

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ТОНУСА СОСУДОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ У КРЫС

Н.М. Яцковская*, А.А. Чиркин**

*Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

**Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

В последние десятилетия сложилось 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.

Цель исследования – сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ и тонуса сосудов при моделировании острого и хронического стресса.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 119 беспородных белых крыс со средней массой тела 220 г. Животные были разделены на три группы: контроль, острый стресс и хронический стресс. 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. Для исследования окислительного стресса в миокарде определяли концентрацию диеновых конъюгатов, малонового диальдегида; в сыворотке крови – активность процесса перекисного окисления липидов, общую антиоксидантную активность и стабильные продукты деградации монооксида азота (NO_2/NO_3). В сыворотке крови выявляли 13 биохимических маркеров обмена веществ. Тонус сосудов изучали на изолированных кольцах аорты с помощью установки TISSUEBATH 4CHANSYS (Biopacsystems, США). Статистическую обработку цифрового материала проводили с помощью программ STATISTICA 6.0 и Graphpad Prism 4.0.

Результаты и их обсуждение. Установлено увеличение содержания в миокарде крыс диеновых конъюгатов и ТБК-позитивных веществ, суммы нитратов и нитритов в сыворотке крови при остром и хроническом стрессе, а также снижение антиоксидантной активности при остром стрессе. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы, мочевины, холестерина липопротеинов низкой плотности, уменьшается концентрация триглицеридов и общего белка. При остром и хроническом стрессе достоверно повышаются активности АлАТ, АсАТ и КФК. Под влиянием острого стресса образуются провоспалительные ИЛ-16 и ФНО- α , которые способны индуцировать появление индуцибельной NO-синтазы.

Закключение. В статье обоснованы функциональные и биохимические критерии острого и хронического иммобилизационного стресса у крыс.

Ключевые слова: стресс, иммобилизация, крысы, сыворотка крови, миокард, биохимические показатели, тонус сосудов.

PECULIARITIES OF METABOLISM AND TONE OF VESSELS DURING RAT IMMOBILIZATION STRESS

N.M. Yatskovskaya*, A.A. Chirkin**

*Education Establishment "Vitebsk State Medical University"

**Education Establishment "Vitebsk State P.M. Masherov University"

In recent decades, the concept of tissue stress (tissue adaptation syndrome) as a universal nonspecific adaptive response for all tissues of the body, which is formed in tissue in response to the action of various stressors, has been formed.

The aim of the study is to carry out a comparative analysis of changes in metabolic parameters and vascular tone during the simulation of acute and chronic stress.

Material and methods. The study included 119 outbred white rats with an average body weight of 220 g. The animals were divided into three groups: the control, the acute stress and the chronic stress. The severity of the stress reaction was assessed by the change in the relative mass of stress-sensitive organs – the adrenal glands, spleen and thymus, as well as by the concentration of corticosterone, thyroxine, triiodothyronine and thyroid-stimulating hormone in the blood serum. To study oxidative stress in the myocardium, the concentration of diene conjugates, malondialdehyde was identified; in blood serum – the activity of lipid peroxidation process, general antioxidant activity and stable degradation products of nitrogen monoxide (NO_2/NO_3). In the blood serum,

13 biochemical markers of metabolism were identified. Vascular tone was studied on isolated aortic rings using a TISSUEBATH 4CHANSYS device (Biopacsystems, USA). The statistical processing of digital material was performed using STATISTICA 6.0 and Graphpad Prism 4.0 software.

Findings and their discussion. An increase in the content of diene conjugates and TBA-positive substances in the myocardium of rats, the amount of nitrates and nitrites in the blood serum during acute and chronic stress, as well as a decrease in antioxidant activity during acute stress were found out. In acute stress, compared with chronic stress in the blood serum, the concentration of urea, glucose, low-density lipoprotein cholesterol significantly increases, the concentration of triglycerides and total protein decreases. In acute and chronic stress, the activities of ALT, AST and CPK significantly increase. Under the influence of acute stress, pro-inflammatory IL-18 and TNF- α are formed, which are able to induce the appearance of inducible NO synthase.

Conclusion. The article substantiates functional and biochemical criteria for rat acute and chronic immobilization stress.

