

На правах рукописи

Скрипкина Дарья Викторовна

**Физиологические показатели у крыс после хронического непредсказуемого
мягкого стресса разной длительности**

1.5.5. Физиология человека и животных

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН **Перцов Сергей Сергеевич**

Официальные оппоненты:

Бобынцев Игорь Иванович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой патофизиологии

Любашина Ольга Анатольевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, заведующий лабораторией кортико-висцеральной физиологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиоцентре ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Одним из актуальных направлений исследований в медико-биологической науке является изучение механизмов развития стресс-ответа у млекопитающих в условиях экстремальных воздействий. Нарушения физиологических процессов при стрессорных нагрузках могут сопровождаться формированием многих расстройств: гипертонии (Амбатьелло Л.Г., 2022; Sheng Z. F. *et al.*, 2023), инсульта (Maalouf E. *et al.*, 2023), диабета (Ingrosso D.M.F. *et al.*, 2023; Lisco G. *et al.*, 2024), ожирения (Masood B., Moorthy M., 2023), аутоиммунных и воспалительных болезней (Miller F.W., 2023; Shimo Y. *et al.*, 2023) и других.

В настоящее время описаны некоторые нейрогуморальные механизмы, лежащие в основе смещения баланса между стресс-реализующей и стресс-лимитирующей системами в условиях острого и хронического стресса (Sanson A., Riva M.A., 2020; Nakamoto K., Tokuyama S., 2023). Гиперактивация стресс-реализующих систем организма при длительных, многократно повторяющихся стрессорных нагрузках приводит к устойчивому росту содержания одного из классических стресс-гормонов – кортикостерона – в крови (Мураева Н.А. и др., 2021; Woo H. *et al.*, 2018), а также к нарушению механизмов регуляции по принципу отрицательной обратной связи со стороны глюкокортикоидных гормонов. Эта начальная адаптивная гиперкортизолемическая фаза может перейти во вторичное, компенсаторное и самоподдерживающееся подавление активности ГГН-комплекса со снижением выработки кортизола по принципу отрицательной обратной связи (Agorastos, A., Chrousos, G.P., 2022).

В контексте адаптивной реакции организма на стрессорные воздействия как глюкокортикоиды, так и катехоламины оказывают катаболическое действие, что определяет мобилизацию энергетических ресурсов (Гуцол Л.О. и др., 2022; Van der Koop M.A., 2020). Метаболические изменения, часто происходящие при стрессовых нагрузках, включают в себя увеличение массы тела, нарушения метаболизма жиров и углеводов, висцеральное ожирение, что во многом связано с длительным выбросом глюкокортикоидных гормонов и нейропептида-γ

(Rabasa C., Dickson L.S., 2016; Ip C.K. *et al.*, 2019; Ha G.E., Cheong E., 2021).

В настоящее время имеются доказательства изменений ноцицепции при стрессорных нагрузках: болевая реакция на физические или психологические раздражители может как усиливаться, так и снижаться. Многие исследователи сходятся во мнении о том, что продолжительные стрессорные воздействия могут приводить к формированию хронической боли (Abdallah C.G., Geha P., 2017; Vachon-Preseau E., 2018; Egle U.T. *et al.*, 2020; Levasseur B.M. *et al.*, 2023).

Большую роль в реализации адаптационно-компенсаторных процессов у млекопитающих в условиях стресса играет иммунная система; при длительных стрессорных нагрузках может наблюдаться дисрегуляция компонентов данной системы (Chan K.L. *et al.*, 2023; Veurel E., 2024; Dhabhar F.S., 2024). В этом плане внимание уделяется анализу вовлечения системы комплемента крови (Chen H.J.C. *et al.*, 2024), цитокинов (Субботина А.Ю. и др., 2022) и других иммунных веществ в организацию стресс-реакций. Обнаружено, что комплемент оказывает модулирующее действие на нейрогенез и реструктуризацию синапсов, процессы синаптической пластичности, лежащие в основе обучения и памяти во взрослом мозге (Westacott L.J. *et al.*, 2022; Tang S. *et al.*, 2024). Показано, что снижение уровня ИЛ-4 способствует депрессивно-подобному поведению за счет подавления активности переносчика серотонина в клетках микроглии (Wachholz S. *et al.*, 2017; Smaniotto T.A. *et al.*, 2023). ИЛ-10 вовлечен в регуляцию циркадных ритмов, подавляя синтез просомногенных медиаторов (ФНО, ИЛ-1) и увеличивая продукцию антисомногенных веществ (Zeffferino R. *et al.*, 2021). Эти факторы во многом определяют поведенческие и иные реакции при стрессе.

Важно отметить, что последствия стрессорных нагрузок индивидуальны и во многом зависят от характера, длительности и силы воздействия. Сказанное относится к сложным, часто разнонаправленным колебаниям обмена углеводов (Morakinyo A.O. *et al.*, 2016; Teofilovic A. *et al.*, 2020), болевой чувствительности (Noursadeghi E., Naghparast A., 2023; Baghani M. *et al.*, 2024), иммунных параметров – цитокинового профиля крови (Hong M. *et al.*, 2013; Перцов С.С. и др., 2018, 2022) и других показателей в условиях стресса.

Цель исследования

Цель исследования: изучение особенностей показателей ноцицепции, эндокринных и иммунных функций, а также обменных процессов у крыс после многократных чередующихся стрессорных воздействий разной длительности.

Задачи исследования

1. Проанализировать характер изменений концентрации кортикостерона в крови крыс через 1, 2, 3 и 4 недели стрессорных нагрузок на модели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

2. Оценить изменения массы тела крыс через 1, 2, 3 и 4 недели стрессорных нагрузок на модели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

3. Изучить изменения уровня глюкозы в крови крыс через 1, 2, 3 и 4 недели стрессорных нагрузок на модели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

4. Исследовать некоторые показатели цитокинового профиля крови у крыс – концентрацию ИЛ-4 и ИЛ-10 – через 1, 2, 3 и 4 недели стрессорных нагрузок на модели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

5. Определить функциональную активность системы комплемента крови у крыс через 1, 2, 3 и 4 недели стрессорных нагрузок на модели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

6. Оценить показатели ноцицептивной чувствительности крыс через 1, 2, 3 и 4 недели стрессорных нагрузок на модели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

7. Выявить возможные взаимосвязи между изученными физиологическими показателями у крыс через 1, 2, 3 и 4 недели стрессорных нагрузок на модели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

Научная новизна работы

В диссертации впервые выявлены особенности изменений эндокринных функций у крыс в разные периоды многократного предъявления чередующихся стресс-факторов. Показано, что хронический непредсказуемый мягкий стресс сопровождается снижением уровня кортикостерона в крови к окончанию 1-й и

2-й недель воздействий с последующим его восстановлением через 3 и 4 недели.

