

УДК 57.043

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ АДАПТАЦИЮ, И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ У КРЫС ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ В «ОТКРЫТОМ ПОЛЕ»

Иванов Д.Г.*, Подковкин В.Г.**

Институт экспериментальной медицины и биотехнологии, Самара**Самарский государственный университет, Самара*

Исследовались биохимические показатели гормонально-медиаторного обмена, содержания гликогена и перекисного окисления липидов в печени у крыс, находящихся в течение часа в «Открытом поле». Показано, что первые биохимические изменения анализируемых показателей наблюдаются уже через 3 минуты пребывания животного в экспериментальной камере. Экспериментальное воздействие изменяло активность гистамин-, серотонин- и норадренэргических систем головного мозга, активировало ГГНС и САС, приводило к развитию стрессовой реакции. Пребывание животных в «Открытом поле» снижало уровень гликогена и активизировало процессы ПОЛ в печени.

Ключевые слова: «Открытое поле», крыса, биохимические показатели

Введение

Тест «Открытое поле» был впервые предложен К. Холлом в 30-е годы прошлого столетия [1] для изучения роли новизны в возникновении тревоги. Этот тест позволяет исследовать ориентировочную реакцию и эмоциональную реактивность грызунов в новых условиях среды, а так же дает возможность прогнозировать реакцию животных на действие различных стрессоров [2,3]. На основании этого «Открытое поле» используют для разделения грызунов на группы в зависимости от индивидуально-типологических характеристик. Показано, что исследуемые показатели коррелируют с результатами других поведенческих тестов [4].

Вместе с этим, в современных работах, посвященных изучению психотропного эффекта различных по своей природе факторов [5,6], тест «Открытое поле» используют в качестве модели тревоги. При этом особо подчеркивают стрессогенное воздействие условий тестирования [7]. В связи с тем, что воспроизводимость результатов исследований, посвященных изучению стресса, зависит от напряжения систем, обеспечивающих адаптацию у животных, вводимых в эксперимент, возникает необходимость исследовать реакцию

гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС) и симпато-адреналовой систем (САС) на помещение животных в камеру «Открытого поля».

Целью данной работы было проанализировать динамику показателей гормонально-медиаторного обмена, содержания гликогена и перекисного окисления липидов в печени у крыс, находящихся в течение часа в камере, предназначенной для проведения теста «Открытое поле».

Материалы и методы

Работа выполнена на 60 белых беспородных крысах обоего пола массой 115-150 г. Все экспериментальные процедуры проводились согласно международным правилам по содержанию и работе с лабораторными животными [8]. Экспериментальное воздействие заключалось в помещении крыс в «Открытое поле» на 3, 30 и 60 минут. Крысы, не подвергающиеся экспериментальному воздействию, служили контролем. Таким образом, все животные были поделены на четыре группы, рандомизированные методом парных аналогов по массе и полу.

«Открытое поле» представляло собой камеру 1 м в длину и 1 м в ширину, с высотой стенок 0,5 м, из белого пластика, дно которой было расчерчено на 25 равных

квадратов. Освещение производилось лампой мощностью 100 Вт, подвешенной на высоте 1,5 м от дна камеры. Перед проведением теста животных держали в течение 3 минут в затемненном картонном пенале размером 300 x 150 x 100 мм с отверстиями для доступа воздуха.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации не позднее чем через 1 минуту после истечения сроков воздействия. Плазму на анализ брали с 5% раствором ЭДТА. Головной мозг извлекали, отделяли от спинного мозга на уровне выхода первой пары шейных нервов и гомогенизировали с 10% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Надпочечники взвешивали, относительную массу желез выражали в процентах от массы тела крысы. Готовили гомогенаты левого надпочечника в 30% спирте и правого надпочечника в 10% раствора ТХУ. Для определения концентрации 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) печень гомогенизировали в 30% растворе спирта. Для анализа продуктов перекисного окисления готовили гомогенаты печени в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,6.

Содержание гистамина и серотонина в мозге определяли по методу [9], адреналина, и норадреналина по [10]. Результаты анализа пересчитывали на массу мозга. Уровень 11-ОКС в левом надпочечнике, плазме крови и печени определяли по методу [11]. Содержание адреналина в гомогенатах правых надпочечников определяли

по методу [10]. Уровень аскорбиновой кислоты и ее дериватов определяли в гомогенатах правого надпочечника по методу [12] и пересчитывали на массу железа. Содержание малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов в гомогенатах печени определяли по методу [13] и [14], соответственно.

