомышечных клеток на ацетилхолин. При кратковременном стрессе в клетках аорты крыс образуется индуцибельная NO-синтаза, которая может быть в одном случае источником большого количества NO (сопряженное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы), а в другом – супероксидного анион-радикала, подавляющего его биодоступность (разобщенное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы). Учитывая тот факт, что изменения сосудистой реактивности при кратковременном стрессе скорее носят приспособительный характер, все же необходимо констатировать, что NO, синтезируемый индуцибельной NO-синтазой, при этом состоянии может иметь не только протекторное значение, но и быть началом появления агрессивных веществ, повреждающих различные элементы клеток стенки сосуда.

У животных подопытной группы, перенесших интоксикацию паракватом *in vivo*, и после обработки фрагментов аорты *in vitro* паракватом наблюдались отличия в сократительных реакциях аорты на введение  $\alpha_1$ -адреностимулятора. Предварительное внутрибрюшинное введение параквата приводило к снижению

ответа на кумулятивное добавление фенилэфрина. В данной группе животных сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 11% от исходного напряжения) и достигало максимума при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М - прирост 51%. Поэтому можно сделать заключение, что в этой группе животных реакция кольца аорты на действие  $\alpha_1$ -адреностимулятора была менее выражена по сравнению с контролем. Предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* обеспечила более сильную реакцию на фенилэфрин: сократительный ответ аорты начинался при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост напряжения на 46%, а в контроле на 41%); максимум прироста напряжения достигался при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М (прирост на 101,6%, а в контроле на 95%). Анализ полученного материала показал, что внутрибрюшинное введение параквата животным, вероятно, снижало чувствительность аорты к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора, а предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* повышала ее чувствительность к фенилэфрину.

Введение параквата *in vivo* (внутрибрюшинно) не приводило к изменению эндотелий зависимой вазодилатации, так как реакция изолированного кольца аорты крыс на кумулятивное добавление в перфузионный раствор ацетилхолина практически не отличалось у животных этой группы по сравнению с контролем. В данной группе животных дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 21,2%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 63,1%. Чувствительность гладкомышечных клеток аорты животных при введении параквата *in vivo* практически не отличалась от контрольных значений  $1,67 \times 10^{-7}$ . В группе животных, у которых изолированный фрагмент аорты был обработан паракватом *in vitro*, введение параквата не изменяло базальное напряжение сосудов, но значительно снижало вазодилататорный ответ изолированного кольца аорты при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина по сравнению с контрольной группой животных. В группе животных, у которых фрагмент аорты обрабатывался паракватом *in vitro*, дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $3 \times 10^{-7}$  М и составляла 12,6%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 43,8%. При этом у животных данной группы, наблюдалось уменьшение чувствительности гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты к ацетилхолину.  $EC_{50}$  составила при введении параквата *in vitro*  $5,67 \times 10^{-7}$ , тогда как в контроле –  $1,47 \times 10^{-7}$ .

Проведенные исследования показали наличие сложной зависимости систем, определяющих тонус сосудов при стрессе, от характера окислительного стресса.

### Список литературы

1. Селье Г. На уровне целого организма. — М: Наука, 1972.— 122 с.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

2. Элбакидзе Г.М. Внутритканевое регулирование клеточной массы и тканевый стресс / Г.М. Элбакидзе, А.Г. Элбакидзе. – Москва, 2007. – 150 с.

3. Солодков А.П. Изменения эндотелий зависимой дилатации и  $\alpha_1$ -адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцируемой NO-синтазы после ограничения двигательной активности / А.П. Солодков, Н.М. Яцковская // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. - 2013. – Т. 99, № 7. – С. 859-868.