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

Стрессом называют совокупность неспецифических реакций организма на воздействие различных факторов-стрессоров [1]. В последние десятилетия сложилось 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.) [3; 4]. Адаптация организма к действию стрессоров включает активацию специфических и неспецифических реакций и процессов [5]. В реализации стресс-реакции принимают участие симпатико-адреналовая система, в которую входят симпатическая нервная система и мозговой слой надпочечников с конечными продуктами катехоламинами (норадреналин и адреналин), гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система, конечными продуктами которой являются глюкокортикоиды, а также гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система и ее гормоны трийодтиронин и тироксин. Гормоны этих систем регулируют важнейшие биохимические процессы неспецифической стресс-реакции организма путем мобилизации энергетических и структурных ресурсов организма (активируются реакции липолиза, протеолиза, гликогенолиза, которые приводят к увеличению в крови концентрации глюкозы, жирных кислот, аминокислот, циркулирующих микровезикул с продуктами распада биополимеров). Возникшие простые молекулы доставляются в те органы и ткани, на которые ложится повышенная нагрузка при стрессе, для энергетических (глюкоза, триглицериды) и пластических (аминокислоты, жирные кислоты, нуклеотиды) целей. Вслед за катаболическим эффектом наступает значительно более длительная «анаболическая фаза», в ходе которой активируется синтез нуклеиновых кислот и белков в различных органах, обеспечивающий восстановление структур, пострадавших в период катаболической фазы. Десять лет тому назад были опубликованы сообщения о важной роли микроРНК и подавления синтеза фермента Dicer в развитии стресс-реакции на молекулярном уровне. Эти два фактора участвуют в регуляции экспрессии генов, определяющих чувствительность клеток к действию стрессоров [6; 7]. Одним из важнейших последствий развития окислительного стресса является изменение тонуса сосудов, ведущее к возникновению и прогрессированию артериальной гипертензии и клинических проявлений атеросклероза [8; 9].

Цель исследования – сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ и тонуса сосудов при моделировании острого и хронического стресса.

Материал и методы. Эксперименты поставлены на беспородных белых крысах со средней массой тела 220 г, которые были разделены на три 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) и третья группа – хронический стресс (ежедневная иммобилизация животных в пеналах по 90 минут на протяжении 10–14 суток). 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». Все животные при проведении экспериментов

находились в одинаковых условиях. Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на изучаемые показатели эксперименты с животными проводились в осенне-зимний период в первой половине дня. Содержание крыс, эксперименты и выведение животных из опыта проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями, отраженными в Женевской конвенции «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990) и требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA).

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 гормонов определяли в сыворотке крови методом радиоиммунологического анализа при помощи наборов реактивов: РИА – T_3 -СТ; РИА – T_4 -СТ; ИРМА – ТТГ-СТ, СТЕРОН-К (НИИ ИБОХ, Беларусь) [10].

Иммобилизация крыс в пластиковых пеналах, обеспечивающая их неподвижность в течение 60 минут, соответствует этапу тревоги общего адаптационного синдрома. Животных декапитировали после 60-минутной иммобилизации и отбирали биопробы для анализа. Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) 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. Количество малонового диальдегида рассчитывали, учитывая молярный коэффициент экстинкции триметинового комплекса. Оценку активности процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общую антиоксидантную активность (АОА) в плазме крови производили на биохемилюминиметре БХЛ-06 (Россия). Метод индуцирования хемилюминесценции перекисью водорода с сульфатом железа основан на том, что в представленной системе происходит каталитическое разложение перекиси водорода ионами металла с переходной валентностью – двухвалентным железом в соответствии с реакцией Фентона. Протекающий свободнорадикальный процесс регистрируется в течение 40 секунд. Для оценки активности перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности плазмы регистрировали максимальную интенсивность свечения ($I_{\max}$, мВ), пропорциональную уровню перекисного окисления липидов, светосумму (S , мВ $\times$ сек) свечения, обратно пропорциональную антиоксидантной активности, и $\lg 2\alpha$ – тангенс угла убывания сигнала после достижения максимальной интенсивности, характеризующий скорость снижения свободнорадикальных процессов. Стабильные продукты деградации монооксида азота (NO_2/NO_3) выявляли 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 исследованием нитрит-ионов с помощью реакции Грисса [10–12].

