

КОРТИКОСТЕРОН И ЕГО РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПУЛА КРОВИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОРОВ

Ф. М. Кинзерский, М. А. Дерхо, Т. И. Серeda

Дана оценка реакции организма грызунов на стресс, сопровождающийся выбросом в кровь кортико-стерона и изменением лейкоцитарного состава крови, при действии иммобилизационного и вибрационного стрессора. Установлено, что 2-часовое воздействие стресс-факторов сопровождается активацией в организме лабораторных крыс компонентов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, определяя увеличение концентрации кортикостерона в крови. Уровень гормона в модели иммобилизационного стресса максимально возрастает через 1 час после прекращения действия стрессора (в 2,15 раза, $p = 0,99$); в модели вибрационного стресса – через 4 часа (в 2,54 раза, $p = 0,99$). В лейкоцитарном компоненте крови при действии стрессоров увеличивается количество нейтрофилов и уменьшается лимфоцитов. Количественная выраженность изменений согласовывается с динамикой кортикостерона в крови крыс в ходе развития стресс-реакции. Величина лейко-гормональных индексов ИСЛК (индекс соотношения лимфоцитов и кортикостерона), ИСНК (индекс соотношения нейтрофилов и кортикостерона) и ИИНЛК (интегрального индекса нейтрофилов, лимфоцитов и кортикостерона) в модели иммобилизационного стресса максимально возрастает через 1 час после прекращения стрессовой нагрузки, превышая фоновые значения в 2,45; 1,38 и 3,94 раза ($p = 0,99$); в модели вибрационного стресса – через 4 часа после стрессирования, отличаясь от исходных данных в 3,11; 1,43 и 5,54 раза ($p = 0,99$). Наибольшей информативностью среди лейко-гормональных индексов обладает ИИНЛК, что позволяет рекомендовать его к использованию при гематологической оценке стресса в различных экспериментах.

Ключевые слова: стресс, лейко-гормональные индексы, кортикостерон, лейкоциты.

В настоящее время доказано, что острый или хронический стресс влияет на гомеостаз организма, инициируя развитие сдвигов в его физиологическом состоянии и повышая риск развития патологических процессов [1]. В то же время молекулярные механизмы, лежащие в основе реализации действия стрессоров, до сих пор остаются малоизученными.

Исследования последних лет свидетельствуют, что в регуляции восстановительных процессов при купировании стрессовых состояний большую роль играют гормоны надпочечников, биологические эффекты которых определяют генетический ответ организма посредством изменения иммунной функции, определения пути адаптационного процесса, модуляции сигнальных путей, включая рецепторы, ионные каналы и регуляторные белки [2]. Острый стресс влияет на направленность биологических процессов в организме животных как результат развития в нем состояния тревоги [3].

Из гормонов надпочечников в организме грызунов и птиц при оценке их реакции на стресс важную роль играет кортикостерон [4, 5, 6]. При этом динамика гормона в ходе развития приспособительных процессов позволяет составить представление о формировании адаптационной стратегии организма при воздействии того или иного стрессора. В то же время большинство исследований в модели лабораторных животных отражают реакционноспособность надпочечников или в определенный период постнатального развития, или при действии одного конкретного стрессора [7].

Хотя закономерности формирования стрессовой реакции и общего адаптационного синдрома в организме животных универсальны [5, 8, 9], но все-таки они имеют специфические нейроэндокринные и метаболические признаки в зависимости от вида, пола и генотипа животных, силы и природы стрессора, адаптационных резервов организма и его стресс-реактивности [10, 11].



При этом имеются различия в индивидуальной чувствительности особей к стрессорным нагрузкам [12], и данный аспект проблемы мало изучен.