Для проверки однородности дисперсий в группах применяли критерии Ливена. Результаты исследований представляли в виде среднего плюс/минус стандартная ошибка среднего. Различия средних значений в группах сравнивали с помощью стандартного t-критерия Стьюдента, с учетом поправки Бонферрони [15]. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Проведенные исследования выявили изменения в функционировании медиаторных систем мозга у крыс, находящихся в камере теста «Открытое поле». При помещении животных в экспериментальную камеру у них обнаружилось повышение содержания серотонина, снижение уровня гистамина и норадреналина в мозге (табл.1). Изменения концентрации адреналина не наблюдалось.

Наряду с биохимическими сдвигами в медиаторных системах мозга крыс, пребывание животных в «Открытом поле» приводило к изменению показателей, характеризующих функциональную активность надпочечников.

Таблица 1.

Изменение уровня моноаминов в мозге крыс в «Открытом поле»

Показатель	Время нахождения в экспериментальной камере, мин			
	0	3	30	60
Уровень гистамина в мозге, мкг/мг	4,75±0,37	4,58±0,35	4,11±0,40	2,92±0,29 ^{a,b}
Уровень серотонина в мозге, мкг/мг	1,27±0,13	1,29±0,14	2,17±0,16 ^{a,b}	2,05±0,23 ^{a,b}
Уровень адреналина в мозге, мкмоль/мг	0,37±0,02	0,34±0,03	0,38±0,03	0,41±0,03
Уровень норадреналина в мозге, мкмоль/мг	1,18±0,06	0,89±0,05 ^a	0,82±0,06 ^a	0,91±0,06 ^a

a-отличие от группы крыс, не пребывавших в «Открытом поле», статистически значимо ($p < 0,05$)

b- отличие от группы крыс, пребывавших 3 минуты в «Открытом поле», статистически значимо ($p < 0,05$)

Через 3 минуты нахождения животного в камере у них повышался уровень 11-ОКС в крови и печени, что свидетельствовало об активизации ГГНС, хотя увели-

чения массы надпочечников и изменения содержания глюкокортикоидов в них не происходило (табл. 2).

Таблица 2.

Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и уровень адреналина в надпочечниках крыс в «Открытом поле»

Показатель	Время нахождения в экспериментальной камере, мин			
	0	3	30	60
Относительная масса НП, %	0,019 ±0,002	0,023 ±0,001	0,022 ±0,002	0,020 ±0,002
11-ОКС в надпочечниках, мкг/мг	0,26 ±0,03	0,29 ±0,04	0,33 ±0,05	0,35 ±0,05
11-ОКС в плазме, мкг/мл	0,018 ±0,002	0,039 ±0,004 ^a	0,028 ±0,002 ^b	0,026 ±0,003 ^b
11-ОКС в печени, мкг/мг	0,016 ±0,002	0,028 ±0,004 ^a	0,024 ±0,003	0,020 ±0,002
Аскорбиновая кислота в надпочечниках, мкг/г	106,91 ±9,90	63,56 ±3,73 ^a	104,10 ±17,41	96,88 ±10,07
Дериваты аскорбиновой кислоты в надпочечниках, мг/г	1,92 ±0,13	1,93 ±0,14	1,81 ±0,18	2,17 ±0,16
Адреналина в надпочечниках, мкмоль/г	2,27 ±0,23	1,46 ±0,15 ^a	1,58 ±0,21	1,51 ±0,11 ^a

a-отличие от группы крыс, не пребывавших в «Открытом поле», статистически значимо (p<0,05)

b- отличие от группы крыс, пребывавших 3 минуты в «Открытом поле», статистически значимо (p<0,05)

Выброс глюкокортикоидов в кровь сопровождался снижением уровня аскорбиновой кислоты в надпочечниках. При этом уровень метаболитов аскорбиновой кислоты: дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот в железах крыс не изменялся. Кроме того, на помещение в «Открытое поле» крысы реагировали снижением уровня адреналина в надпочечниках. Аналогичное снижение наблюдалось и через час пребывания крыс в экспериментальной камере.

