

**ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЕЙ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО КОРТИКОСТЕРОНА, ЭКСПРЕССИИ ЦЕНТРАЛЬНЫХ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КРЫС С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ В ДИНАМИКЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ**

Байбурина Г.А.<sup>1</sup>, Нургалева Е.А.<sup>1</sup>, Никитина И.Л.<sup>1</sup>, Булыгин К.В.<sup>1</sup>, Самигуллина А.Ф.<sup>1</sup>, Аглетдинов Э.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: gulnar.2014@mail.ru

Цель работы – установление взаимосвязей между уровнями кортикостерона в плазме крови, экспрессии кортикостероидных рецепторов гиппокампа и поведенческой активности крыс с разной устойчивостью к гипоксии после перенесенной глобальной ишемии. После тестирования на устойчивость к гипоксии и выделения двух опытных групп крыс высокоустойчивых и неустойчивых к гипоксии моделировали пятиминутную остановку кровообращения с последующей реанимацией. Период наблюдения составлял 35 дней. Выявленные сдвиги паттернов поведения связаны корреляционными взаимосвязями с изменением иммунореактивности глюко- и минералокортикоидных рецепторов и их соотношениями в гипоталамической области мозга. У низкоустойчивых крыс иммунореактивность минералокортикоидных рецепторов была значимо редуцирована в 1, 3, 7, 14-е сутки, а соотношение экспрессии минерало/глюкокортикоидных рецепторов было преимущественно в пользу последних. У высокоустойчивых животных иммунореактивность минералокортикостероидных рецепторов не опускалась статистически значимо ниже контрольных значений, а соотношение рецепторов либо не нарушалось, либо было незначительным, либо существенно преобладала активность минералокортикоидных рецепторов. Таким образом, снижение вследствие гипоксического повреждения иммунореактивности минералокортикоидных прежде всего, и лишь затем избыточная экспрессия глюкокортикоидных рецепторов являются факторами, влияющими на характер поведенческих реакций в динамике восстановительного периода.

Ключевые слова: устойчивость к гипоксии, кортикостерон, кортикостероидные рецепторы.

**THE CORRELATION OF CIRCULATING LEVELS OF CORTICOSTERONE, THE EXPRESSION OF CENTRAL CORTICOSTEROID RECEPTORS AND CHANGE OF BEHAVIORAL ACTIVITY OF RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA IN THE DYNAMICS OF RECOVERY AFTER EXTREME HYPOXIA**

Bayburina G.A.<sup>1</sup>, Nurgaleeva E.A.<sup>1</sup>, Nikitina I.L.<sup>1</sup>, Bulygin K.V.<sup>1</sup>, Samigullina A.F.<sup>1</sup>, Agletdinov E.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: gulnar.2014@mail.ru

The objective of the research is to determine the correlation between corticosterone levels in blood plasma, the expression of corticosteroid receptors in the hippocampus, and the behavioral activity of rats with different resistance to hypoxia after global ischemia. After testing for resistance to hypoxia and isolation of two experimental groups of rats of highly resistant and low resistant, a five-minute circulatory arrest followed by resuscitation was simulated. The observation period was 35 days. The revealed shifts in patterns of behavior are correlated with the correlation of changes in immunoreactivity of gluco- and mineralocorticoid receptors and their correlation in the hypothalamic region of the brain. In low-resistant rats, the immunoreactivity of mineralocorticoid receptors was significantly reduced on the 1st, 3rd, 7th, and 14th days, and the expression ratio of mineral / glucocorticoid receptors was predominantly in favor of the latters. In highly resistant animals, the immunoreactivity of mineralocorticoid receptors did not drop statistically significantly below the control values, and the ratio of the receptors either was not disturbed, or the activity of the mineralocorticoid receptors was negligible or significantly prevailed. Thus, a decrease due to hypoxic damage to the immunoreactivity of mineralocorticoid, primarily, and only then, overexpression of glucocorticoid receptors are the factors affecting the nature of behavioral responses in the dynamics of the recovery period.

Keywords: resistance to hypoxia, corticosterone, corticosteroid receptors.

