

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

УДК 612.112.9+577.175.53
doi: 10.17223/19988591/25/13

Т.А. Томова¹, Е.Ю. Просекина², Т.А. Замощина^{2,3},
М.В. Матюхина¹, О.А. Фатюшина³

¹ Томский государственный педагогический университет, г. Томск, Россия

² Томский государственный университет, г. Томск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

Влияние иммобилизации на показатели стресс-реакции у крыс и собак

В эксперименте моделировались стресс-реакции с использованием маркеров скрытых функциональных резервов организма. В качестве маркеров выступали иммобилизация, карбахолин и физиологический раствор. В результате получены адаптационные реакции разного типа с характерным комплексом изменений показателей крови. Таким образом, применение раздражителей (инъекции физиологического раствора и карбахолина), одновременно или последовательно включенных в действие после иммобилизации, и индивидуальные особенности, обусловленные функциональными способностями (потенциал) организма, определили степень и направленность изменений концентрации глюкокортикоидов и содержания различных морфологических форм лейкоцитов у стрессированных животных.

Ключевые слова: стресс; иммобилизация; карбахолин; физиологический раствор; глюкокортикоиды; лейкограмма.

Введение

Проблема стресса на сегодняшний день сохраняет высокую медико-социальную значимость [1–3]. Напряжение является ведущей причиной многих заболеваний. Стресс – это комплекс общих универсальных неспецифических реакций на агенты, угрожающие жизни и благополучию целостного организма, реализуемый при обязательном участии нейроэндокринной системы [4]. Система обеспечения стрессорных реакций включает в себя центральное звено, к которому относятся нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса, продуцирующие кортикотропин-рилизинг-гормон и аргинин – вазопрессин, катехоламинергические нейроны и другие нейроны, локализующиеся в стволе мозга. Периферическая часть представлена гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой осью и симпатико-адреналовой си-

стемой. Хорошо известно, что при адаптационных изменениях в ответ на воздействие различных стрессоров происходят также значительные сдвиги в функциональном состоянии парасимпатической нервной системы [5, 6].

Перестройка нейрогуморальных регуляторных систем происходит в зависимости от природы и длительности действия стрессирующих факторов [7], возрастных, видовых и индивидуальных особенностей организма [8–10]. Существует мнение, что у животных, имеющих разную поведенческую стратегию, адреналовая система реагирует на стрессорное воздействие по-разному [11]. Выдвинута гипотеза о том, что трем моделям поведения организмов при стресс-реакции («битва», «бегство» и «мнимая смерть») соответствуют три физиологических механизма реагирования (норадренергический, адренергический и серотонинергический) [12]. Кроме того, известно, что адаптационные реакции разного типа, сроки развития стадий и напряженность определяются силой и качеством раздражителей [13, 14].

Некоторые из принципиальных вопросов нейроэндокринной регуляции стресса могут быть решены только в опытах на животных. В эксперименте всегда присутствуют определенные раздражители (инъекции), сопряженные с выполнением самой экспериментальной работы (например, одновременно или последовательно включающиеся в действие раздражители, специфические только для данной экспериментальной модели). В связи с тем, что такие раздражители не изменяют базальный уровень определяемых показателей, их, как правило, считают подпороговыми и несущественными. Однако подпороговые стимулы определенного качества могут стать весомым фактором, модулирующим нейроэндокринную реакцию организма при стрессе. Их наличие в эксперименте нельзя недооценивать, и необходимо четко определять их роль. Зная вклад подобных раздражителей, их можно целенаправленно применять для управления эндокринной реакцией при стрессе и получать адаптационные реакции разного типа с характерным комплексом изменений изучаемых показателей, различные сроки развития стадий и различную напряженность; использовать в создании моделей для исследования фармакологических веществ, модулирующих действие стресса и не только.

Цель исследования – изучение влияния различного временного сочетания дополнительных стресс-воздействий после иммобилизации на количество лейкоцитов, лейкограмму и уровень кортикостероидов в плазме у крыс и собак.

Материалы и методики исследования

Эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. Опыты проведены на 30 крысах-самцах, линии Вистар, массой 180–240 г, и 7 беспородных собаках-самцах, весом 15–22 кг, с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/EC) [15].