Изменение в печени уровня МДА при тестировании крыс в «Открытом поле» происходило волнообразно. В течение первых трех минут нахождения животного в камере наблюдалось увеличение уровня МДА, через 30 минут величина исследуемого показателя возвращалась к норме, а через 60 минут снова возрастала (табл.3). Кроме того, 30 минутное пребывание крысы в «Открытом поле» приводило к возрастанию уровня диеновых кетонов и диеновых конъюгатов, субстратом которых был холестерол и триацилглицерол (ТАГ).

Изменения уровня диеновых кетонов и конъюгатов, субстратом которых были фосфолипиды, в печени крыс, находящихся в «Открытом поле» не происходило. Помещение крыс в камеру на 60 минут приводило к снижению гликогена печени.

Обсуждение

Тест «Открытое поле» используется для изучения ориентировочно-исследовательского поведения и эмоциональной реактивности грызунов при попадании в новые условия окружающей среды. Помещение животного в камеру «Открытого поля» запускает паттерны исследовательского поведения, реализации которых препятствуют условия, вызывающие страх [16]. Поэтому «Открытое поле» применяют в качестве экспериментальной модели тревоги при лабораторных исследованиях [7].

Можно считать, что реакция животных на помещение в камеру «Открытого поля» обусловлена исключительно эмоциональным фактором, так как в экспериментальных условиях исключены факторы, приводящие к развитию системного стресса. Биохимические сдвиги в функционировании медиаторных систем мозга, обнаруживающиеся при помещении крыс в «Открытое поле», вероятно, обусловлены активацией и торможением структур, связанных с реакцией на стрессовые условия среды. Такими образованиями в мозге являются ретикулярная формация, голубое пятно и лимбическая система [17]. Возможно, состояние стресса, испытываемое

животным в условиях «Открытого поля», усиливает афферентацию от миндалины и передней части коры больших полушарий к гипоталамусу, приводя к выбросу глюкокортикоидов в кровь посредством повы-

шения активности ГГНС в целом. Усиленная секреция коры надпочечников сопровождается синтезом глюкокортикоидов, о чем свидетельствует снижение уровня аскорбиновой кислоты в этих железах.

Таблица 3.

Изменение показателей перекисного окисления липидов и содержания гликогена в печени крыс в «Открытом поле»

Показатель	Время нахождения в экспериментальной камере, мин			
	0	3	30	60
Малоновый диальдегид, нмоль/г	28,43 ±1,54	35,95 ±1,38 ^a	27,98 ±1,65 ^b	37,29 ±2,75 ^{a,c}
Диеновые кетоны субстрат холестерин и ТАГ в печени, нмоль/г	0,0101 ±0,0007	0,0104 ±0,0007	0,0141 ±0,0007 ^{a,b}	0,0092 ±0,0009 ^c
Диеновых кетоны субстрат фосфолипиды в печени, нмоль/г	0,158 ±0,006	0,156 ±0,006	0,161 ±0,006	0,147 ±0,005
Диеновые конъюгаты субстрат холестерин и ТАГ в печени, нмоль/г	0,059 ±0,002	0,063 ±0,002	0,072 ±0,004 ^a	0,065 ±0,003
Диеновые конъюгаты субстрат фосфолипиды в печени, нмоль/г	0,180 ±0,005	0,177 ±0,004	0,183 ±0,005	0,176 ±0,004
Гликоген в печени, мг/г	40,50 ±5,61	33,46 ±2,71	34,75 ±2,09	22,70 ±1,99 ^{a,b,c}

a - отличие от группы крыс, не пребывавших в «Открытом поле», статистически значимо ($p < 0,05$)

b - отличие от группы крыс, пребывавших 3 минуты в «Открытом поле», статистически значимо ($p < 0,05$)

c - отличие от группы крыс, пребывавших 30 минут в «Открытом поле», статистически значимо ($p < 0,05$)

Кроме того, в реакцию крыс на помещение в «Открытое поле» включается САС, что сопровождалось выбросом адреналина в кровь и снижением его уровня в мозговом веществе надпочечников. Вместе с этим адреналин вызывает мобилизацию гликогена, снижая его содержание в печени через 60 минут пребывания крыс в камере.