Получены новые данные о специфике показателей обменных процессов у крыс – массы тела и содержания глюкозы в крови – в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса. Показано, что животные, подвергнутые многократным чередующимся стрессорным нагрузкам в течение 1 недели, характеризуются отсутствием наблюдающегося в контроле увеличения массы тела, а также замедленным темпом роста в следующие временные периоды. Выявлено, что моделирование хронического непредсказуемого мягкого стресса приводит к увеличению уровня глюкозы в крови к окончанию 2-й недели.

Обнаружены особенности изменений некоторых иммунных параметров у крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности. При этом выявлено снижение уровня ИЛ-4 во все периоды исследования, статистически значимо – к окончанию 2-й и 4-й недель стрессорных нагрузок. Концентрация ИЛ-10 демонстрирует тенденцию к росту уже после 1-й недели воздействий, выражено превышая данный показатель у интактных особей через 2, 3 и 4 недели после начала наблюдений. Показано, что функциональная активность системы комплемента возрастает через 2 недели, но уменьшается и практически не отличается от такового у интактных особей к окончанию 3-й и 4-й недель моделирования состояния хронического стресса.

Продемонстрирована специфика показателей различных компонентов болевой чувствительности при многократных стрессорных нагрузках. Показано, что хронический непредсказуемый мягкий стресс у крыс сопровождается усилением эмоционального компонента ноцицепции по сравнению с исходным значением через 1 неделю, но не по окончании 2-й, 3-й и 4-й недель воздействий. В указанных условиях перцептуальный компонент ноцицепции не изменяется.

Ежедневные чередующиеся стрессорные нагрузки у животных приводят к появлению отсутствующих в норме корреляций между показателями ноцицепции, эндокринных и иммунных процессов, а также обмена веществ, характер которых зависит от длительности воздействий. Полученные данные иллюстрируют дисрегуляцию физиологических функций в ранние периоды

хронического непредсказуемого мягкого стресса с дальнейшей реализацией адаптивных процессов и тесного межсистемного взаимодействия на поздних сроках многократных предъявлений различных стрессогенных факторов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные могут быть применены в научно-исследовательской работе и клинической практике. Теоретическое значение работы определяется расширением знаний о физиологических механизмах формирования негативных последствий хронического стресса у млекопитающих. Доказано, что характер изменений показателей ноцицепции, иммунных, эндокринных и метаболических параметров зависит от длительности стрессорных нагрузок. Представлены факты, иллюстрирующие особенности стресс-реакции на разных временных стадиях многократного воздействия чередующихся стрессогенных факторов.

Результаты проведенной работы перспективны для дальнейшего изучения этиопатогенеза стресс-индуцированных расстройств, могут найти применение в ходе разработки новых подходов к коррекции и/или профилактике эндокринных, иммунных и метаболических нарушений, болевых синдромов при стрессовых нагрузках в изменяющихся условиях внешней среды. Материалы исследования целесообразно использовать в курсе преподавания нормальной физиологии, патологической физиологии, эндокринологии и иммунологии.

Положения, выносимые на защиту

1. Многократные воздействия разных стрессогенных факторов у крыс оказывают специфическое влияние на ноцицептивную чувствительность, показатели эндокринных и иммунных функций, метаболические параметры.

2. Характер изменений анализируемых физиологических показателей у крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса различается в зависимости от продолжительности стрессорных воздействий.

3. Изменения регуляции ряда физиологических функций наблюдаются в ранние периоды хронического непредсказуемого мягкого стресса, тогда как реализация адаптивных процессов и тесного межсистемного взаимодействия происходит на поздних сроках повторяющихся стрессорных воздействий.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается достаточным числом экспериментальных крыс, применением адекватных современных методов и подходов, которые соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Обработка результатов выполнена с помощью современных средств и методов обработки информации, статистического анализа данных.

Основные научные положения и выводы диссертации представлены на следующих научных мероприятиях: XIX Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2023); XXVII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2024); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024» (Москва, 2024); II Межинститутский научный семинар молодых учёных и специалистов по биомедицине (Москва, 2024); конференции лаборатории системных механизмов эмоционального стресса и боли ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (Москва, 2023-2024); Всероссийская научно-практическая конференция «Научное наследие академика И.П. Павлова и современная наука» (Рязань, 2024); XXII Конференция молодых учёных, специалистов и студентов, посвященная 300-летию РАН (Москва, 2024); Конференция с международным участием «Системный подход в медицине и образовании», посвященная Научной школе выдающегося физиолога академика П.К. Анохина (Москва, 2024).

Личный вклад автора заключался в сборе первичного материала и его обработке, анализе литературы по изучаемой проблеме. Эксперименты на крысах-самцах Вистар, моделирование хронического стресса, изучение массы тела и ноцицепции, проведение глюкометрии, измерение уровня кортикостерона и цитокинов (иммуноферментный анализ), исследование функциональной активности системы комплемента в крови автор проводил лично.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, отражающих основное содержание исследований: из них 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы». Список литературы содержит 234 источника, из них 45 отечественных и 189 зарубежных. Диссертация изложена на 135 страницах, иллюстрирована 15 таблицами и 8 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Опыты проведены на 50 крысах-самцах Вистар (масса тела $237,8 \pm 6,5$ г) согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным Этической комиссией НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина (протокол №1 от 03.09.2005), требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Исследование одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (протокол №2 от 13.02.2024).

В качестве стрессорной нагрузки использована модель хронического непредсказуемого мягкого стресса (Willner P. *et al.*, 1987; Крупина Н.А. и др., 2012) с модификациями, включающая последовательное предъявление крысам разнообразных стрессоров в течение 7 дней: наклон клетки 30° в течение 7 ч.; дневное освещение (в вечернее, ночное и утреннее время) – 17 ч; загрязненная клетка (добавление 0,5 л воды в опилки) – 12 ч.; питьевая депривация (удаление бутылки) – 12 ч.; пустая бутылка – 12 ч.; пищевая депривация (удаление корма) – 12 ч.; тесная клетка (300×150×150 мм, 4 особи) – 12 ч.; удаление опилок – 12 ч.