В данной работе мы моделировали различные ответные реакции организма, используя маркеры скрытых функциональных резервов организма. В качестве маркеров выступили иммобилизация, карбахолин и физиологический раствор. Инъекции физиологического раствора нередко используются в качестве контроля к парентеральному введению каких-либо фармакологических агентов, что является стрессирующим фактором для экспериментальных животных [16].

Иммобилизацию крыс однократно в течение 18 часов [17] осуществляли фиксацией животного на спине за все конечности на операционном столе; иммобилизацию собак – помещением животных в узкие клетки из деревянных реек. Неизбирательный холиномиметик карбахолин («Reanal», Венгрия) вводили внутримышечно крысам в дозе 25 мкг/кг, собакам – 6 мкг/кг. Физиологический раствор крысам вводили внутривенно в объеме 1 мл на 200 г массы, собакам – внутривенно в объеме 1 мл на 10 кг массы тела.

В рамках данной работы были выполнены следующие серии: 1) крысам вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином; 2) крысам вводили физиологический раствор и через 30 мин – карбахолин; 3) собакам вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином; 4) сразу после иммобилизации крысам вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином; 5) сразу после иммобилизации крысам вводили физиологический раствор и через 30 мин – карбахолин; 6) через 30 мин после иммобилизации собакам вводили физиологический раствор одновременно с введением карбахолина.

Кровь для лабораторных исследований отбирали у крыс из артерии во время декапитации (через 45 и 75 мин после введения физиологического раствора), у собак – из подкожной вены голени (через 150 мин после введения физиологического раствора). Интенсивность стресс-реакции определяли с помощью таких критериев, как изменение уровня 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в плазме крови, а также изменение содержания общего числа лейкоцитов и их отдельных морфологических форм в периферической крови у собак и крыс [18].

Флуориметрический метод определения 11-ОКС в плазме крови (Ю.А. Панков, И.Я. Усватова [19]) позволял судить о содержании в плазме крови собак суммарного количества двух основных гормонов, секретируемых корой надпочечников, – кортизола и кортикостерона, а в плазме крови крыс – кортикостерона. Метод основан на способности кортикостероидов, имеющих гидроксильные группы в 11 и 21 положениях и 3-кетогруппу в кольце А, обнаруживать флуоресценцию после обработки проб смесью концентрированной серной кислоты и этилового спирта. Для проведения анализа требовался 1 мл плазмы крови. В пробирку, промытую гепарином, собирали 2,5–5 мл крови из подкожной вены голени у собак и из артерии во время декапитации у крыс.

Подсчёт лейкограммы производили на 500 клеток с использованием микроскопа МБИ ЗУ42 «Ломо» после окраски мазка по Романовскому. Подсчёт

лейкоцитов производили в счётной камере Горяева с использованием микроскопа МБИ ЗУ42 «Ломо». Диапазон варьирования процентного содержания морфологических форм лейкоцитов и концентрации 11-ОКС в плазме крови оставался в пределах физиологических колебаний у всех групп экспериментальных животных [15, 20].

Статистический анализ данных проводился с помощью прикладного пакета StatSoft STATISTICA 6.0. Вычислялись среднее значение анализируемого показателя (M), стандартная ошибка среднего (m) и критерий значимости, относительно которого определялся достигаемый уровень значимости (p). Статистический анализ достоверности различий между выборками проводили с использованием непараметрического критерия Mann – Whitney (U test) и критерия Стьюдента (t). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ [21].