Поэтому **целью работы** явилась оценка реакции организма грызунов на стресс, сопровождающаяся выбросом в кровь кортикостерона и изменением клеточного состава крови, при действии иммобилизационного и вибрационного стрессора.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная работа планировалась и проводилась с учетом принципов биоэтики и гуманного отношения к животным. Взрослые самцы крыс Wistar, использованные в работе, получены и выращены в условиях вивария. Животные содержались в групповых клетках в одном помещении, в стандартных лабораторных условиях (световой режим свет/темнота 12:12, температура воздуха 22–23 °С, влажность воздуха 65%). Для кормления использовался корм для грызунов, питьевая вода без ограничений из индивидуальных поилок. Крысы, подобранные в опытные группы, имели различия по живой массе в пределах 5–10%. Эксперименты выполнены в светлое время суток, чтобы нивелировать прирост концентрации кортикостерона с наступлением темноты [4].

Модель вибрационного стресса создавалась при помощи платформы, движущейся возвратно-поступательно. На ней закрепляли клетку с крысами. Платформа двигалась равномерно со скоростью 160 движений в минуту [8]. Длительность эксперимента составила 120 минут (2 часа).

Модель иммобилизационного стресса создавалась при помощи пластикового бокса, размер которого позволял крысам свободно дышать, но не обеспечивал возможности передвижения. Длительность иммобилизации составила 2 часа.

Перед эвтаназией животных усыпляли, используя ингаляционное введение диэтилового эфира. У крыс опытных групп получали биологический материал (кровь) до стресса (фоновый уровень), а далее через 1, 4, 24 часа после моделирования стресса. В образцах крови определяли клеточный состав, используя возможности гематологического анализатора Mindray BC 2800 Vet (Китай), а также концентрацию кортикостерона иммуноферментным методом при помощи наборов реактивов «ELISA» (Гер-

мания) – каждый образец анализировали в двух повторностях в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность определяли при длине волны 405 нм с помощью микропланшетного ридера (Mindray, Китай).

Для оценки влияния кортикостерона на лейкоцитарный состав крови крыс определили величину лейко-гормональных индексов, количественно выраженных в условных единицах [6, 13]:

1. Индекс соотношения лимфоцитов и кортикостерона (ИСЛК):

$$\text{ИСЛК} = \frac{К}{\text{Лим}}.$$

2. Индекс соотношения нейтрофилов и кортикостерона (ИСНК):

$$\text{ИСНК} = \frac{К}{Н}.$$

3. Интегральный индекс нейтрофилов, лимфоцитов и кортикостерона (ИИНЛК):

$$\text{ИИНЛК} = \left(\frac{Н}{\text{Лим}} \right) \cdot К,$$

где Лим – количество лимфоцитов в крови, $10^9/\text{л}$;

Н – количество нейтрофилов (палочкоядерных + сегментоядерных) в крови, $10^9/\text{л}$;

К – концентрация кортикостерона в плазме крови, нг/мл.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Результаты выражали в виде средней и стандартной ошибки. В связи со значительной неоднородностью данных применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (U-критерий).

Результаты исследования и их обсуждение

Кортикостерон как основной глюкокортикоид в организме крыс регулирует метаболический и иммунологический гомеостаз не только в физиологическом состоянии, но и при стрессовых воздействиях. Гормон, связываясь и активируя определенные ядерные рецепторы и транскрипцию генов, определяет синтез энергии в соответствии с силой стрессового воздействия [5, 6, 14]. Поэтому мы оценили влияние вибрационного и иммобилизационного стресс-факторов на секреторную активность

коры надпочечников в организме крыс, используя в качестве индикатора уровень кортикостерона в крови (табл. 1).

Различия стрессового воздействия факторов оценены в рамках формирования стрессовой реакции в организме животных, изменения при которой определяются развитием стадии тревоги за счет активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [10]. Вид стрессора определял секреторную активность коры надпочечников и концентрацию кортикостерона в крови крыс (табл. 1). Так, в модели иммобилизационного стресса после 2-часового сеанса неподвижности значительный прирост уровня гормона выявлен через 1 час после прекращения действия стрессора (в 2,15 раза, $p = 0,99$). В ходе развития стресс-реакции стресс-индуцированные концентрации кортикостерона уменьшались и через 24 часа достоверно не отличались от фоновых значений.