Крысы были распределены на 9 групп в соответствии с условиями эксперимента: 1. контроль/стресс/интактные; 2. длительность наблюдений – 7, 14, 21 и 28 дней. Последовательность выполнения исследований приведена на Рисунке 1.

Для измерения массы тела крыс использовали ветеринарные весы для взвешивания грызунов (арт.9203.10; Soehnle Professional, Германия).

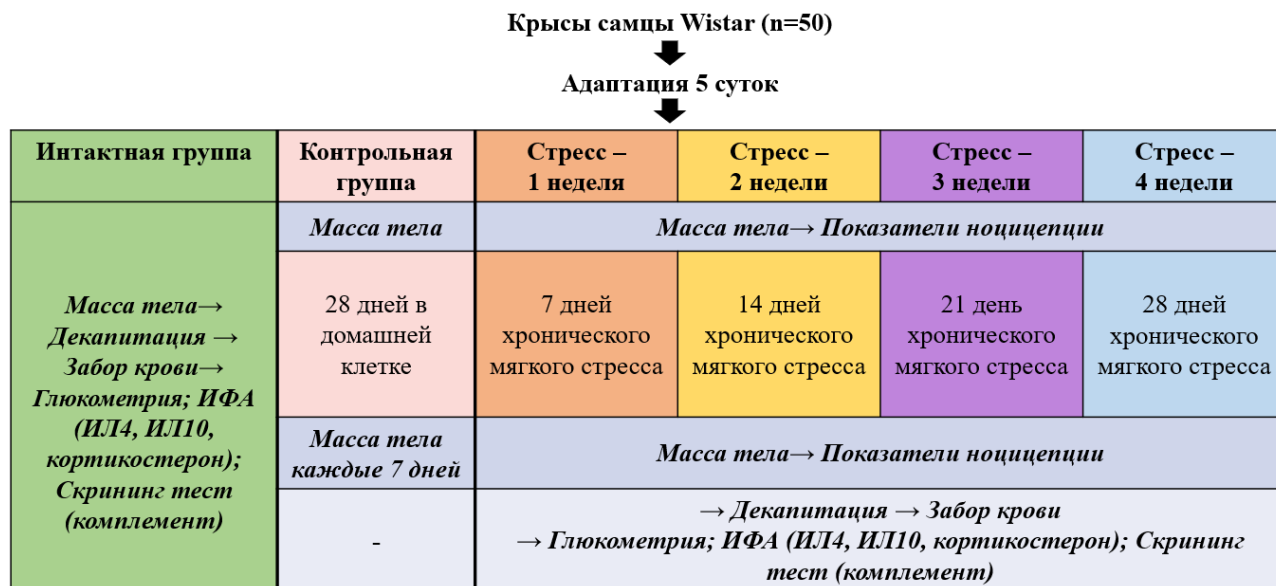


Рисунок 1 - Схема эксперимента

Перцептуальный компонент ноцицепции оценивали по ЛПРОХ (сек) при свето-термальном раздражении хвоста на Tail-Flick Analgesia Meter 0104-301V (США) (D'Amour F.E., Smith D.L., 1941; Le Bars D. *et al.*, 2001). Эмоциональный компонент болевой чувствительности изучали по ПВ (мА) методом электрокожного раздражения хвоста (Абрамов Ю.Б., Козлов А.Ю., 2005).

Крыс декапитировали; часть крови использовали для глюкометрии (ммоль/л) при помощи глюкометра Contour TS (Швейцария). Из другой части получали пробы сыворотки, которые замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. После обработки их использовали для определения концентрации кортикостерона и уровня цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 методом твердофазного ИФА на приборе HTI ImmunoChem-2100 (США), а также функциональной активности системы комплемента с помощью скрининг-теста в реакции комплемент-зависимого лизиса эритроцитов человека (патент № RU 2786208 С1 от 2022 г.) на фотометре для иммуноферментного анализа Multiskan MCC (Финляндия).

Полученные результаты обрабатывали с помощью программ Statistica 12.0

и Microsoft Office Excel 2021. Групповые выборки данных не подчинялись закону нормального распределения (по критерию Шапиро-Уилка), для проведения статистического анализа применялись непараметрические критерии. Для множественного межгруппового сравнения использовали дисперсионный анализ – критерий Фридмана для зависимых переменных, критерий Краскела-Уоллиса для независимых переменных. При наличии статистически значимых различий по этим критериям применяли апостериорный попарный анализ межгрупповых различий показателей с помощью *T*-критерия Вилкоксона и *U*-критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ внутригрупповых связей между параметрами проводили с применением непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Минимальный принятый уровень значимости отличий – 5%. Данные приведены как медиана (Me), верхний и нижний квартили (Q1; Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс в контроле и при хроническом непредсказуемом мягком стрессе разной длительности

Концентрация кортикостерона в крови крыс через 1 неделю стрессорных воздействий была меньше, чем у интактных особей (на 79,7%, $p < 0,0005$; Таблица 1).

Таблица 1 – Концентрация кортикостерона в сыворотке крови у интактных крыс, а также у животных в условиях хронического стресса разной длительности (нг/мл, Me (Q1; Q3))

Экспериментальные группы	Кортикостерон
Интактные особи	1010,0 (853,3; 1693,3)
Стресс – 1 неделя	205,0 (143,3; 320,0) ^{^^^}
Стресс – 2 недели	656,7 (396,6; 840,0) ^{^\$\$}
Стресс – 3 недели	983,3 (458,3; 1433,3) [§]
Стресс – 4 недели	691,6 (516,7; 818,3) ^{\$\$\$}
Примечание – [^] $p < 0,05$ и ^{^^^} $p < 0,0005$ по сравнению с интактными крысами; [§] $p < 0,05$ и ^{\$\$} $p < 0,005$ и ^{\$\$\$} $p < 0,0005$ по сравнению с «Стресс – 1 неделя».	

По-видимому, это свидетельствует об истощении функции коры надпочечников или вторичном, компенсаторном подавлении активности ГГН-комплекса со снижением выработки кортикостерона, опосредованным влиянием стресс-лимитирующих систем (Agorastos A., Chrousos G.P., 2022). Выявленные изменения дополняют научные факты о специфике нейроэндокринных реакций

стресс-систем в зависимости от вида, времени и силы стрессорных нагрузок. Действительно, в экспериментах I.N. Tjurenkov с соавт. (2014) показано, что на 8-е сутки многократного ежедневного предъявления различных стресс-факторов у крыс наблюдается выраженное снижение уровня кортикостерона в крови.