Результаты исследования

После введения крысам, претерпевшим иммобилизационный стресс (ИС), физиологического раствора одновременно с карбахолином регистрировали уменьшение на 60% концентрации кортикостерона в плазме крови. Введение физиологического раствора крысам после ИС за 30 мин до введения карбахолина привело к увеличению уровня кортикостерона в плазме крови на 60% (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Изменения концентрации кортикостерона, суммарного количества лейкоцитов и их морфологических форм у крыс после действия иммобилизации

Показатели периферической крови	Контроль – введение ФР и карбахолина, $M \pm m$ ($n = 14$)	Введение ФР одновременно с карбахолином после ИС, $M \pm m$ ($n = 8$)	Введение ФР за 30 мин до карбахолина после ИС, $M \pm m$ ($n = 7$)
Уровень кортикостерона, мкмоль/л	$0,5 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,005^*$	$0,8 \pm 0,10^*$
Общее число лейкоцитов, $\times (10^9/\text{л})$	$3,58 \pm 0,168$	$12,84 \pm 0,826^*$	$8,69 \pm 0,835^*$
Палочкоядерные нейтрофилы, %	$2,4 \pm 0,52$	$1,0 \pm 0,51$	$1,0 \pm 0,01$
Сегментоядерные нейтрофилы, %	$47,4 \pm 3,07$	$77,0 \pm 4,60^*$	$75,0 \pm 2,89^*$
Эозинофилы, %	$0,1 \pm 0,10$	$0,0 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,29$
Моноциты, %	$3,0 \pm 0,36$	$3,8 \pm 0,31$	$1,0 \pm 0,0^*$
Лимфоциты, %	$46,4 \pm 2,98$	$17,4 \pm 4,06^*$	$22,5 \pm 2,59^*$
Базофилы, %	$0,1 \pm 0,10$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

Примечания. Здесь и далее $M \pm m$ – среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего; n – объем выборки, соответствующий количеству опытов; ФР – физиологический раствор; ИС – иммобилизационный стресс; * – статистически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$).

Среди признаков, характеризующих стресс-реакцию у крыс, отмечены: выраженный нейтрофильный лейкоцитоз за счёт сегментоядерных нейтрофилов, моноцитопения и лимфопения. Суммарное количество лейкоцитов у крыс, подверженных иммобилизации, после введения физиологического раствора одновременно с карбахолином увеличивалось наиболее значительно (на 258%) в сравнении с введением физиологического раствора за 30 мин до холиномиметика стрессированным животным (увеличение на 143%) (табл. 1). Количество сегментоядерных нейтрофилов практически равноценно увеличивалось после введения физиологического раствора одновременно с карбахолином (на 62%) и за 30 мин до агониста холинорецепторов (на 58%) крысам, подверженным иммобилизации. Содержание лимфоцитов снижалось на 62% после введения физиологического раствора одновременно с карбахолином и на 51% – после введения раствора за 30 мин до холиномиметика. Следует отметить, что изменение количества моноцитов (уменьшение их числа на 67%) после ИС регистрировали лишь у крыс, которым вводили физиологический раствор за 30 мин до карбахолина. Содержание эозинофилов значимо не изменялось, но имело тенденцию к уменьшению в случае введения физиологического раствора одновременно с карбахолином стрессированным крысам, и тенденцию к увеличению – в случае введения физиологического раствора за 30 мин до холиномиметика крысам после иммобилизации. Есть мнение, что уменьшение числа эозинофилов наблюдают на фоне превалирования симпатической нервной системы после нагрузок – и увеличение клеток – при активации парасимпатической нервной системы после действия нагрузок [22].

У собак в контрольных опытах наблюдалась значительная вариабельность в соотношении морфологических форм лейкоцитов и концентрации 11-ОКС в плазме крови, что позволило разделить животных на две группы (табл. 2). Для собак первой группы характерно большое количество палочкоядерных нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов, но малое содержание лимфоцитов и невысокая концентрация 11-ОКС в плазме крови. Во вторую группу включены животные с низким содержанием палочкоядерных нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и высоким – лимфоцитов. При этом концентрация 11-ОКС вдвое превышала соответствующий показатель у собак первой группы. Есть данные, что при доминировании парасимпатического отдела вегетативной нервной системы в периферической крови отмечается более высокое содержание лимфоцитов в сравнении с аналогичным показателем у симпатикотоников [23].