В сыворотке крови экспериментальных животных определяли содержание глюкозы (глюкозооксидазный метод) и общего белка (биуретовый метод), используя наборы фирмы «Ольвекс Диагностикум»; общего билирубина (метод Йендрашика–Грофа), мочевой кислоты (уриказный метод). С помощью лабораторного анализатора Mindray BS-200 (Китай) и наборов фирмы «Sprinreact» определяли содержание мочевины (уреазный кинетический метод), общего холестерина (метод CHOD-PAP энзиматический), холестерина ЛПВП – ХС ЛПВП (метод прямой ферментативный), триглицеридов (метод CHOD-PAP энзиматический), холестерин ЛПНП – ХС ЛПНП (метод прямой ферментативный); оценивали активность аминотрансфераз АлАТ и АсАТ (IFCC), щелочной фосфатазы – ЩФ (DEA-буфер), активность общей креатинфосфокиназы – КФК (метод DOKS) с помощью наборов фирмы «Анализ МЕД». В процессе лабораторных исследований контроль качества проводился с использованием контрольных сывороток «Мультиконт Витал (РФ)» [13].

Тонус сосудов изучали на изолированных кольцах аорты 32 крыс с помощью установки TISSUE-BATH 4CHANSYS, (Bioracsystems, США), датчиков силы TSD125, соединенных с системой накопления данных MP150 (программа AcqKnowledge 4.1, Bioracsystems, США). Препарат функционировал в изометрическом режиме. Данные заносили в компьютер, где обрабатывались при помощи программы AcqKnowledge 4.1 Bioracsystems (США). Вазоконстрикцию изучали путем введения в перфузионный раствор возрастающих концентраций α_1 -адреностимулятора фенилэфрина (от 10^{-15} до 10^{-3} М), который связывается с α_1 -рецептором семейства GPCR в артериолах. 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 1×10^{-10} до 3×10^{-5} М [8; 10].

Обработку данных проводили с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 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 $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Оценка выраженности стресса. В табл. 1 представлены материалы по сравнительной характеристике органных и гормональных показателей при остром и хроническом стрессовом воздействии.

Таблица 1

Выраженность стресс-реакции, концентрация гормонов, интерлейкинов в сыворотке крови и продуктов деградации монооксида азота (NO_2/NO_3)

Показатель	Контроль	Острый стресс	Хронический стресс
Относительная масса надпочечников, мг/100 г массы тела (n=13)	25,3±0,9	30,2±0,7 ¹	29,8±0,74 ¹
Относительная масса тимуса, мг/100 г массы тела (n=13)	205,7±13,5	173,4±3,30 ¹	175,3±4,79 ¹
Относительная масса селезенки, мг/100 г массы тела (n=13)	485,6±12,1	451,5±17,2	414,2±6,45 ¹
Кортикостерон сыворотки крови, нМ/л (n=21)	7,5±1,2	23,0±2,7 ¹	10,7±2,5
Трийодтиронин, нмоль/л (n=22)	2,33±0,04	2,10±0,10 ¹	2,11±0,07 ¹
Тироксин, нМ/л (n=22)	45,6±2,9	38,4±2,5 ¹	43,6±2,11
Тиреотропный гормон, мМе/л (n=18)	0,29±0,03	0,30±0,10	0,30±0,04
Интерлейкин-1β, пг/мл (n=7)	19,2±2,6	38,3±3,5 ¹	–
Фактор некроза опухоли-α, пг/мл (n=7)	–	5,1±1,3	–

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс «контроль».

Из анализа данных табл. 1 следует, что относительная масса надпочечников достоверно повышена, а относительная масса тимуса снижена при остром и хроническом стрессе. Относительная масса селезенки снижена только при хроническом стрессе. Максимальная концентрация кортикостерона выявлена при остром стрессе; при хроническом стрессе уровень кортикостерона снижается, хотя еще превышает контрольные значения на 43%. Содержание трийодтиронина снижено как при остром, так и хроническом стрессе, а снижение уровня тироксина обнаружено только при остром стрессе. При остром стрессе выявлено повышение уровня интерлейкина-1β и обнаружено наличие фактора некроза опухоли-α.