К концу 2-й недели наблюдений уровень кортикостерона в сыворотке крови стрессированных крыс оставался ниже такового у интактных особей (на 35,0%, $p < 0,05$). Однако в этот период анализируемый показатель был больше, чем после 1-й недели повторных стрессорных нагрузок (на 220,3%, $p < 0,005$).

Через 3 и 4 недели хронического мягкого стресса наблюдался рост уровня кортикостерона в крови крыс по сравнению с показателями, отмеченными после 1-й недели (на 379,6% [$p < 0,05$] и 237,4% [$p < 0,0005$] соответственно). В эти сроки данный показатель статистически не отличался от значений у интактных особей. Умеренная сила факторов, применяющихся в этой модели стресса, предполагает «привыкание» ГГН-системы в частности и организма в целом к развивающемуся состоянию, как неспецифической ответной реакции (Selye H., 1946; 1976), с последующим восстановлением физиологических показателей.

Масса тела крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности

Показано, что контрольные крысы характеризуются значимым ростом массы тела через 1, 2, 3 и 4 недели исследования по сравнению с исходным уровнем (на 12,5, 17,3, 32,7 и 24,0% соответственно; $p < 0,05$, Таблица 2).

Таблица 2 – Масса тела крыс разных экспериментальных групп в контроле и после хронического стресса разной длительности (г, Me (Q1; Q3))

Условия опыта	Исходно	По окончании наблюдений
Контроль – 1 неделя	240 (226; 257)	270 (250; 276) #
Контроль – 2 недели		281,5 (279,5; 286) #
Контроль – 3 недели		318,5 (313; 341) #\$\$\$$\Delta$
Контроль – 4 недели		297,5 (283; 306) #*\bullet
Стресс – 1 неделя	272,5 (195; 289)	275 (235; 290)
Стресс – 2 недели	244 (233; 250)	272 (263; 282,5) #
Стресс – 3 недели	233 (215,5; 245)	278,5 (256; 292) ***
Стресс – 4 недели	216 (207; 225,5)	285 (279; 298) #
Примечание – ** $p < 0,005$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с исходным состоянием; \$ $p < 0,05$ и \$\$\$ $p < 0,005$ по сравнению с «Контроль – 1 неделя»; $\Delta p < 0,05$ по сравнению с «Контроль – 2 недели»; * $p < 0,05$ по сравнению с «Контроль – 3 недели».		

Масса тела контрольных животных через 2, 3 и 4 недели наблюдений была больше, чем через 1 неделю (на 4,2% [$p<0,05$], 17,9% [$p<0,005$] и 10,2% [$p<0,05$] соответственно). Аналогичные различия обнаружены между показателями по окончании 3-й и 2-й недель наблюдений (превышение на 13,1%, $p<0,05$).

Продемонстрировано, что масса тела крыс через 1 неделю после начала моделирования хронического непредсказуемого мягкого стресса практически не отличается от исходной. Данный факт может быть обусловлен развитием в этот период стадии стресса, проявляющейся задержкой роста, а также гипертрофией надпочечников, атрофией половых желез, появлением базофилов в гипофизе (Selye H., 1974; 1981). Через 2, 3 и 4 недели воздействий указанный показатель превышал исходные значения на 11,9, 19,5 и 31,9% соответственно ($p<0,05$).

Важно, что при межгрупповом анализе значимые отличия массы тела крыс, подвергнутых стрессорным нагрузкам, в разные точки наблюдений не выявлены.

К окончанию 3-й недели наблюдений масса тела стрессированных крыс была на 12,6% меньше показателя в группе контроля ($p<0,005$). Представленные факты дополняют данные, полученные ранее на модели хронического мягкого стресса (Крупина Н.А. и др., 2012; Hu C. *et al.*, 2017). Подобные изменения массы тела могут косвенно свидетельствовать о снижении пищевой мотивации в этих экспериментальных условиях (Крупина Н.А. и др., 2012; Zhang K. *et al.*, 2021).

Уменьшение массы тела и/или замедление темпа её прироста обнаружена ранее и на других моделях в разные временные периоды хронического стресса (Morakinyo A.O. *et al.*, 2016; Woo H. *et al.*, 2018). Нарушение прироста массы тела при хроническом непредсказуемом мягком стрессе является одним из маркеров развития стрессорного состояния (Hu C. *et al.*, 2017; Strekalova T. *et al.*, 2022).

Концентрация глюкозы в крови крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности

Обнаружено, что уровень глюкозы в крови через 1 неделю хронического стресса практически не отличается от значений у интактных особей (Таблица 3).

К окончанию 2-й недели стрессорных нагрузок анализируемый показатель возрастал и превышал таковой не только на предыдущей стадии наблюдений (на

9,0%, $p<0,05$), но и у интактных животных (на 16,9%, $p<0,05$). Известно, что глюкоза является одним из основных источников энергии у млекопитающих. Развитие иммунного ответа включает усиление пролиферативной и секреторной активности клеток, предполагающей высокое энергопотребление. Иммунные клетки, вовлеченные в адаптивный и врожденный иммунитет, должны обладать способностью быстро реагировать на возмущающие факторы, переходя от спокойного фенотипа к высокоактивному состоянию (Скрипкина Д.В. и др. 2024; Wolowczuk I. *et al.*, 2008). Высказанное предположение находит подтверждение в результатах изучения характеристик иммунитета у крыс, рассмотренных далее.

Таблица 3 – Уровень глюкозы в крови у интактных крыс, а также у животных в условиях хронического стресса разной длительности (ммоль/л; Ме (Q1; Q3))

Экспериментальные группы	Глюкоза
Интактные особи	6,2 (5,2; 6,9)
Стресс – 1 неделя	6,6 (6,2; 6,8)
Стресс – 2 недели	7,2 (6,8; 8,3) ^{^§}
Стресс – 3 недели	6,1 (5,4; 6,8) [▼]
Стресс – 4 недели	6,2 (5,9; 6,6) [▼]
Примечание – [^] $p<0,05$ по сравнению с интактными особями; [§] $p<0,05$ по сравнению с группой «Стресс – 1 неделя»; [▼] $p<0,05$ по сравнению с группой «Стресс – 2 недели».	