**Актуальность.** Профилактика и терапия постреанимационных осложнений, полноценное восстановление после тяжелой ишемии является одной из важнейших задач фундаментальной медицины. Внезапная остановка кровообращения вызывает развитие тотальной гипоксии/аноксии и достаточно стереотипные для биологических систем метаболические сдвиги [1]. Несмотря на универсальность системного ответа, степень повреждения и возможности восстановления организма после гипоксического воздействия чрезвычайно вариабельны. Известно, что эволюционно сформировавшаяся норма реакции на гипоксию отличается даже у животных одного вида и пола, что находит отражение в особенностях индивидуальной резистентности к гипоксии, в том числе в характере адаптивных поведенческих реакций. С позиций теории адаптационных стратегий адаптация к экстремальным воздействиям может быть направлена на активное преодоление действия патогенного фактора за счет реализации реакции «борьба-бегство», что является основой резистентной стратегии, либо на пассивное восприятие действия раздражителя – толерантная стратегия [2]. Две полярные стратегии отличаются друг от друга своими механизмами, а также адаптивными и дезадаптивными последствиями. Толерантная стратегия адаптации характеризуется ограничением потребления кислорода и повышенной устойчивостью к гипоксии. Напротив, для резистентной стратегии характерно сниженное потребление кислорода и нарушение устойчивости к гипоксии. Глюкокортикоиды в процессах приспособления организма к экстремальным воздействиям играют важнейшую роль, выполняя множество препаративных функций, реализуемых через специфические кортикостероидные рецепторы. Именно изменение экспрессии центральных глюкокортикоидных рецепторов считается ответственным за трансформацию активности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы и поведенческой адаптации при воздействии стрессора [3].

**Цель работы** – экспериментальное исследование взаимосвязей между уровнями кортикостерона в плазме крови, экспрессии глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов гиппокампа и поведенческой активности крыс с разной устойчивостью к гипоксии после перенесенной глобальной ишемии.

**Материалы и методы.** Серия экспериментов выполнена на 320 половозрелых самцах беспородных белых крыс массой 180-220 г. При выполнении экспериментальных исследований руководствовались этическими принципами, декларированными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г.). Животных содержали на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде. Условия проведения экспериментов для контрольных и опытных групп были идентичными.

По итогам тестирования на устойчивость к гипоксии [4] животные были разделены на две группы: высокоустойчивые (ВУ) и неустойчивые (НУ) к гипоксии. Через неделю после тестирования под общим эфирным наркозом моделировали 5-минутную аноксию по методу Корпачева В.Г. (1982) [5] интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца с последующей реанимацией. Контрольная группа крыс после тестирования на устойчивость к гипоксии подвергалась эфирному наркозу без моделирования аноксии. Период наблюдения составлял 35 дней. По истечении 1, 3, 5, 7, 14, 21 и 35-х суток животных под эфирным наркозом выводили из эксперимента декапитацией и осуществляли забор крови и ткани мозга для исследования. Содержание глюко- и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем ELISA Kit (China) фирмы Cloud-Clone Corp. (USA), циркулирующего кортикостерона – радиоиммунологическим методом с помощью стандартных тест-систем IMMUNOTECH (Чехия).

В каждый контрольный отрезок времени оценивали характер поведения животных с использованием теста «открытое поле» (ОП). Все паттерны систематизировали, после чего выделяли следующие интегральные характеристики индивидуального поведения: эмоциональная тревожность (ЭТ): сумма паттернов «движение на месте», «вертикальная стойка», «стойка с упором»; ориентировочно-исследовательская активность (ОИА): сумма активных паттернов «перемещение», «обнюхивание», «норка» [6].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили непараметрическими методами. При сравнении групп использовали критерий (U) Манна–Уитни, для выявления связи признаков - корреляционный анализ по Спирмену. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и обсуждение.** Анализ результатов исследования в ОП контрольных животных показал, что в первые минуты тестирования воздействие необычных эмоциогенных факторов вызвало преобладание реакций замиранья. Далее был переход в поведение патрулирования с активацией горизонтальной локомоции и исследовательских паттернов. Но, несмотря на общую схожесть поведенческих реакций, были выявлены статистически значимые различия по ряду показателей в контрольных группах животных с разной устойчивостью к гипоксии, что укладывается в логику теории адаптационных стратегий, согласно которой высокоустойчивые крысы склонны к пассивному восприятию действия раздражителя (толерантная стратегия), а низкоустойчивые к активному преодолению действия патогенного фактора (резистентная стратегия) [2].