Существенные различия между группами собак отмечены по степени выраженности стрессорной реакции. Так, после иммобилизации у собак первой группы содержание 11-ОКС увеличилось на 300% (с $0,3 \pm 0,04$ до $1,2 \pm 0,04$ мкмоль/л, $p < 0,05$), а у животных второй группы – на 167% (с $0,6 \pm 0,08$ до $1,6 \pm 0,08$ мкмоль/л, $p < 0,05$). Суммарное количество лейкоцитов у собак обеих групп после иммобилизации увеличилось на 95% – с $10,06 \pm 0,577 \times 10^9/\text{л}$ до $19,62 \pm 0,570 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$).

Т а б л и ц а 2

Показатели периферической крови в контрольных опытах у собак

Показатели	Первая группа M±m (n = 23)	Вторая группа M±m (n = 15)
Концентрация 11-ОКС, мкмоль/л	0,3±0,04	0,6±0,08**
Общее число лейкоцитов, ×(10 ⁹ /л)	10,39±0,944	9,33±0,746
Лейкограмма, %:		
палочкоядерные нейтрофилы	12,0±0,99	2,0±0,22**
сегментоядерные нейтрофилы	57,3±1,21	56,0±6,15
эозинофилы	2,2±0,16	0,8±0,40**
моноциты	5,6±0,31	4,0±0,38**
лимфоциты	22,3±0,60	37,3±6,49**
базофилы	0,3±0,09	0±0**

** – статистически значимые отличия от первой группы (p < 0,05).

Характерное для первой группы собак в контрольных опытах высокое содержание палочкоядерных нейтрофилов после воздействия стресса не изменилось. В то же время во второй группе животных стресс вызывал увеличение палочкоядерных нейтрофилов на 110% (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

**Изменение морфологических форм лейкоцитов после действия
иммобилизации у собак**

Гемограмма	Группа собак	Контроль – введение ФР и карбахолина, M±m (n ¹ = 23, n ² = 15)	Введение ФР и карбахолина после ИС, M±m (n ¹ = 19, n ² = 15)
Палочкоядерные нейтрофилы	Первая	12,0±0,99	13,1±0,90
	Вторая	2,0±0,22	4,2±0,68*
Сегментоядерные нейтрофилы	Первая	57,3±1,21	68,2±2,92*
	Вторая	56,0±6,15	67,1±2,63
Эозинофилы	Первая	2,2±0,16	1,0±0,41*
	Вторая	0,8±0,40	1,7±1,08
Базофилы	Первая	0,3±0,09	1,0±0,00*
	Вторая	0±0	0±0
Моноциты	Первая	5,6±0,31	7,8±0,72*
	Вторая	4,0±0,38	10,6±1,36*
Лимфоциты	Первая	22,3±0,60	7,7±0,84*
	Вторая	37,3±6,49	12,2±1,49*

Примечание. n¹, n² – количество опытов в первой и второй группах у собак соответственно.

В обеих группах животных содержание сегментоядерных нейтрофилов в контроле не отличалось друг от друга и после действия стресса изменялось лишь в первой группе собак (увеличилось на 22%). Содержание эозинофилов в крови у собак первой группы уменьшалось после действия стресса на 54%. Базофилы были обнаружены только в первой группе животных, и их количество после ИС уменьшалось на 67%. После действия иммобилизации содержание моноцитов у первой группы животных увеличилось на 39%.

Для второй группы собак было характерно исходно низкое содержание моноцитов, однако у них увеличение после стресса было более значительным (на 165%). ИС вызывал примерно одинаковое снижение количества лимфоцитов в крови (в первой группе на 65%, во второй – на 67%), различия по этому показателю между группами сохранялись (табл. 3).