В ходе межгруппового анализа выявлено, что концентрация глюкозы у крыс через 3 и 4 недели хронического стресса снижалась, приближаясь к контрольному уровню, и была меньше соответствующего параметра в конце 2-й недели воздействий: на 15,2% и 13,8% соответственно ($p<0,05$).

Концентрация цитокинов в сыворотке крови крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности

Установлено, что хроническая стрессорная нагрузка у крыс приводит к снижению уровня ИЛ-4 в сыворотке крови по сравнению со значениями у интактных особей: через 1 неделю – на 45,5%, через 2 недели – на 47,0% ($p<0,05$), через 3 недели – на 73,8%, через 4 недели – на 72,4% ($p<0,05$; Таблица 4).

Хронический непредсказуемый мягкий стресс у крыс сопровождался выраженным ростом концентрации ИЛ-10 в периферической крови. Повышение уровня ИЛ-10 выявлено уже через 1 неделю (на 95,6%) и впоследствии – через 2

недели наблюдений (на 159,2%, $p < 0,005$). Через 3 и 4 недели воздействий содержание ИЛ-10 несколько снижалось, но оставалось больше такового у интактных особей – на 142,0 и 124,0% соответственно ($p < 0,005$; Таблица 4).

Таблица 4 – Концентрация цитокинов в сыворотке крови у интактных крыс, а также у животных в условиях хронического стресса разной длительности (пг/мл, Me (Q1; Q3))

Экспериментальные группы	Цитокины	
	ИЛ-4	ИЛ-10
Интактные особи	2,18 (2,18; 2,38)	4,03 (2,90; 7,26)
Стресс – 1 неделя	1,19 (0,73; 2,18)	7,89 (5,53; 11,58)
Стресс – 2 недели	1,16 (0,66; 1,65) ^	10,45 (7,99; 10,55) ^^
Стресс – 3 недели	0,57 (0,24; 0,84)	9,76 (9,35; 11,05) ^^
Стресс – 4 недели	0,60 (0,36; 1,14) ^	9,03 (8,39; 10,89) ^^
Примечание – ^ $p < 0,05$ и ^^ $p < 0,005$ по сравнению с интактными особями.		

Таким образом, моделирование хронического непредсказуемого мягкого стресса сопровождается разнонаправленными изменениями уровня изученных цитокинов в сыворотке крови. Необходимо отметить, что продукция ИЛ-10 макрофагами усиливается под влиянием катехоламинов и глюкокортикоидов, активно выделяющихся в состоянии стресса (Elenkov I.J., 2004; Larche M., 2007). Это может вносить вклад в выявленное нами увеличение концентрации ИЛ-10 с 1-й недели повторных стрессорных нагрузок. Полученные данные согласуются с колебаниями содержания ИЛ-10 у крыс при ежедневной 4-ч иммобилизации в течение 8 суток (Перцов С.С. и др., 2022; Kalinichenko L.S. *et al.*, 2014).

Одна из главных функций ИЛ-10 – регуляция цитокиногенеза. ИЛ-10 оказывает модулирующее влияние на порог активации Т-клеток, подавляя синтез цитокинов (Commins S. *et al.*, 2008), что может определять обнаруженное нами снижение уровня ИЛ-4 в крови крыс при хроническом стрессе. Полученные результаты дополняют ранее выявленные факты. Так, например, в условиях длительной 24-ч иммобилизации у пассивных крыс также выявлено снижение концентрации ИЛ-4 в сыворотке крови (Перцов С.С. и др., 2018).

Функциональная активность системы комплемента крови крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности

Установлено, что функциональная активность системы комплемента крови

у крыс через 1 неделю моделирования хронического непредсказуемого мягкого стресса возрастает незначительно по сравнению с таковым у интактных особей (на 16,6%, $p>0,05$; Таблица 5).

Таблица 5 – Функциональная активность системы комплемента в сыворотке крови у интактных крыс, а также у животных в условиях хронического стресса разной длительности (% лизиса эритроцитов; Me (Q1; Q3))

Экспериментальные группы	% лизиса эритроцитов
Интактные особи	75,0 (56,0; 78,0)
Стресс – 1 неделя	87,5 (75,0; 92,0)
Стресс – 2 недели	88,0 (86,0; 92,0)[^]
Стресс – 3 недели	85,0 (71,5; 92,0)
Стресс – 4 недели	77,0 (69,0; 81,5)[▼]
Примечание – [^] $p<0,05$ по сравнению с интактными особями; [▼] $p<0,05$ по сравнению с группой «Стресс – 2 недели».	

К концу 2-й недели стрессорных воздействий анализируемый параметр превышал контрольный уровень на 17,3% ($p<0,05$). Однако, через 3 и 4 недели многократных стрессорных нагрузок этот показатель постепенно снижался, приближаясь к значениям у интактных животных. Таким образом, нами впервые показано повышение функциональной активности системы комплемента у крыс при длительном воздействии чередующихся стрессоров. Выявленные изменения обусловлены синдромом функциональной готовности и вносят вклад в последующую реализацию специфического иммунного ответа в соответствующих условиях (Алексеева Н.С., 2009).

В дополнение нужно указать, что синтез С3-компонента в разных тканях у млекопитающих усиливается под действием ИЛ-1 β (Xu J. *et al.*, 2023). В свою очередь, ИЛ-10 подавляет процессинг ИЛ-1 β (Reddaway J., Brydges N.M., 2020; Ipseiz N. *et al.*, 2020). Данные процессы могут лежать в основе обнаруженного нами снижения функциональной активности системы комплемента в крови крыс на фоне высокого уровня ИЛ-10 через 3 и 4 недели стрессорных воздействий.

Существенно, что система комплемента играет роль в механизмах тонкой регуляции обмена глюкозы. Известно, что усиление функциональной активности комплемента может способствовать апоптозу α -клеток поджелудочной железы.

Кроме того, анафилатоксины – продукты расщепления компонентов комплемента – способствуют привлечению лейкоцитов в жировую ткань, развитию воспаления и формированию резистентности этой ткани к инсулину (Phielor J. *et al.*, 2013). Таким образом, обнаруженный нами рост функциональной активности системы комплемента может вносить вклад в описанное выше увеличение содержания глюкозы у крыс через 2 недели хронического непредсказуемого мягкого стресса.