Активизация процессов перекисного окисления липидов при стрессе происходит в ранние сроки действия стрессора (фазу тревоги) за счет нарушения редокс-равновесия и охватывает весь организм [18]. В нашей работе динамика изменения уровня продуктов ПОЛ в печени характеризовалась периодическими спадами и подъемами. Так уровень МДА в печени возрастал через 3 и 60 минут пребывания крысы в «Открытом поле», а при 30 минутном воздействии не отличался от контроля. Снижение содержания МДА до уровня контроля сопровождалось повышением концентрации диеновых кетонов и

конъюгатов, субстратом которых был холестерин и ТАГ. При этом через час, после помещения животных в экспериментальную камеру, наблюдалось снижение содержания данных показателей и повышение уровня МДА в печени. Такая сложная динамика изменения продуктов ПОЛ, вероятно, обусловлена особенностью протекания процессов свободно-радикального окисления, а не активацией антиоксидантной системы. Так как в последнем случае наблюдалось бы снижение уровня всех продуктов ПОЛ. Содержание диеновых конъюгатов и кетонов, субстратом которых были фосфолипиды, при помещении крыс в «Открытое поле», остается постоянным.

Заключение

Реакция организма крыс на помещение в «Открытое поле» обнаруживалась уже через 3 минуты пребывания в камере. Экспериментальное воздействие изменяло активность гистамин-, серотонин- и норадренергических систем головного мозга, активировало ГГНС и САС, оказывая

стрессирующий эффект. Пребывание животных в «Открытом поле» снижало уровень гликогена и активизировало процессы ПОЛ в печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Hall C.S. // J.Comp. Psychol, 1934. V.22. P.345-352.
2. Коплик Е.В., Салива Р.М., Горбунова А.В. // Журнал высшей нервной деятельности, 1995. Т.45. №4. С. 775-781.
3. Подковкин В.Г. Иванов Д.Г. // Успехи современного естествознания, 2008. №11. С. 5-17.
4. Мельников А.В., Куликов М.А., Навикова М.Р., Шарова Е.В. // Журнал Высшей нервной деятельности им. Павлова, 2004. №5. С. 712-717.
5. Спасов А.А., Иежица И.Н., Харитоновна М.В., Кравченко М.С. // Журнал Высшей нервной деятельности им. Павлова, 2008. №4. С. 476-485.
6. Дыгало Н.Н., Шишкина Г.Т. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 1999. №1. С.105-109.
7. Калувев А.В. // Нейронауки, 2006. №1. С.34-56.
8. European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC
9. Подковкин В.Г. Определение концентрации гистамина и серотонина в биологическом материале с помощью флуоресцентного анализа / Деп. в ВИНТИ 12.07.1995 №2136-В 95 -7с.
10. Подковкин В.Г. Микрометод определения катехоламинов в крови и тканях мелких лабораторных животных / Деп. в ВИНТИ 4.7.1988 №5349-В 88 - 4с.
11. Подковкин В.Г. Микромодификация метода определения 11-оксикортикостероидов / Деп. в ВИНТИ 4.7.1988 №5348-В 88 - 4с.
12. Соколовский В.В., Лебедева Л.В., Лизлуп Т.Б // Лабораторное дело, 1974. №3. С.160 -162.
13. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы биохимии. М.: Медицина, 1977. С.66-68.
14. Костюк В.А. // Украинский биохимический журнал, 1991. №1. С.98-101.
15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459с.
16. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Наука, 1992. – 250 с.
17. Симонов П.В. // Журнал высшей нервной деятельности, 1993. №3. С. 514-529.
18. Барабой В.А. Биоантиоксиданты. Киев: Книга плюс, 2006. – 461с.

THE STATE OF ADAPTATIVE SYSTEMS AND LIPIDS PEROXIDATION IN RAT LIVER UNDER TESTING IN “OPEN FIELD”

Ivanov D.G.[#], Podkovkin V.G.*

[#] *Experimental Medicine and Biotechnologies Institute, Samara*

**Samara State University, Samara*

The biochemical markers of hormonal-transmitter metabolism, glycogen level and lipids peroxidation in liver of rates containing in “Open field” during one hour were investigated. It was showed, that biochemical markers level change in 3 minutes after placing animal in experimental cell. Under test influences activity of brain histamine, serotonin and noradrenaline path ways was varied. The being of rats into “Open field” was activated hypothalamo-pituitary-adrenal axis and sympathoadrenal system, induced stress reaction, decreased glycogen level and increased lipids peroxidation in liver.

Key words: “Open field”, rat, biochemical markers