Таким образом, у крыс в результате использования различного временного интервала между инъекциями физиологического раствора и карбахолина получены разнонаправленные изменения концентрации кортикостерона после иммобилизации, а также нейтрофилез (за счет сегментоядерных нейтрофилов), моноцитопения и лимфопения. Наиболее яркие изменения картины крови наблюдали при одновременном сочетании физиологического раствора и карбахолина у животных. У собак получены результаты, указывающие на зависимость показателей крови и направленности изменений после действия иммобилизации от уровня показателей животных в контрольных опытах. Так, у собак с низким контрольным уровнем 11-ОКС в плазме крови увеличение гормонов после стресса более выражено, чем в группе животных с более высоким контрольным значением 11-ОКС. Изменения лейкограммы после иммобилизации заключались в резко выраженном нейтрофилёзе (за счёт сегментоядерных форм у животных с высоким содержанием палочкоядерных нейтрофилов в контрольных опытах и за счет палочкоядерных форм у животных с низким уровнем их содержания в контрольных опытах), моноцитозе и лимфопении. Базофилы были обнаружены только в первой группе животных, и их количество после ИС увеличилось. Количество эозинофилов снижалось после ИС в группе собак с высоким их содержанием в контрольных опытах и лишь имело тенденцию к увеличению у животных с низким контрольным уровнем эозинофилов. У животных второй группы (с низким количеством палочкоядерных нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и высоким содержанием лимфоцитов) после иммобилизации уровень числовых значений эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов был выше, а палочкоядерных нейтрофилов – ниже, нежели в первой группе собак.

Обсуждение результатов

Реакция системы крови на действие чрезвычайных раздражителей формируется при участии универсальных стресс-реализующих систем, которые мобилизуют специфические механизмы, индуцирующие гемопоэз в физиологических и экстремальных условиях. В реализации отмеченных количественных сдвигов показателей периферической крови важную роль играет гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система (ГТАКС). Под влиянием возмущающих сигналов происходит переход системы ГТАКС из одного состояния в другое. Регулируют и перераспределяют поток энергии в организме гормоны стресса, которые осуществляют эту неспецифическую функцию, а на основании её строятся новые специфические механизмы

адаптации. Стрессорные воздействия на организм наряду с поведенческими реакциями вызывают изменения состояния парасимпатического и симпатического отделов автономной нервной системы с соответствующей модуляцией фоновых центральных холинергических и адренергических влияний. Одним из нейроэндокринных факторов, принимающих участие в стрессе, являются глюкокортикоидные гормоны [3, 24].

В наших экспериментах увеличение концентрации кортикостерона было зарегистрировано у крыс, которым вводили физиологический раствор за 30 мин до карбахолина после ИС (концентрацию гормонов определяли в плазме, полученной через 75 мин после инъекции физиологического раствора). У собак независимо от контрольного уровня 11-ОКС увеличение концентрации глюкокортикоидов наблюдали при одновременном введении физиологического раствора с агонистом холинорецепторов после иммобилизации (концентрацию гормонов определяли в плазме, полученной через 150 мин после инъекций). Необходимо отметить, что у собак первой группы (с низкой концентрацией глюкокортикоидов в контрольных опытах) степень повышения концентрации гормонов была выше в 1,8 раза по сравнению с показателями у собак второй группы (с высокой концентрацией кортикостероидов в контрольных опытах). Вместе с тем у крыс, которым вводили физиологический раствор одновременно с холиномиметиком после ИС, обнаружено значимое снижение концентрации кортикостерона (концентрацию гормонов определяли в плазме, полученной через 45 мин после инъекций физиологического раствора и карбахолина). Необходимо отметить, что в контрольных опытах отсутствовали различия в уровне кортикостерона у крыс, которым вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином, и у крыс, которым вводили физиологический раствор за 30 мин до холиномиметика. С одной стороны, возможно, данные наших опытов отражают цикличность секреторных процессов в надпочечниковой системе экспериментальных животных. С другой стороны, возможно, физиологический раствор, вводимый одновременно или последовательно с холиномиметиком, самостоятельно участвует в изменении уровня кортикостероидов, так как имеются прямые указания на подобную его способность [14, 25].

Вместе с тем можно предположить, что различия в уровне глюкокортикоидов у групп крыс, которые подвергались однотипному стрессу, определяются разными стадиями стресса, если полагать, что этому способствовало одновременное или последовательное применение дополнительных после иммобилизации раздражителей (инъекции физиологического раствора и карбахолина). Повышение секреции глюкокортикоидных гормонов отмечается при реакции тревоги, а в течение стадии истощения секреция глюкокортикоидов начинает снижаться и, наконец, падает [26, 14]. Однако трудно говорить о разных стадиях (резистентности, истощения), так как в наших экспериментах отсутствует характерная для них эозинофилия.