Ноцицептивная чувствительность у крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности

Показано, что через 1 неделю хронического мягкого стресса у крыс наблюдается значимое снижение ПВ в ответ на электрокожное раздражение хвоста по сравнению с исходными значениями (на 25,0%, $p < 0,05$; Таблица 6).

Таблица 6 – Значения показателя эмоционального компонента ноцицепции крыс (ПВ, мА) в исходном состоянии и в разные временные периоды хронического непредсказуемого мягкого стресса (Me (Q1; Q3))

Экспериментальные группы	Исходно	После воздействий
Стресс – 1 неделя	0,8 (0,6; 0,8)	0,6 (0,4; 0,6) #
Стресс – 2 недели	0,6 (0,6; 0,8)	0,6 (0,5; 0,6)
Стресс – 3 недели	0,75 (0,625; 0,85)	0,6 (0,5; 0,8)
Стресс – 4 недели	0,8 (0,6; 1,0)	0,6 (0,4; 0,8)
Примечание – # $p < 0,05$ по сравнению с исходными значениями.		

Можно предположить, что в ранний период моделирования условий переменной стрессогенности у крыс происходит рост эмоциональной лабильности, проявляющейся в усилении реакций на внешние стимулы, в том числе, болевые.

Выявлено, что хроническая стрессорная нагрузка разной длительности не приводит к достоверным изменениям показателя перцептуального компонента ноцицепции у крыс (Таблица 7). Полученные данные подтверждают описанные ранее механизмы восприятия болевого раздражителя. В частности, известно, что степень перцепции ноцицептивного стимула является достаточно стабильным показателем, изменения которого наблюдаются только при воздействии сильных раздражителей (Абрамова А.Ю., Перцов С.С., 2019).

Таблица 7 – Значения показателя перцептуального компонента ноцицепции крыс (ЛПРОХ, сек) в исходном состоянии и в разные временные периоды хронического непредсказуемого мягкого стресса (Me (Q1; Q3))

Экспериментальные группы	Исходно	После воздействий
Стресс – 1 неделя	2,81 (2,63; 2,91)	3,05 (2,9; 3,38)
Стресс – 2 недели	3,26 (2,67; 3,53)	3,13 (2,9; 3,21)
Стресс – 3 недели	3,27 (3,01; 3,44)	2,95 (2,61; 3,33)
Стресс – 4 недели	3,56 (2,9; 3,72)	3,4 (3,13; 3,43)

В дополнение нужно подчеркнуть, что при хроническом непредсказуемом мягком стрессе у крыс нами выявлено повышение уровня ИЛ-10 в крови. В научной литературе имеются доказательства антиноцицептивных свойств этого цитокина (Абрамович С.Г., 2021; Wu Н.У. *et al.*, 2018; Belo Т.С.А. *et al.*, 2023). Возможно, наблюдающиеся изменения содержания ИЛ-10 также вносят вклад в относительное постоянство перцепции болевых раздражителей в этих условиях.

Корреляционный анализ показателей ноцицепции, массы тела, уровня глюкозы в крови, функциональной активности системы комплемента, концентрации цитокинов и кортикостерона в крови у крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности

В настоящем разделе изложены результаты корреляционного анализа внутригрупповых связей между изученными физиологическими показателями у крыс разных экспериментальных групп (Рисунок 2).

У интактных крыс выявлена одна прямая взаимосвязь между массой тела и функциональной активностью системы комплемента крови ($r=0,74$, $p<0,05$).

Животные, подвергнутые стрессорным воздействиям в течение 1 недели, характеризовались следующими взаимосвязями: обратной – между ПВ в исходном состоянии и концентрацией кортикостерона в сыворотке крови ($r=-0,84$, $p<0,05$); прямыми – между исходным ЛПРОХ и процентом комплемент-зависимого лизиса эритроцитов ($r=0,78$, $p<0,05$), а также между массой тела в начале и по окончании наблюдений ($r=0,98$, $p<0,05$). Таким образом, животные с изначально большей эмоциональной окраской ноцицептивных раздражителей демонстрируют более высокое содержание кортикостерона при эмоциональных нагрузках. Этот временной период многократных стрессорных воздействий

соответствует наиболее значимым изменениям уровня кортикостерона крови с сопутствующим усилением эмоционального компонента ноцицепции. Данный компонент отражает психоэмоциональный ответ на повреждение, который формируется при возбуждении отрицательных эмоциогенных зон мозга и изменении вегетативных, гормональных и обменных процессов (Перцов С.С. и др., 2020). На этой же стадии наблюдений, характеризующейся тенденцией к повышению функциональной активности комплемента в крови крыс, выявлена прямая связь между данным параметром и исходным уровнем перцепции ноцицептивных раздражений (ЛПРОХ). Следовательно, особи с изначально меньшей болевой чувствительностью демонстрируют большую реактивность системы комплемента крови после многократных стрессорных нагрузок.