Контрольные ВУ крысы демонстрировали достоверно меньшие показатели ориентировочно-исследовательской активности (рис. 1А), горизонтальной двигательной

активности (ГДА) по числу пересеченных квадратов (рис. 1Б). Для НУ животных контрольной группы были характерны статистически значимо более высокие показатели эмоциональной тревожности (рис. 1В) и анксиогенной дефекации, что свидетельствует о большем уровне их эмоциональной тревожности по сравнению с ВУ.

Остановка системного кровообращения и 5-минутная тотальная ишемия вызвали значительные нарушения процессов высшей нервной деятельности животных, выраженность которых коррелировала с устойчивостью к гипоксии. В первые сутки ориентировочно-исследовательская активность обеих групп крыс характеризовалась значительным угнетением практически всех компонентов. ГДА у НУ крыс снижалась на 60%, ОИА на 38%, у ВУ соответственно на 44% и 29% ( $p < 0,05$ ). В обеих группах в несколько раз снижался интегральный показатель эмоциональной тревожности. Количество актов груминга у низкоустойчивых к гипоксии особей значимо сокращалось, а у высокоустойчивых не имело достоверных различий с контролем, при том что характер его был незавершенным. Анализ паттернов поведения свидетельствовал о трудностях построения адекватной формы реагирования, особенно у НУ животных. Резкое снижение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности значительно затрудняет получение полезного результата (избегание опасности), достигаемого в ходе реализации генетически детерминированной резистентной стратегии адаптации.

Начиная с третьих суток отмечалось повышение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в обеих группах (рис. 1АБ): у ВУ крыс в большей степени усиливалась ОИА (до 147% от контрольного уровня,  $p < 0,05$ ), у НУ – значимо увеличивалась ГДА (240%). Горизонтальная двигательная активность ВУ животных своих максимальных значений достигла на 7-е сутки, а ориентировочно-исследовательская на 14-е (244% и 278% от уровня контроля соответственно,  $p < 0,05$ ). К концу эксперимента ГДА возвращалась к исходным значениям, а уровень ОИА оставался повышенным ( $p < 0,05$ ). Резкий статистически значимый рост двигательной активности НУ животных (в 2,4 раза), зафиксированный на третьи сутки, сохранился и в последующие периоды наблюдения: 5-е сутки (в 3,2 раза), 7-е сутки (в 3,7 раза), 14-е сутки (в 3,3 раза), что свидетельствует о готовности к реализации резистентной стратегии адаптации [7]. К концу пятой недели наблюдения показатели двигательной активности вернулись к контрольным цифрам. Уровень ОИА во все контрольные сроки, за исключением 1-х и 35-х суток, был значимо выше исходных показателей с максимумами на 5-7-е (223-230%) и 21-е сутки (176%).

Интегральный показатель эмоциональной тревожности после синхронного значимого снижения в обеих группах в раннем постреанимационном периоде к 5-м суткам начал повышаться (рис. 1В). У ВУ животных рост происходил градуально и на 14-е сутки

превысил контрольные значения в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). У НУ особей после 5-х суток наметился новый спад эмоциональной тревожности, который к 14-м суткам упал до очередного минимума (в 2 раза ниже исходных данных,  $p < 0,05$ ). Таким образом, в этой группе показатель ЭТ был значимо ниже контрольных значений весь период наблюдения.