Проявления окислительного стресса. В табл. 2 представлены показатели, характеризующие развитие окислительного стресса при иммобилизации животных. Из анализа данных табл. 2 следует, что в миокарде крыс достоверно повышено содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида как при остром, так и при хроническом стрессе. В отличие от постоянной повышенной концентрации диеновых конъюгатов у всех стрессированных крыс уровень малонового диальдегида был повышен в 7,61 раза при остром стрессе, а при хроническом стрессе превышал исходный уровень всего в 1,72 раза. В плазме крови показатель перекисного окисления липидов не изменялся при иммобилизации крыс, но антиоксидантная активность оказалась достоверно сниженной при остром стрессе. При остром и хроническом стрессе отмечено повышение величин отношения NO_2/NO_3 . Приведенные данные не противоречат общепринятым характеристикам иммобилизационного стресса.

Содержание ДК, МДА в миокарде и АОА, ПОЛ и NO₂/NO₃ в сыворотке крови при остром и хроническом стрессе

Показатель	Контроль (n=11)	Острый стресс (n=8)	Хронический стресс (n=7)
ДК, нМ/г липидов	110,2±9,66	247,0±14,0 ¹	209,6±34,0 ¹
МДА, нМ/г белка	53,9±4,40	410,3±33,1 ^{1, 2}	92,5±9,1 ¹
(АОА) S, мВ×сек	11,143±0,120	9,316±0,39 ^{1, 2}	11,28±0,21
(ПОЛ) I max, мВ	1,1853±0,0112	1,164±0,034	1,245±0,049
NO ₂ /NO ₃ , мкМ/л	23,7±0,48	32,0±1,5 ¹	39,8±0,9 ¹

Примечание: ¹ – P<0,05 при сравнении с контролем; ² – P<0,05 при сравнении с группой «хронический стресс».

Биохимические показатели обмена веществ при стрессе. В табл. 3 представлены данные о зависимости биохимических показателей обмена веществ в сыворотке крови крыс от типа стрессового воздействия.

Таблица 3

Биохимические показатели при остром и хроническом иммобилизационном стрессе у крыс

Показатель	Группа животных		
	Контроль (n=10)	Острый стресс (n=12)	Хронический стресс (n=7)
Глюкоза, ммоль/л	6,98±0,23	9,02±0,55 ¹	7,87±0,25 ¹
Триглицериды, ммоль/л	1,17±0,10	0,57±0,02 ¹	1,25±0,14
Глюкоза/триглицериды	5,96±0,55	15,8±0,87 ¹	6,30±0,52
Мочевина, ммоль/л	5,41±0,19	6,77±0,35 ¹	5,46±0,11
Билирубин, мкмоль/л	3,97±0,09	4,27±0,20	3,73±0,19
Мочевая кислота, ммоль/л	0,10±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01
Холестерол, ммоль/л	1,60±0,09	1,70±0,12	1,63±0,11
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,69±0,03	0,64±0,04	0,73±0,04
ХС ЛПНП, ммоль/л	0,91±0,02	1,06±0,03 ¹	0,90±0,04
ХС ЛПНП/ХС ЛПВП	1,32±0,07	1,65±0,09 ¹	1,23±0,11
Общий белок, г/л	83,3±2,06	68,4±0,83 ¹	79,0±0,90
АлАТ, Ед/л	73,7±4,64	101,8±4,83 ¹	91,4±3,38 ¹
АсАТ, Ед/л	207±15,1	480±26,4 ¹	253±14,9 ¹
ЩФ, Ед/л	190±18,7	193±16,1	195±20,5
КФК, Ед/л	2769±176	4561±303 ¹	4087±357 ¹

Примечание: ¹ – P<0,05 по сравнению с группой крыс «контроль».

Из анализа данных табл. 3 следует, что при остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы в 1,29 раза и уменьшается концентрация триглицеридов в 2,05 раза. Такие изменения обеспечивают статистически достоверное увеличение коэффициента глюкоза/триглицериды в 2,65 раза. Следовательно, шестичасовая фиксация животных в нефизиологическом положении приводит к мобилизации углеводных ресурсов клеток, что усиливает транспорт глюкозы, на фоне частичного истощения содержания триглицеридов в кровеносном русле. По всей видимости, это рациональная форма перераспределения соотношения транспортных форм энергии, поскольку для центральной нервной системы глюкоза является наиболее

быстро мобилизуемым и предпочтительным источником обеспечения клеток энергией. При хроническом стрессе отмечаются признаки адаптации, поскольку концентрация глюкозы статистически достоверно повышена только в 1,13 раза, а уровень циркулирующих триглицеридов находится в пределах контрольных значений. В итоге значения коэффициента глюкоза/триглицериды практически не отличаются от контрольных значений.

Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при обоих вариантах стрессового воздействия, но содержание мочевины увеличивается при остром стрессе. Причинами роста концентрации сывороточной мочевины в результате шестичасовой иммобилизации могут быть два процесса: усиление синтеза мочевины при повышенном катаболизме гликогена в печени либо уменьшение фильтрационной функции почек за счет спазма сосудов при остром стрессе. Следовательно, можно сделать заключение, что при испытанных моделях стрессового воздействия не нарушаются превращения гемоглобина в билирубин, пуриновых азотистых оснований нуклеотидов и нуклеиновых кислот до мочевой кислоты и пути синтеза холестерина из основного метаболита общего пути катаболизма – ацетил-КоА.

Острый стресс приводит к достоверному уменьшению общего белка в сыворотке крови при одновременном увеличении содержания холестерина липопротеинов низкой плотности и величины отношения ХС ЛПНП/ХС ЛПВП. Подобные результаты возможны при тканевом депонировании крови при остром стрессе, приводящем к уменьшению циркулирующей плазмы крови и кажущемуся накоплению в ней глобулинов, транспортирующих холестерин [6]. Поскольку уровень общего холестерина в сыворотке крови у этих животных не изменялся, можно в увеличении показателей ХС ЛПНП и ХС ЛПНП/ХС ЛПВП видеть признаки проатерогенного действия острого стресса.

Анализ изменений ферментативных показателей сыворотки крови свидетельствует о том, что проницаемость мембран клеток паренхиматозных органов может быть наиболее уязвимым процессом при действии стрессовых факторов. Такое заключение иллюстрирует статистически достоверное увеличение активности АсАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы, являющейся индикатором состояния мембран клеток желчевыводящих путей и костной ткани, не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса. Зависимость активности ферментов от характера стрессового воздействия наиболее четко проявляется при сравнении некоторых коэффициентов. Например, величины коэффициента АсАТ/АлАТ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе составили 2,81, 4,71 и 2,77, соответственно, что означает, что острый стресс вызывает преимущественный выход в плазму крови аспартат-аминотрансферазы, вероятно, из мышечных тканей. Величины коэффициента КФК/ЩФ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе составили 14,57, 23,6 и 20,9, соответственно. Такие изменения подтверждают факт выхода КФК из мышечной ткани при обоих вариантах стресса. И, наконец, сравнение величин коэффициента КФК/АсАТ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе (13,4, 9,5 и 16,2, соответственно) показывает, что при остром стрессе выход в кровь АсАТ выше, чем аналогичный выход КФК. Однако при хроническом стрессе преобладает выход в кровеносное русло креатинфосфокиназы, что свидетельствует о повреждении саркомеров мышечных волокон.

Тонус сосудов при остром стрессе. Эндотелийзависимая релаксация. Исходное напряжение кольца аорты во всех исследуемых группах животных не различалось и в среднем составляло $1824 \pm 13,8$ мг. Сократительный ответ кольца аорты на фенилэфрин между исследуемыми группами не различался (в среднем составил $3370 \pm 100,7$ мг). В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина дилатация кольца аорты началась при концентрации 5×10^{-8} М и составила 12%. При этом максимальная дилатация при концентрации ацетилхолина в перфузате 3×10^{-5} М достигла 64%. В группе животных, перенесших острый стресс, дилатация изолированного кольца аорты началась при концентрации ацетилхолина в ванночке 1×10^{-8} М и составила 19%. При концентрации ацетилхолина 5×10^{-8} М – 46%, что было на 33% больше, чем в контроле ($p < 0,05$). Максимальная дилатация в группе животных, перенесших острый стресс, при концентрации ацетилхолина 3×10^{-5} М достигла 85%. При этом в группе животных «острый стресс» наблюдалось увеличение чувствительности гладкомышечных клеток аортальных сосудов к ацетилхолину. Так, концентрация ацетилхолина, вызывающая

50% ответную реакцию (EC50) гладкомышечных клеток аортальных сосудов, составила при остром стрессе $4,531 \times 10^{-8} \text{ М}$ (в контроле EC50 – $1,584 \times 10^{-7} \text{ М}$).

Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS (индуцированная NO-синтаза) S-метилизотиомочевина (S-MT) в контрольной группе животных не оказало влияние на выраженность эндотелийзависимой релаксации кольца аорты. Напротив, в группе животных, перенесших однократный непродолжительный стресс, инкубирование сегмента аорты с S-MT сопровождалось расслаблением гладкомышечных клеток, которое начиналось при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-8} \text{ М}$ и составило 14%. Максимальная дилатация при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-5} \text{ М}$ достигла 61%. Несмотря на то, что блокатор индуцированной NO-синтазы в значительной степени ограничивал усиление эндотелийзависимой вазодилатации в группе «острый стресс+S-MT», чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов оставалась повышенной (EC50 равно $8,483 \times 10^{-8} \text{ М}$, против контроля, где EC50 было $1,584 \times 10^{-7} \text{ М}$, $p < 0,05$). Этот факт указывает на то, что кратковременное однократное стрессорное воздействие сопровождается, вероятно, образованием индуцированной NO-синтазы.

Эндотелийнезависимая вазоконстрикция. Дозозависимое (от 10^{-15} до 10^{-3} М) введение α_1 -адреностимулятора фенилэфрина приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крыс. В контрольной группе животных сократительный ответ изолированного кольца аорты крыс на возрастающие концентрации фенилэфрина проявлялся при концентрации 10^{-13} М и составил 14% от исходного напряжения, а при концентрации 10^{-6} М ответная реакция соответствовала 100%. В группе животных, перенесших острый стресс, сокращение кольца аорты начиналось, как и в контроле, при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М и составляло 25% от исходного напряжения, достигая максимума при концентрации фенилэфрина 10^{-6} М – 93%. Необходимо отметить, что в группе животных «острый стресс» реакция на фенилэфрин была более выражена при низких концентрациях α_1 -адреностимулятора по сравнению с контролем, в то время как при повышении концентрации фенилэфрина наблюдался противоположный эффект. Чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину оказалась более высокой в группе контрольных животных (EC50 была $5,179 \times 10^{-12} \text{ М}$ по сравнению с группой крыс «острый стресс», в которой EC50 равнялась $3,497 \times 10^{-11} \text{ М}$). Добавление в перфузионный раствор блокатора iNOS S-MT частично увеличивало чувствительность гладкомышечных клеток кольца аорты к фенилэфрину в группе животных, перенесших кратковременный однократный стресс.

Тонус сосудов при хроническом стрессе. Вазодилатация. В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина вазодилатация кольца аорты начиналась при концентрации $1 \times 10^{-7} \text{ М}$ и составляла 23,4%. Максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе $3 \times 10^{-5} \text{ М}$ и достигала 57%. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT в контрольной группе животных не оказало влияния на выраженность эндотелийзависимой дилатации кольца аорты. На фоне перенесенного хронического стресса при концентрации ацетилхолина $1 \times 10^{-7} \text{ М}$ расслабление составило 17%, а при концентрации $3 \times 10^{-5} \text{ М}$ ответная реакция достигла 46%, что меньше, чем в контроле. В группе животных, перенесших хронический иммобилизационный стресс, инкубирование сегмента аорты с S-MT сопровождалось усилением вызываемого ацетилхолином расслабления гладкомышечных клеток аорты.

Вазоконстрикция. Дозозависимое (от 10^{-15} до 10^{-6} М) введение α_1 -адреностимулятора фенилэфрина приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы. При концентрации фенилэфрина 10^{-11} М прирост 39% от исходного напряжения, а при концентрации 10^{-6} М ответная реакция возросла на 89% и достигла максимального значения. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT в контрольной группе животных не оказало влияния на выраженность сократительной активности изолированного кольца аорты крысы. На фоне перенесенного хронического иммобилизационного стресса дозозависимое увеличение концентрации фенилэфрина в ванночке закономерно приводило к увеличению сократительной активности сегмента аорты. При концентрации фенилэфрина 10^{-11} М прирост напряжения составил 19%, а при концентрации 10^{-6} М ответная реакция достигла 51%. На фоне перенесенного хронического стресса добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT приводило к усилению ответа аорты на фенилэфрин. Таким образом, в группе животных, подвергнутых храни-

ческому иммобилизационному стрессу, реакция на фенилэфрин была менее выражена по сравнению с контролем.