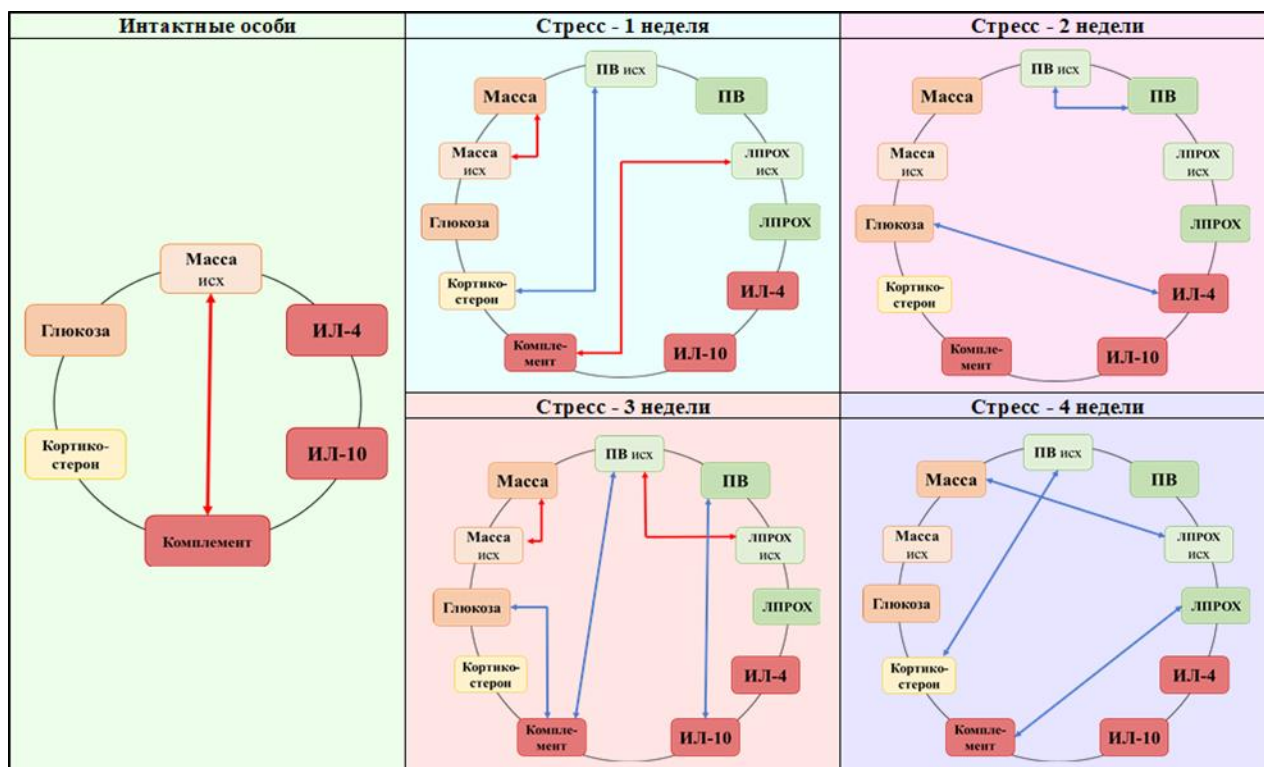


Рисунок 2 – Корреляционные связи массы тела (Масса исх, Масса), ноцицептивных порогов (ПВ исх, ПВ; ЛПРОХ исх, ЛПРОХ), концентрации цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10), глюкозы и кортикостерона, функциональной активности системы комплемента (Комплемент) в крови у интактных крыс, а также в условиях хронического стресса разной длительности. Красные стрелки – положительные, синие стрелки – отрицательные корреляции ($p < 0,05$).

После моделирования хронического стресса на протяжении 2-х недель у крыс выявлены отрицательные корреляции между изученными параметрами: ПВ в исходном состоянии и после эмоциогенных нагрузок ($r = -0,84, p < 0,05$), уровнем

глюкозы и ИЛ-4 в крови ($r=-0,78, p<0,05$). Возможным объяснением этого факта служат данные о том, что ИЛ-4 участвует в регуляции чувствительности клеток к инсулину, увеличивая поглощение ими глюкозы (Chen Z. *et al.*, 2020).

Через 3 недели чередующихся стрессорных воздействий у животных наблюдались прямые корреляционные связи между параметрами ноцицепции в исходном состоянии – ПВ и ЛПРОХ ($r=0,72, p<0,05$), а также между показателями массы тела в начале и по завершении исследований ($r=0,99, p<0,05$). В указанный период функциональная активность системы комплемента коррелировала отрицательно с уровнем глюкозы в крови ($r=-0,77, p<0,05$) и исходным ПВ ($r=-0,73, p<0,05$). Обратная связь между показателем функциональной активности системы комплемента и интенсивностью обмена углеводов может быть связана со следующим фактом. Установлено, что даже при базальном уровне комплемента продукт его деградации – белок, стимулирующий ацилирование (ASP) – оказывает стимулирующее влияние на глюкозозависимую секрецию инсулина островками Лангерганса (Ahrén B. *et al.*, 2003; Phielor J. *et al.*, 2013), что способствует снижению уровня глюкозы в крови. У особей этой группы обнаружена обратная взаимосвязь между концентрацией ИЛ-10 и ПВ в конце наблюдений ($r=-0,75, p<0,05$). Причины обнаруженных закономерностей требуют проведения дальнейших исследований в этой области.

Моделирование хронического стресса у животных в течение 4-х недель сопровождалось появлением отрицательных корреляций между следующими анализируемыми параметрами: исходным показателем ПВ и концентрацией кортикостерона в крови ($r=-0,93, p<0,05$), ЛПРОХ в исходном состоянии и массой тела по завершении наблюдений ($r=-0,98, p<0,05$), ЛПРОХ в конце исследования и функциональной активностью системы комплемента ($r=-0,93, p<0,05$). Следовательно, крысы с более низкой выраженностью эмоциональной окраски и восприятия болевых воздействий демонстрируют меньшую интенсивность эндокринных и иммунных реакций при хроническом непредсказуемом мягком стрессе на протяжении 4-х недель. Результаты недавних исследований показывают наличие рецепторов к одним и тем же

лигандам на структурных элементах, входящих в состав стресс-лимитирующих (Axtamovna H.N., 2023; Schaffer J. *et al.*, 2023) и антиноцицептивных систем (Dow-Edwards D., 2020; Noursadeghi E., Haghparast A., 2023). Кроме того, выявлены двусторонние связи областей головного мозга, регулирующих активность стресс-систем организма, с иммунокомпетентными образованиями (Морозов Б.Б., 2001; Reddaway J., Brydges N.M., 2020). Реализация описанных взаимодействий наиболее выражено проявляется при экстремальных внешних воздействиях, в частности, в условиях длительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования указывают на то, что хронический непредсказуемый мягкий стресс в течение 1, 2, 3 и 4 недель у крыс оказывает модулирующее влияние на функциональную активность эндокринной и иммунной систем, метаболические параметры и болевую чувствительность. Характер изменений изученных физиологических показателей различается в зависимости от продолжительности стрессорных воздействий. Отсутствие прироста массы тела, увеличение уровня глюкозы, снижение концентрации кортикостерона в крови и повышение функциональной активности системы комплемента наблюдаются в относительно ранние периоды многократных чередующихся стрессорных нагрузок (1-2 недели). В указанных экспериментальных условиях обнаружено усиление эмоционального компонента ноцицепции, а также разнонаправленные колебания показателей цитокинового профиля крови у животных. Поздние сроки наблюдений – 3-я – 4-я недели – характеризуются реализацией тесного межсистемного взаимодействия и адаптивных процессов в условиях повторяющихся воздействий различных стрессогенных факторов.

Полученные данные расширяют представления о системной организации физиологических функций млекопитающих в условиях хронического стресса. Обнаруженные факты вносят вклад в понимание особенностей и динамики адаптационно-компенсаторных процессов, протекающих на определенных временных стадиях длительного воздействия разных стрессорных факторов.