Есть мнение, что фактически в остром стрессе существует лишь одна стадия – тревоги, если стрессор однократен и не настолько силен, чтобы приводить к стадии истощения. Стадия резистентности после реакции тревоги относится не к стрессу, а к другим реакциям на раздражители либо слабой, либо средней силы (активации, тренировки), в зависимости от степени запредельного торможения. Стадия истощения относится к хроническому или очень тяжёлому острому стрессу [14].

В ходе проведённого нами исследования у крыс и собак после иммобилизации был зарегистрирован выраженный нейтрофилёз в периферической крови вне зависимости от сочетания дополнительных факторов (физиологический раствор, карбахолин). Лейкоцитоз за счет сегментоядерных нейтрофилов наблюдали у крыс независимо от временного интервала между инъекциями физиологического раствора и карбахолина и у собак с высоким содержанием палочкоядерных нейтрофилов в контрольных опытах. Вместе с тем нейтрофилёз за счет палочкоядерных форм регистрировали у собак с низким контрольным уровнем их содержания. Развитие нейтрофилёза, возможно, связано с выбросом этих клеток из костного мозга в периферическую кровь при стимуляции α -адренорецепторов.

Количество моноцитов у крыс и собак после иммобилизации изменялось неоднозначно. Количество моноцитарных клеток снижалось у стрессированных крыс, которым физиологический раствор вводили за 30 мин до карбахолина, не изменялось у крыс с одновременным сочетанием физиологического раствора и холиномиметика после ИС, а у собак регистрировали моноцитоз в обеих группах (с высоким и низким содержанием моноцитов в контрольных опытах). Отмечена разная степень проявления моноцитоза у собак: у животных с исходно высоким содержанием моноцитов иммобилизация вызывала менее яркий ответ (увеличение на 39%), чем у животных с исходно низким содержанием моноцитарных клеток (увеличение в 2,5 раза). В эксперименте были обнаружены эозинопения и увеличение количества базофилов только у собак первой группы после иммобилизации. Данная группа животных характеризовалась исходно высоким содержанием эозинофилов и наличием базофилов. Эозинофилы уходят из крови в соединительную ткань, где принимают активное участие в реализации функции макрофагов. Таким образом, изменения количества нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов, вероятно, определяются видовыми особенностями ответной реакции на стресс и исходным уровнем данных показателей. В то время как изменение содержания базофилов после стрессирующего воздействия, помимо видовой специфики, исходного уровня клеток, зависит от времени забора крови после иммобилизации. После ИС у всех животных отмечена лимфопения. Вероятно, в уменьшении поступления лимфоцитов в кровоток глюкокортикоиды не играли основной роли, в связи с тем что лимфопеническое действие стресса наблюдали как при повышении, так и при снижении уровней кортикостероидов у крыс после иммобилизации и разной степени

повышения 11-ОКС у собак после стресса. Возникновение эозинопении и лимфопении может быть обусловлено преобладающим влиянием симпатической нервной системы. Так, миграция лимфоцитов в костный мозг и ткани происходит при участии β -адренорецепторов. Даже повышенная миграция лимфоидных клеток из тимуса и селезёнки не может компенсировать их убыли из крови. Срочная мобилизация лимфоцитов при стрессе и расселение их по органам и тканям необходимы для обеспечения подготовки организма к ответу на любое нарушение гомеостаза.

Из всех морфологических форм лейкоцитов число лимфоцитов составляло менее 20% как у крыс, так и у собак. По мнению некоторых исследователей, основным показателем реакции организма на внешнее воздействие является процентное содержание лимфоцитов. Менее 20% лимфоцитов в периферической крови характерно для реакции типа «стресс» и отличает её от реакции активации и тренировки [14].