В модели вибрационного стресса наибольшее увеличение уровня кортикостерона

наблюдалось через 4 часа после воздействия стрессора (табл. 1). Уровень гормона превышал фоновые значения в 2,54 раза ($p = 0,99$). Статистически значимые различия по кортикостерону сохранялись и через 24 часа после вибрационного стресса.

Следовательно, на фоне воздействия таких «острых стрессоров», как иммобилизация и вибрация, чувствительность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось была различной, определяя секреторную активность надпочечников и уровень кортикостерона в крови.

Основываясь на том, что кортикостерон обладает иммуносупрессивным действием [9, 15], влияя в первую очередь на количество нейтрофилов и лимфоцитов в крови [16], мы охарактеризовали изменения в лейкоцитарном пуле крови у животных опытных групп в разных моделях стресса.

В модели иммобилизационного и вибрационного стресса в лейкоцитарном компоненте

Таблица 1 – Изменчивость уровня кортикостерона (нг/мл) в крови крыс после стрессового воздействия вибрации и иммобилизации

Показатель	До стрессовой нагрузки (фон)	После стрессовой нагрузки, ч		
		1	4	24
Модель иммобилизационного стресса	163,71±5,36	352,66±15,43***	260,77±12,64***	181,39±5,59
Модель вибрационного стресса	176,30±6,14	384,54±9,86***	447,90±12,97***	250,17±10,49

Примечание: *** – U-критерий ($p = 0,99$) по отношению к фону (до стрессового воздействия).

Таблица 2 – Лейкоцитарный пул крови животных опытных групп ($n = 7$)

Показатель	До стрессовой нагрузки (фон)	После стрессовой нагрузки, ч		
		1	4	24
Модель иммобилизационного стресса				
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,21±0,18	7,90±0,15*	7,57±0,18	7,37±0,12
Эозинофилы, %	0,71±0,29	1,86±0,26*	1,29±0,18	0,86±0,26
Палочкояд. нейтрофилы, %	1,86±0,34	4,00±0,31*	3,00±0,38	2,29±0,36
Сегментояд. нейтрофилы, %	22,29±0,64	31,43±1,04*	26,57±0,48*	24,57±0,65
Лимфоциты, %	72,00±0,98	57,71±1,11*	64,85±1,16*	68,42±1,00
Моноциты, %	3,14±0,34	5,00±0,38*	4,29±0,29	3,86±0,40
Модель вибрационного стресса				
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,40±0,18	8,01±0,13*	8,13±0,12*	7,67±0,11*
Эозинофилы, %	0,57±0,20	1,43±0,20*	2,00±0,31*	0,86±0,26*
Палочкояд. нейтрофилы, %	2,14±0,26	3,71±0,36*	4,14±0,46*	2,86±0,26
Сегментояд. нейтрофилы, %	21,71±0,57	31,29±0,92*	34,43±0,48*	23,57±0,43
Лимфоциты, %	73,14±0,74	59,27±0,78*	54,29±1,58*	69,42±1,23
Моноциты, %	2,44±0,37	4,30±0,42*	5,14±0,34*	3,29±0,36

Примечание: * – U-критерий ($p = 0,95$) по отношению к фону (до стрессового воздействия).



крови развились типичные для острой стрессовой реакции изменения [6, 17, 18], проявляющиеся в виде нейтрофилии и лимфопении (табл. 2). Различия были обусловлены не столько количественными сдвигами, сколько временем выявления наибольших изменений в лейкограмме после стрессовой нагрузки. В модели иммобилизационного стресса они максимально были выражены через 1 час после стрессирования, а в модели вибрационного стресса – через 4 часа. При этом изменения в лейкоцитарном пуле крови согласовывались с динамикой уровня кортикостерона в крови крыс опытных групп в ходе развития стрессовой реакции.

Наши данные подтверждают исследования и других авторов [9, 16, 18], в которых отмечено наличие тесной связи между профилем лейкоцитарных клеток и уровнем глюкокортикоидов в крови независимо от природы стрессоров.