Особый интерес вызывает «атипичная» реакция кольца аорты крыс, перенесших 60-минутную иммобилизацию, на ацетилхолин и фенилэфрин. При этом типе реагирования дилататорная реакция кольца аорты стрессированных крыс на ацетилхолин не изменялась, а констрикторная на фенилэфрин усиливалась по сравнению с контролем. После обработки этих колец аорты S-MT вызываемая ацетилхолином дилататорная реакция увеличилась и стала характерной для стрессированных животных, у которых активность индуцибельной NO-синтазы не была ингибирована. В то же время констрикторный ответ кольца аорты на фенилэфрин под влиянием S-MT возрастал в значительно меньшей степени, чем у крыс с «классическим» типом реагирования. Подобный тип реагирования свидетельствует о том, что в клетках аорты этой подгруппы животных, перенесших 60-минутную иммобилизацию, также появляется индуцибельная NO-синтаза, однако она не производит характерного для нее большого количества NO. Более того S-метилизотиомочевина усиливает образование NO и, как следствие, вызываемую ацетилхолином эндотелийзависимую дилатацию аорты крыс, перенесших иммобилизацию. Подобное возможно лишь в том случае, если у вновь образовавшейся индуцибельной NO-синтазы субъединицы разобщены и такой фермент вместо NO производит в основном супероксидный анион-радикал. Последний связываясь с NO, синтезирующимся эндотелиальной NO-синтазой, уменьшает его биодоступность. Наступающее после ингибирования индуцибельной NO-синтазы усиление вызываемой ацетилхолином эндотелийзависимой дилатации аорты стрессированных крыс может быть связано с угнетением ее супероксид-анион-продуцирующей активности. В этом случае он соединяется с NO, синтезирующимся конститутивной синтазой монооксида азота (eNOS), и уменьшает его биологическую доступность. Поэтому наступающее после ингибирования iNOS усиление вызываемой ацетилхолином эндотелийзависимой дилатации аорты стрессированных крыс может быть обусловлено как стресс-индуцированным повышением активности eNOS, так и увеличением биодоступности синтезируемого ею NO [10; 14; 15].

Заключение. Таким образом, содержание в миокарде крыс диеновых конъюгатов (нмоль/г липидов) и ТБК-позитивных веществ (нмоль/г белков) достоверно увеличивалось при остром и хроническом стрессе. Однократная и десятикратная иммобилизации крыс не повлияли 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.

Установлены фенотипические показатели обмена веществ в сыворотке крови, позволяющие выявить существенные различия в развитии острого и хронического стресса. 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 β и ФНО- α , которые способны индуцировать появление iNOS и, как следствие, усиление эндотелийзависимой релаксации кольца аорты и ее чувствительности к ацетилхолину, а также снижение констрикторного эффекта фенилэфрина. Учитывая тот факт, что изменения сосудистой реактивности при кратковременном стрессе скорее носят приспособительный характер, чем проявлением патологии, можно заключить, что NO, образующийся при участии iNOS, при этом состоянии имеет и 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 [10].