Следует отметить, что согласно одному из правил саморегуляции – «правилу исходного уровня» – направление и величина изменений гомеостатической константы под влиянием возмущающего фактора зависят от исходного значения константы. Здесь необходимо вспомнить, что при проведении контрольных опытов в данном эксперименте у собак были отмечены различия в величинах показателей крови, что позволило разделить животных на две группы. После иммобилизации между двумя образовавшимися группами регистрировали различные реакции по степени выраженности и направленности изменений концентрации кортикостероидов и соотношений морфологических форм лейкоцитов. По-видимому, «индивидуальная норма», обусловленная конституциональными особенностями гуморальной регуляции и структур физиологических систем, определила функциональные способности (потенциал) организма в ответ на действие стресса. Исходя из того, что сохраниться в качестве системы организм может лишь в том случае, если возмущающее воздействие автоматически вызывает активный эффект, стабилизирующий внутреннюю среду, – основным механизмом сохранения гомеостаза является саморегуляция [27].

Таким образом, применение раздражителей (инъекции физиологического раствора и карбахолина), сопряженных с выполнением данного эксперимента, одновременно или последовательно включенных в действие, оказалось весомым фактором, обусловившим ответную реакцию организма животных, подверженных иммобилизации. В результате получены адаптационные реакции разного типа с характерным комплексом изменений показателей крови. Вместе с тем индивидуальные особенности, обусловленные функциональными способностями (потенциал) организма, определили степень и направленность изменений концентрации глюкокортикоидов и содержание различных морфологических форм лейкоцитов в ответ на действие ИС.

Литература

1. Трофимова Л.К., Сузова И.А., Маслова М.В. Влияние однократного иммобилизационного стресса на метаболизм ГАМК и поведение беременных и небеременных самок крыс в раннем постстрессорном периоде // Нейрохимия. 2009. Т. 26, № 3. С. 220–224.
2. Бузуева И.И., Филюшина Е.Е., Шмерлинг М.Д. и др. Влияние хронического стресса на структуру надпочечника крыс гипертензивной линии Нисаг после превентивного лечения теразолином // Бюллетень СО РАМН. 2010. Т. 30, № 4. С. 267–273.
3. Cohen S., Janicki-Deverts D., Doyle W.J. et al. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America. 2012. Vol. 109, № 16. P. 5995–5999.
4. Ясеняевская А.Л. Изучение влияния иммобилизационного стресса и антиоксидантов на гормональную активность щитовидной железы белых крыс на разных этапах онтогенеза // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 689–693.
5. Мариотти С. Нормальная физиология гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы и ее связь с другими эндокринными железами и нервной системой // Медицинский научный и учебно-методический журнал. 2005. № 24. С. 203–222.
6. Загребин В.Л., Бойко А.С., Иванова Д.П. Сравнительная микроморфология хромофильных клеток аденогипофиза в норме и при хроническом психоэмоциональном и смешанном стрессах в раннем постнатальном онтогенезе белых крыс // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН и Администрации Волгоградской области. 2007. № 2. С. 25–26.
7. Журнист А.Г., Утешев А.Б., Макашев Ж.А., Абылаев Ж.А. Функциональное состояние симпатико-адреналовой системы в животном организме при воздействии ионизирующей радиации // Международная конференция «Механизмы функционирования висцеральных систем» : тез. докл. СПб., 1999. С. 134–135.
8. Батвитенко Н.Н., Хама-Мудар А.Л. Изменения биохимических показателей крови крыс линии Wistar и WKY при функциональной нагрузке (бег на тредмиле) // III Всероссийская конференция с межд. участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» : тез. докл. СПб., 2003. С. 31.
9. Cohen S., Hamrick N. Stable individual differences in physiological response to stressors: implications for stress-elicited changes in immune related health // Brain, Behavior, and Immunity. 2003. № 2. P. 407–414.
10. Nemeth N., Kiss F., Furka I., Miko I. Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals Clin Hemorheol Microcirc. 2010. Vol. 45, is. 2–4. P. 263–272.
11. Семенова М.Г., Ракицкая В.В. Гормональная функция адренокортикальной системы у активных и пассивных крыс в условиях неизбежного стресса // III Всерос. конф. с междунар. участием, посвящ. 175-летию со дня рожд. Ф.В. Овсянникова «Механизмы функционирования висцеральных систем» : тез. докл. СПб., 2003. С. 296.
12. Чичинадзе К.Н. Агрессивное поведение и стресс: наличие соответствий на уровне физиологического и этологического реагирования // III Всерос. конф., посвящ. 175-летию со дня рожд. Ф.В. Овсянникова «Механизмы функционирования висцеральных систем» : тез. докл. СПб., 2003. С. 346.
13. Ковтуненко А.Ю. Адаптационные реакции у кур при транспортировке и шумовом воздействии : дис. ... канд. биол. наук. Белгород, 2009. 135 с.
14. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия (Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации). М. : ИМЕДИС, 1998. 656 с.
15. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях : учеб. пособие / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М. : Профиль-2С, 2010. 358 с.