ВЫВОДЫ

1. Концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс снижается через 1 и 2 недели моделирования хронического непредсказуемого мягкого стресса, но впоследствии увеличивается и к окончанию 3-й – 4-й недель повторяющихся стрессорных воздействий практически не отличается от значений у интактных животных.

2. Крысы, подвергнутые многократным стрессорным нагрузкам в течение 1 недели, характеризуются отсутствием наблюдающегося в контроле увеличения массы тела по сравнению с исходным значением. В последующие периоды стрессорных воздействий – 2-я – 4-я неделя – темп роста этих животных ниже, чем у контрольных особей.

3. Моделирование хронического непредсказуемого мягкого стресса у крыс приводит к повышению уровня глюкозы к окончанию 2-й недели воздействий. Через 3 и 4 недели стрессорных нагрузок концентрация глюкозы в крови животных уменьшается по сравнению со значением в предыдущий период и практически не отличается от таковой у интактных особей.

4. Хронический непредсказуемый мягкий стресс у крыс приводит к разнонаправленным изменениям показателей цитокинового профиля крови по сравнению со значениями у интактных особей. В этих условиях наблюдается снижение уровня ИЛ-4 к окончанию 2-й и 4-й недель наблюдений, но рост содержания ИЛ-10 в сыворотке крови через 2, 3 и 4 недели воздействий.

5. Функциональная активность системы комплемента крови у крыс возрастает через 2 недели ежедневных чередующихся стрессорных нагрузок, но затем снижается и к окончанию 3-й – 4-й недель наблюдений практически не отличается от показателя у интактных животных.

6. Ежедневные чередующиеся стрессорные воздействия у животных приводят к значимому усилению эмоционального компонента ноцицептивной чувствительности через 1 неделю, но не по окончании 2-й, 3-й и 4-й недель наблюдений. Перцептуальный компонент ноцицепции не изменяется в данных условиях хронического стресса у крыс по сравнению с исходным показателем.

7. Моделирование хронического непредсказуемого мягкого стресса сопровождается появлением отсутствующих в норме корреляционных связей между ноцицептивными порогами и показателями эндокринных, иммунных и обменных процессов, характер и направленность которых зависят от продолжительности воздействия. Животные, подвергнутые стрессорным нагрузкам, характеризуются преимущественно отрицательными корреляциями между анализируемыми физиологическими параметрами. Наибольшее число взаимосвязей выявлено к окончанию 3-й недели стрессорных воздействий.

8. Изменения эндокринных, метаболических и иммунологических параметров, показателей болевой чувствительности у крыс иллюстрируют дисрегуляцию физиологических функций в относительно ранние периоды хронического непредсказуемого мягкого стресса с последующей реализацией адаптивных процессов и тесного межсистемного взаимодействия на поздних сроках многократных стрессорных воздействий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК при Минобрнауки России

1. **Скрипкина Д.В.** Ноцицептивная чувствительность и масса тела у крыс в условиях хронического непредсказуемого стресса / Скрипкина Д.В., Абрамова А.Ю., Никенина Е.В., Перцов С.С. // Российский журнал боли. – 2024. – Т.22, № 2. – С.5-10.
2. **Скрипкина Д.В.** Уровень цитокинов и С3–комплемента в крови крыс в условиях хронического непредсказуемого стресса разной длительности / Скрипкина Д.В., Абрамова А.Ю., Шойбонов Б.Б., Алексеева И.В., Никенина Е.В., Перцов С.С. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т.177, № 3. – С.280-284.
3. **Скрипкина Д.В.** Иммунные показатели в крови крыс в условиях хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности / Скрипкина Д.В., Абрамова А.Ю., Шойбонов Б.Б., Алексеева И.В., Никенина Е.В., Перцов С.С. // Патогенез. – 2024. – Т.22, № 2. – С.89-92.

Иные публикации

1. **Скрипкина Д.В.** Уровень кортикостерона и глюкозы в крови крыс в условиях хронического непредсказуемого стресса разной длительности / Скрипкина Д.В., Абрамова А.Ю., Шойбонов Б.Б., Алексеева И.В., Никенина Е.В., Перцов С.С. // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова – 2024. – Т.32., №4. – С.273-280.

2. **Скрипкина Д.В.** Особенности ноцицептивной чувствительности у крыс после хронического непредсказуемого мягкого стресса разной длительности / Скрипкина Д.В., Абрамова А.Ю., Никенина Е.В., Перцов С.С. // *Нейронаука для медицины и психологии: Материалы XIX Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, 30 мая 2023 года. – Москва: ООО "МАКС Пресс". – 2023. – С.261-262.
3. **Скрипкина Д.В.** Кортикостерон и глюкоза крови, как показатели стресс-ответа, при многократных стрессогенных воздействиях у крыс / Скрипкина Д.В. // *Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье : Материалы XXVII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей*, Санкт-Петербург, 20 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: ООО Издательский дом "Сциентиа". – 2024. – С.773-774.
4. **Скрипкина Д.В.** Особенности физиологических реакций при хроническом непредсказуемом стрессе: экспериментальное исследование / Скрипкина Д.В., Перцов С.С. // *XXII Конференция молодых учёных, специалистов и студентов, посвященной 300-летию Российской академии наук*, Москва, 10 октября 2024 года. – Москва: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», ГНЦ РФ — ИМБП РАН. – 2024. – С.28-29.
5. **Скрипкина Д.В.** Влияние многократного воздействия различных стрессогенных факторов на физиологические показатели у крыс / Скрипкина Д.В., Абрамова А.Ю., Перцов С.С. // *Системный подход в медицине и образовании, посвящённой Научной школе выдающегося физиолога академика П.К.Анохина: Материалы конференции с международным участием «Системный подход в медицине и образовании», посвящённой Научной школе выдающегося физиолога академика П.К.Анохина*, Москва, 1 ноября 2024 года. – Москва: РУМ. – 2024. – С.182-183.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренкортикотропный гормон
 ГГН-* – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковый
 ИЛ-*(цифровой или буквенный символ) – интерлейкин-(цифровой или буквенный символ)
 ЛПРОХ – латентный период реакции отведения хвоста
 мА – миллиампер
 ПВ – порог вокализации
 сек – секунды
 сут – сутки
 ЦНС – центральная нервная система
 ч – часы