Для подтверждения взаимосвязи между количеством кортикостерона в крови животных с числом нейтрофилов, лимфоцитов и соотношением нейтрофилы/лимфоциты были рассчитаны

лейко-гормональные индексы. Мы предположили, что изменчивость данных индексов в ходе стрессовой реакции характеризует силу воздействия стрессора, мобильность адаптационных ресурсов в организме крыс и реактивность его защитных сил.

В модели иммобилизационного стресса величины индексов, отражающих взаимосвязь между концентрацией кортикостерона в крови и количеством: а) лимфоцитов (ИСЛК), б) нейтрофилов (ИСНК), в) соотношением нейтрофилов и лимфоцитов (ИИНЛК), наибольшие значения имели через 1 час после прекращения стрессовой нагрузки (рис. 1). При этом их уровень превышал фоновые значения в 2,45; 1,38 и 3,94 раза ($p = 0,99$). Через 24 часа после стрессовой нагрузки величина лейко-гормональных индексов статистически значимо не отличалась уже от фоновых данных.

Аналогичная сопряженность уровня кортикостерона в крови крыс с количеством нейтрофилов и лимфоцитов, а также направленностью их изменений в ходе стрессовой реакции

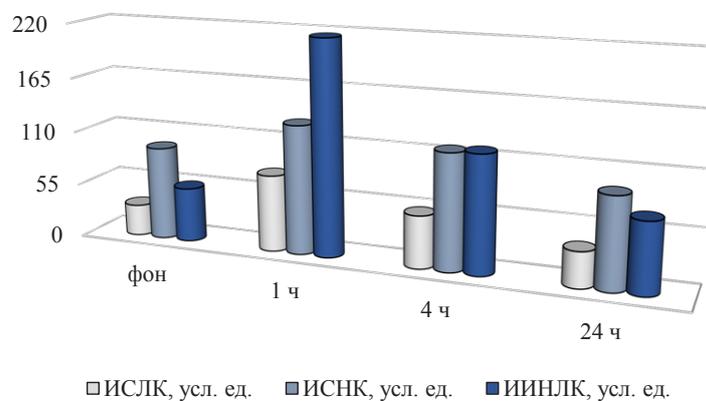


Рис. 1. Лейко-гуморальные индексы в модели иммобилизационного стресса

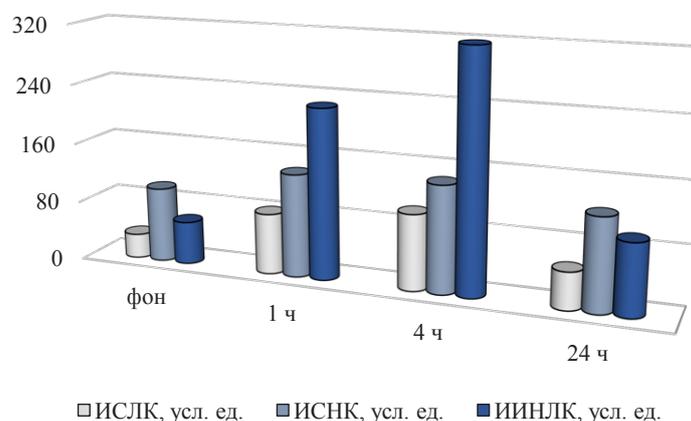


Рис. 2. Лейко-гуморальные индексы в модели вибрационного стресса

выявлена и в модели вибрационного стресса (рис. 2). Однако максимум величин индексов ИСЛК, ИСНК и ИИСНЛК соответствовал контрольной точке «через 4 часа» после прекращения стрессовой нагрузки. Их уровень отличался от фоновых значений в 3,11; 1,43 и 5,54 раза ($p = 0,99$). Кроме этого, через 24 часа после стрессирования лейко-гормональные индексы хотя и не статистически значимо, но отличались от исходных данных.

Сравнительный анализ динамики и величин лейко-гормональных индексов в используемых моделях стресса (рис. 1, 2) позволил выявить следующее.