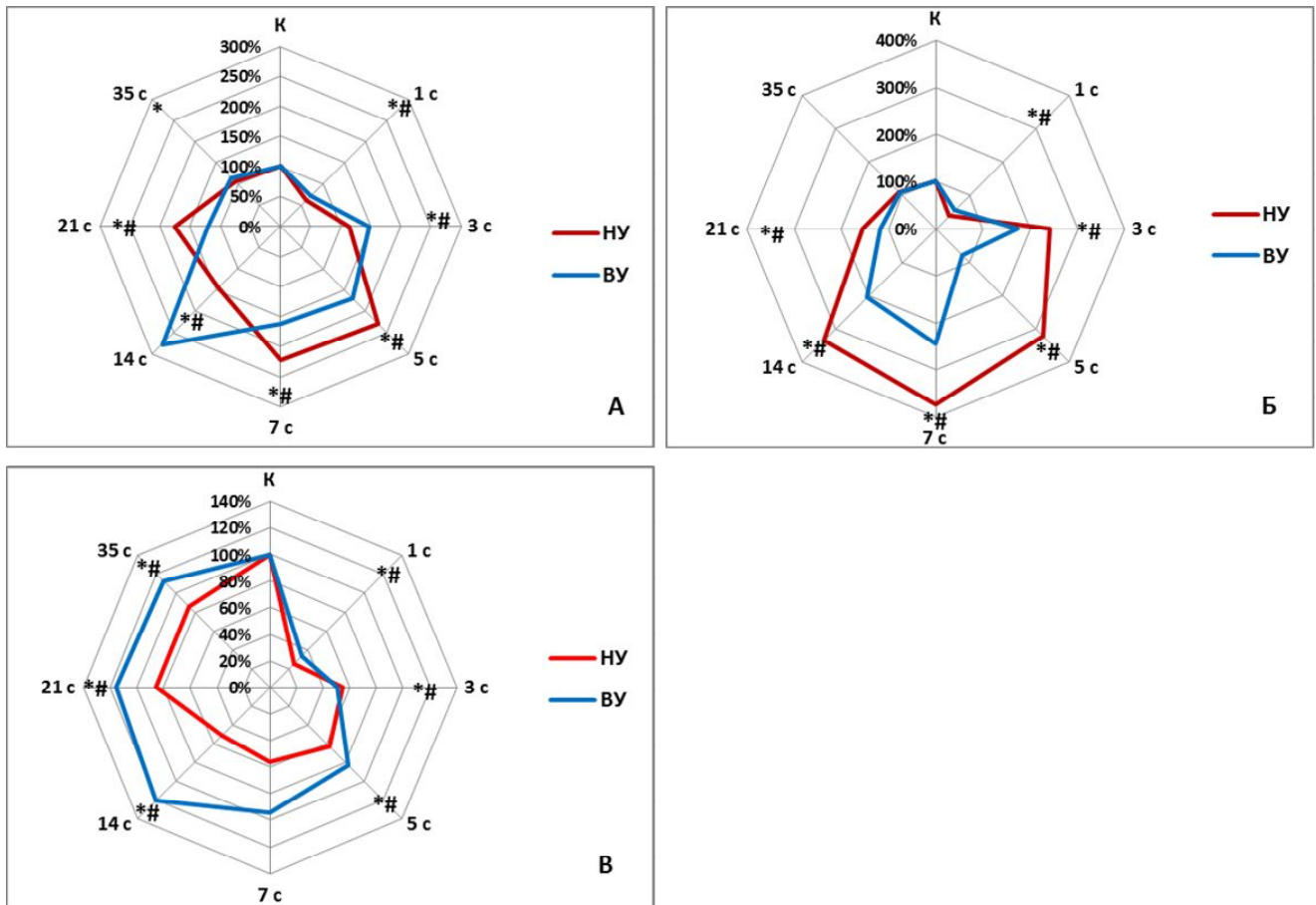


Рис. 1. Объем и структура паттернов поведения крыс с разной устойчивостью к гипоксии по тесту «открытое поле» в динамике восстановительного периода после воздействия экстремальной гипоксии, в % к показателям контрольной группы:

А – ориентировочно-исследовательская активность, Б – горизонтальная двигательная активность, В – эмоциональная тревожность

Примечание: \* – статистически значимые отличия с контролем ВУ, # – с контролем НУ,  $p < 0,05$

Обращает на себя внимание тот факт, что параллельно с активацией ориентировочно-исследовательских паттернов у ВУ особенно значительно, по сравнению с НУ, повышался уровень эмоциональной тревожности. Рост тревожности, сопряженный с увеличением содержания циркулирующего кортикостерона, некоторые авторы рассматривают как адаптивную реакцию организма, позволяющую осуществить необходимую мобилизацию ресурсов [7]. Если перенесенную гипоксию рассматривать как стресс, то очевидно, что увеличение выброса глюкокортикоидов будет связано с усилением образования экстрагипоталамического кортиколиберина, являющегося основным медиатором