В представленной статье использованы научные данные, часть из которых была получена под научным руководством доктора медицинских наук, профессора А.П. Солодкова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селье, Г. На уровне целого организма / Г. Селье. – М.: Наука, 1972. – 122 с.
2. Элбакидзе, Г.М. Внутритканевое регулирование клеточной массы и тканевый стресс / Г.М. Элбакидзе, А.Г. Элбакидзе. – М., 2007. – 150 с.
3. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
4. Чиркин, А.А. Биологическая химия: учебник / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – Минск: Вышэйшая школа, 2017. – 411 с.
5. Литвицкий, П.Ф. Патопфизиология: учебник / П.Ф. Литвицкий. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009. – 496 с.
6. Anderson, R.M. A role for Dicer in aging and stress survival / R.M. Anderson // Cell Metabolism. – 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 285–286.
7. Mori, M.A. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity / M.A. Mori [et al.] // Cell Metabolism. – 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 336–347.
8. Яцковская, Н.М. Состояние вазоконстрикции и эндотелийзависимой дилатации при моделировании окислительного стресса введением параквата / Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // Новости медико-биологических наук. – 2020. – Т. 20, № 1. – С. 23–29.
9. Чиркин, А.А. Тонус кровеносных сосудов и окислительный стресс / А.А. Чиркин, Н.М. Яцковская // Новости медико-биологических наук. – 2020. – Т. 20, № 3. – С. 170–180.
10. Солодков, А.П. Изменения эндотелийзависимой дилатации и α_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.
11. Солодков, А.П. Провоспалительные цитокины и эндотелийзависимая дилатация при остром стрессе / А.П. Солодков [и др.] // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса: материалы 3-й Междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 16–17 апр. 2013 г. / Витеб. гос. ун-т. – Витебск, 2013. – С. 83–87.
12. Яцковская, Н.М. Некоторые параметры свободнорадикальных процессов в миокарде и сыворотке крови крыс при моделировании острого и хронического стресса / Н.М. Яцковская // Свободные радикалы в химии и жизни: тез. докл. 3-й Междунар. конф., Минск, 10–11 окт. 2019 г. / Белорус. гос. ун-т; отв. ред. О.И. Шадыро. – Минск, 2019. – С. 88.
13. Гурская, А.И. Биохимические критерии острого и хронического стресса при иммобилизации крыс / А.И. Гурская [и др.] // Весн. Віцеб. дзярж. ун-та. – 2017. – № 1(98). – С. 61–65.

REFERENCES

1. Selye G. *Na urovne tselogo organizma* [On the Level of the Whole Body], M.: Nauka, 1972, 122 p.
2. Elbakidze G.M., Elbakidze A.G. *Vnutritkanevoye regulirovaniye kletочноy massy i tkanevy stress* [Inner-Tissue Regulation of Cell Mass], Moscow, 2007, 150 p.
3. Menshchikova Ye.B. *Okislitelny stress. Prooksidanty i antioksidanty* [Oxidation Stress. Prooxidants and Antioxidants], M.: Firma "Slovo", 2006, 556 p.
4. Chirkin A.A., Danchenko Ye.O. *Biologicheskaya khimiya: uchebnik* [Biological Chemistry. Textbook], Minsk: Vysheyschaya shkola, 2017, 411 p.
5. Litvitskiy P.F. *Patofiziologiya: uchebnik* [Pathophysiology. Textbook], M.: GEOTAR-Media, 2009, 496 p.
6. Anderson, R.M. A role for Dicer in aging and stress survival / R.M. Anderson // Cell Metabolism. – 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 285–286.
7. Mori, M.A. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity / M.A. Mori [et al.] // Cell Metabolism. – 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 336–347.
8. Yatskovskaya N.M., Chirkin A.A. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Medical and Biological Sciences], 2020, 20(1), pp. 23–29.
9. Chirkin A.A., Yatskovskaya N.M. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Medical and Biological Sciences], 2020, 20(3), pp. 170–180.
10. Solodkov A.P., Yatskovskaya N.M. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova* [Russian I.M. Sechenov Physiological Journal], 2013, 99(7), pp. 859–868.
11. Solodkov A.P. *Fundamentalniye i prikladnyye problemy stressa: materialy 3-y Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, Vitebsk, 16–17 aprelya 2013 g.* [Fundamental and Applied Issues of Stress. Proceedings of the 3rd International Scientific and Practical Conference, Vitebsk, April 16–17, 2013], Vitebsk: VGU imeni P.M. Masherova, 2013, pp. 83–87.
12. Yatskovskaya N.M. *Svobodnyye radikaly v khimii i zhizni. Tez. dokl. 3-y Mezhdunar. konf., Minsk, 10–11 oktyabrya 2019 g.* [Free Radicals in Chemistry and Life, Reports of the 3rd International Conference, Minsk, October 10–11, 2019], Minsk: BGU, 2019, p. 88.
13. Gurskaya A.I. *Vesnik VDU* [Journal of VSU], 2017, 1(98), pp. 61–65.

Поступила в редакцию 21.06.2021

Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.