1. У крыс, подвергавшихся 2-часовому воздействию вибрационного стресс-фактора, изменения уровня кортикостерона, нейтрофилов и лимфоцитов в крови и соответственно индексов, по сравнению с действием иммобилизационного стрессора, были значительно существеннее. Это свидетельствовало о том, что вибрация являлась более сильным стресс-фактором для организма крыс, чем иммобилизация; она инициировала появление наиболее значимых сдвигов в секреторной активности компонентов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси животных, что и определило длительность сохранения изменений в лейкоцитарном пуле крови в ходе развития стрессовой реакции.

2. Иммобилизация и вибрация как «острые стрессоры» определяли степень влияния кортикостерона на лейкоцитарный состав крови, регулируя миграционную подвижность и реактивность в первую очередь нейтрофилов и лимфоцитов.

3. Величина индекса ИИНЛК (интегрального индекса нейтрофилов, лимфоцитов и кортикостерона), количественно характеризующего связь уровня кортикостерона с числом нейтрофилов и лимфоцитов в крови крыс, более значимо изменялась в ходе стресс-реакции по сравнению с ИСЛК (индекс соотношения лимфоцитов и кортикостерона) и ИСНК (индекс соотношения нейтрофилов и кортикостерона) как в модели иммобилизационного, так и вибрационного стресса. Это позволяет рекомендовать его к использованию при гематологической оценке стресса в различных экспериментах.

Таким образом, 2-часовое воздействие иммобилизационного и вибрационного стресс-факторов на организм лабораторных крыс сопровождается активацией компонентов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, определяя увеличение в крови животных concentra-

ции кортикостерона. Уровень гормона в модели иммобилизационного стресса максимально возрастает через 1 час после прекращения действия стрессора (в 2,15 раза, $p = 0,99$); в модели вибрационного стресса – через 4 часа (в 2,54 раза, $p = 0,99$). Изменения в лейкоцитарном компоненте крови проявляются в виде нейтрофилии и лимфопении, количественная выраженность которых согласовывается с динамикой кортикостерона в ходе развития стресс-реакции. Роль кортикостерона в регуляции лейкоцитарного пула крови отражает величина лейко-гормональных индексов: ИСЛК (индекс соотношения лимфоцитов и кортикостерона), ИСНК (индекс соотношения нейтрофилов и кортикостерона) и ИИНЛК (интегрального индекса нейтрофилов, лимфоцитов и кортикостерона). В модели иммобилизационного стресса их уровень максимально возрастает через 1 час после прекращения стрессовой нагрузки и превышает фоновые значения в 2,45; 1,38 и 3,94 раза ($p = 0,99$); в модели вибрационного стресса – через 4 часа после стрессирования и отличается от исходных данных в 3,11; 1,43 и 5,54 раза ($p = 0,99$). Наибольшей информативностью среди лейко-гормональных индексов обладает ИИНЛК, что позволяет рекомендовать его к использованию при гематологической оценке стресса в различных экспериментах.

Список литературы

1. Morphofunctional State of the Large Intestine in Rats under Conditions of Restraint Stress and Administration of Peptide ACTH(4-7)-PGP (Semax) / M. V. Svisheva [et. al.] // Bull Exp Biol Med. 2021. Vol. 170 (3). P. 384–388. DOI: 10.1007/s10517-021-05072-z.
2. Baduanjin exerts anti-diabetic and anti-depression effects by regulating the expression of mRNA, lncRNA, and circRNA / T. An [et. al.] // Chin. Med. 2019. Vol. 14 (3). P. 140–149. DOI: 10.1186/s13020-019-0225-1.
3. Antistress Action of Melanocortin Derivatives Associated with Correction of Gene Expression Patterns in the Hippocampus of Male Rats Following Acute Stress / I. B. Filippenkov [et. al.] // J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22 (18). P. 10054. DOI: 10.3390/jms221810054.
4. Measuring corticosterone concentrations over a physiological dynamic range in female rats / M. Bekhbat [et. al.] // Physiol Behav. 2018. Vol. 1 (194). P. 73–76. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.04.033.