тревожности, и сопровождаться повышением тревожности [8]. Однако в наших исследованиях мы не выявили однозначной корреляционной зависимости между уровнями циркулирующего кортикостерона и тревожности. В частности, к концу первых суток после критического воздействия на фоне максимального роста кортикостерона у ВУ крыс (до 142% от исходных данных,  $p < 0,05$ ) в тесте ОП наблюдались минимальные показатели ЭТ (рис. 1В). В группе НУ животных наивысшие значения кортикостерона определялись на 3-и сутки (168%,  $p < 0,05$ ), а интегральный показатель ЭТ был близок к минимальному (50%,  $p < 0,05$ ). Коэффициенты корреляции в эти периоды не были статистически значимы. В период 14-21-е сутки у ВУ крыс эмоциональная тревожность была наиболее высокой, а уровень кортикостерона низким, тогда как при таком же примерно уровне стресс-гормона у НУ животных ЭТ была ниже исходной. В этих случаях корреляционная связь была статистически значимой.

Поскольку реализация эффектов кортикостерона осуществляется через кортикостероидные рецепторы, логично было бы предположить, что указанные особенности поведенческих реакций связаны не столько с уровнем гормона, сколько с экспрессией центральных кортикостероидных рецепторов. Это тем более интересно, что в последнее время все больше появляется публикаций, связывающих развитие депрессии у больных с нарушением экспрессии ГР [3; 8]. В наших исследованиях у ВУ крыс была выявлена статистически значимая отрицательная корреляционная зависимость между иммунореактивностью ГР гипоталамической области мозга и уровнем эмоциональной тревожности средней силы в 1-5-е сутки (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = 0,52-0,58$ ), умеренная на 7-е ( $\rho = 0,44$ ), сильная в период 14-21-е сутки ( $\rho > 0,7$ ).

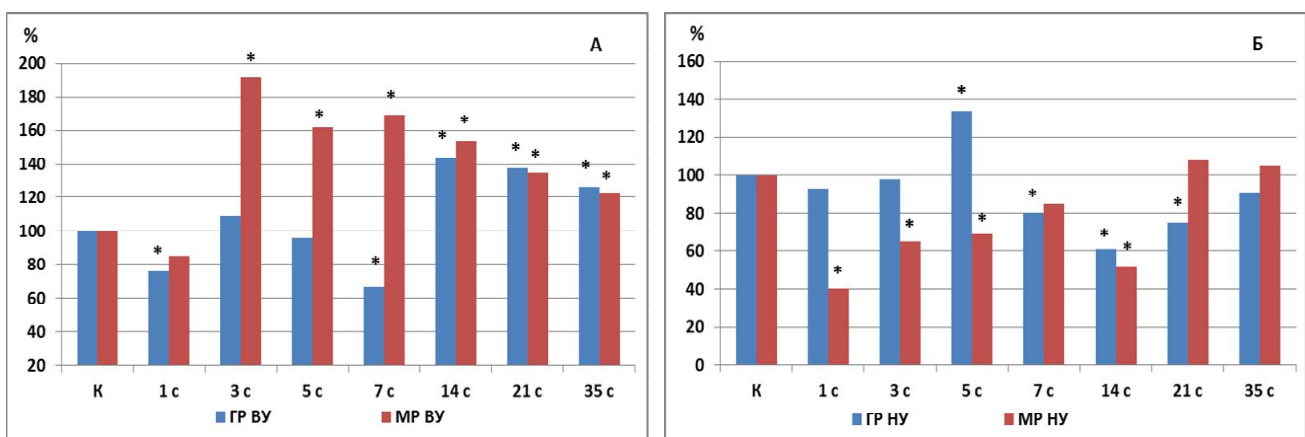


Рис. 2. Соотношение экспрессии глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе крыс с разной устойчивостью к гипоксии в динамике восстановительного периода, в % по отношению к контролю: А – показатели крыс с высокой устойчивостью, Б – с низкой устойчивостью к гипоксии

Примечание: \* – статистически значимые различия с контролем,  $p < 0,05$

У НУ животных подобной четкой зависимости выявлено не было. Такая неоднозначность связана, вероятнее всего, с уровнем экспрессии минералокортикостероидных рецепторов. МР, обладающие высоким сродством к кортикостероидам и не играющие самостоятельной роли в стресс-реактивности, способствуют функциональности ГР, в основном путем максимального связывания глюкокортикоидов [9]. В результате именно МР способны устанавливать порог активации оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники. Экспрессия МР имеет прямые защитные эффекты на нейронном уровне; гиперэкспрессия МР снижает гибель нейронов после транзиторной церебральной глобальной ишемии. Считается, что в процессах устойчивости нейронов мозга к критическим воздействиям особенное значение имеет соотношение экспрессии МР и ГР: именно преобладание иммунореактивности МР играет нейропротекторную роль [10].

В наших исследованиях у крыс с низкой устойчивостью к гипоксии иммунореактивность минералокортикостероидных рецепторов на всем протяжении эксперимента была снижена, а соотношение экспрессии МР/ГР в основном было в пользу последних (рис. 2Б). У ВУ наблюдалось менее значительное, по сравнению с НУ, нарушение соотношения экспрессии ГР и МР (рис. 2А). Другими словами, МР поддерживает функциональность ГР, и это позволяет более полно проявиться адаптивным эффектам гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы в поведенческой сфере.

### **Заключение**

Выявленные сдвиги паттернов поведения связаны корреляционными взаимосвязями с изменением иммунореактивности глюко- и минералокортикостероидных рецепторов и их соотношениями в гипоталамической области мозга. У низкоустойчивых крыс иммунореактивность МР была значимо редуцирована в 1, 3, 7, 14-е сутки, а соотношение экспрессии МР/ГР было преимущественно в пользу глюкокортикостероидных рецепторов. У высокоустойчивых животных иммунореактивность МР не опускалась статистически значимо ниже контрольных значений, при этом соотношение двух типов кортикостероидных рецепторов либо не нарушалось (3-и сутки), было несущественным (1, 14, 21, 35-е), либо значительно преобладала активность минералокортикостероидных рецепторов (5, 7-е сутки). Таким образом, снижение вследствие гипоксического повреждения иммунореактивности МР прежде всего, и лишь затем избыточная экспрессия ГР являются факторами, влияющими на характер поведенческих реакций в динамике восстановительного периода.

## Список литературы

1. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н. и др. Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 29-45.
2. Кулинский В.И., Ольховский И.А. Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях - резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов // Успехи современной биологии. - 1992. - Вып. 5-6. - С. 697-714.
3. Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н. Глюкокортикоидная гипотеза депрессии: история и перспективы // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. - Т. 20, № 2. – С. 198-203.
4. Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Шибкова Д.З., Башкатов С.А. Способ определения степени устойчивости к гипобарической гипоксии мелких лабораторных животных: патент России № 20141377/14; заявл. 17.09.2014; опубл. 20.09.2015. Бюл. № 26.
5. Корпачев В.Г. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1982. – Т. 33. – С. 78-80.
6. Охремчук Л.В., Семинский И.Ж. Особенности поведения беспородных крыс при острой интоксикации аминазином и ее коррекция фенотропилом // Сибирский медицинский журнал. – 2010. - № 4. – С. 57-59.
7. Кузина О.В., Цейликман О.Б., Лапшин М.С. и др. Соотношение между уровнем поведенческой активности, концентрацией циркулирующего кортикостерона у крыс с различной устойчивостью к гипоксии // Вестник ЮрГУ. Сер.: Образование, здравоохранение, физическая культура. - 2014. - Т. 14, № 4. - С. 54-58.
8. De Kloet E.R. Hormones and the stressed brain // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2004. – № 1018. - P. 1–15.
9. Ter Heegde F., De Rijk R.H., Vinkers C.H. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience // Psychoneuroendocrinology. - 2015. – N 52. – P. 92–110. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.10.022.
10. Gomez-Sanchez E. Brain mineralocorticoid receptors in cognition and cardiovascular homeostasis // Steroids. – 2014. - N 91. - P. 20–31. doi:10.1016/j.steroids.2014.08.014.