5. Мифтахутдинов А. В. Использование концентрации кортикостерона в помете для диагностики стрессов у кур в условиях промышленного содержания // *Инновационные технологии в ветеринарной, биологии и экологии : матер. Междунар. науч.-практ. конф. Троицк : УГАВМ, 2013. С. 51–53.*

6. The role of corticosterone in the regulation of the cellular composition of chicken blood during the stress reaction / M. A. Derkho [et. al.] // *E3S Web of Conferences. International Conference “Ensuring Food Security in the Context of the COVID-19 Pandemic” (EFSC2021). 2021. Vol. 282. P. 03003 DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128203003>.*

7. Maladaptive Alterations of Defensive Response Following Developmental Complex Stress in Rats / J. Kim [et. al.] // *Clin Psychopharmacol Neurosci. 2020. Vol. 18 (3). P. 412–422. DOI: 10.9758/cpn.2020.18.3.412.*

8. Харлап С. Ю., Дерхо М. А. Оценка адаптационной способности цыплят по активности ферментов крови и супернатанта сердца // *АПК России. 2016. Т. 75. № 1. С. 41–46.*

9. Дерхо М. А., Сайфутдинова Л. Н. Кортикостерон и его влияние на мобильность лейкоцитов при стрессовой реакции кур // *От импортозамещения к экспортному потенциалу: научно-инновационное обеспечение АПК : сб. матер. науч.-практ. конф. Екатеринбург : УрГАУ, 2021. С. 41–43.*

10. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice / S. D. Iñiguez [et. al.] // *Stress. 2014. Vol. 17 (3). P. 247–255. DOI: 10.3109/10253890.2014.910650.*

11. Сайфутдинова Л. Н., Дерхо М. А. Оценка биологических связей кортикостерона и кортизола в организме кур при стрессе // *Ученые за-*

писки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2021. Т. 246. № 2. С. 187–193.

12. Умрюхин П. Е., Григорчук О. С. Кортикостерон крови и ликвора у крыс с различным поведением в открытом поле при стрессорной нагрузке // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 11 (3). С. 372–374.*

13. Колесник Е. А., Дерхо М. А. Об участии гипофизарно-адренкортикальных гормонов в регуляции клеточного пула крови у цыплят-бройлеров // *Проблемы биологии продуктивных животных. 2018. № 1. С. 64–74.*

14. Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Dysfunction in Cholestatic Liver Disease / A. D. Petrescu [et. al.] // *Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Vol. 12(9). P. 660. DOI: 10.3389/fendo.2018.00660.*

15. Современные фармако-токсикологические аспекты терапии и хирургии животных : монография / А. В. Мифтахутдинов [и др.]. Челябинск : ФГБОУ ВО Южно-Уральский ГАУ, 2019. 252 с.

16. Hickman D. L. Evaluation of the neutrophil: lymphocyte ratio as an indicator of chronic distress in the laboratory mouse // *Lab Anim (NY). 2017. Vol. 46 (7). P. 303–307. DOI: 10.1038/labanim.1298.*

17. Донник И. М., Дерхо М. А., Харлап С. Ю. Клетки крови как индикатор активности стресс-реакции в организме цыплят // *Аграрный вестник Урала. 2015. № 5 (135). С. 68–71.*

18. Kasten-Jolly J., Lawrence D. A. Differential blood leukocyte populations based on individual variances and age // *Immunol Res. 2022. Vol. 70 (1). P. 114–128. DOI: 10.1007/s12026-021-09257-6.*

Кинзерский Федор Михайлович, аспирант, кафедра естественнонаучных дисциплин, ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный аграрный университет.

E-mail: khimieugavm@inbox.ru.

Дерхо Марина Аркадьевна, д-р биол. наук, заведующий кафедрой естественнонаучных дисциплин, ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный аграрный университет.

E-mail: derkho2010@yandex.ru.

Середа Татьяна Игоревна, канд. биол. наук, доцент, кафедра естественнонаучных дисциплин, ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный аграрный университет.

E-mail: seredati-76@mail.ru.

* * *