16. Замощина Т.А., Мелешко М.В. Ритмомодулирующие свойства лития оксibuтирата на фоне электролитического разрушения правого супрахиазматического ядра гипоталамуса // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2005. № 1. С. 13–16.
17. Селье Г. Стресс без дистресса. М. : Прогресс, 1979. 126 с.
18. Колесникова Л.А., Оськина И.Н. Концентрация кортикостерона в крови и лейкоцитарная формула при изучении стресса у серых крыс с различными типами поведения // Известия АН. Сер. Биологическая. Физиология животных и человека. 2003. № 1. С. 88–92.
19. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск : Наука, 1983, 243 с.
20. Кравченко И.Н., Хохлова О.Н., Кравченко Н.Н. и др. Гематологические показатели свободных от патогенной флоры крыс CD (SPRAGUE-DAWLEY) и мышей CD-1 в норме // Биомедицина. 2008. № 2. С. 20–30.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия : учебное пособие для биол. спец. вузов. М. : Высшая школа, 1990. 352 с.
22. Бекер Р. Функциональное исследование вегетативной нервной системы. URL: <http://www.sisibol.ru/issled/351.shtml> (дата обращения: 24.11.2012).
23. Рагинене И.Г. Зависимость функционального состояния иммунной системы от исходного вегетативного тонуса организма : дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2003. 110 с.
24. Zhang R., Jankord R., Flak J. et al. Role of Glucocorticoids in Tuning Hindbrain Stress Integration // The Journal of Neuroscience. 2010. Vol. 30(44). P. 14907–14914.
25. Zamoshchina T.A., Saratikov A.S., Lishmanov Yu.B. Effect of lithium hydroxybutyrate on circadian rhythms of brain serotonin content and plasma corticosteroids in reserpine-treated mice // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 1997 July. Vol. 124, № 1. P. 709–712.
26. Апчел В.Я., Цыган В.Н. Стресс и стрессустойчивость человека. СПб. : Правда, 1999. 86 с.
27. Гриднева В.И. Значение исходного уровня показателей желудочной секреции для реактивности секреторного аппарата желудка в ответ на действие возмущающих факторов // Доклады Академии наук Высшей школы России. 2004. № 2 (3). С. 106–118.

Поступила в редакцию 27.11.2013 г.

Авторский коллектив:

Томова Татьяна Александровна – канд. биол. наук, доцент кафедры медико-биологических дисциплин Томского государственного педагогического университета (г. Томск, Россия). E-mail: eskovata77@mail.ru

Просекина Елена Юрьевна – канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии человека и животных Биологического института Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: physiol@bio.tsu.ru

Замощина Татьяна Алексеевна – профессор, д-р биол. наук, профессор кафедры физиологии человека и животных Биологического института Томского государственного университета; профессор кафедры фармакологии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск, Россия). E-mail: beladona@hotmail.ru

Матюхина Мария Викторовна – студент кафедры английского языка факультета иностранных языков Томского государственного педагогического университета (г. Томск, Россия). E-mail: matyukhina.mariya@mail.ru

Фатюшина Оксана Александровна – ассистент кафедры госпитальной хирургии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск, Россия). E-mail: fatmih@sibmail.com

***Tatiana A. Tomova¹, Elena Ju. Prosekina², Tatiana A. Zamoschina^{2,3},
Maria V. Matyuhina¹, Oksana A. Fatyushina³**

¹ Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russian Federation. *E-mail: physiol@bio.tsu.ru

² Department of Physiology of Human and Animals, Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

The influence of immobilization on indices of stress reaction in rats and dogs

The experiment simulated the stress reaction, using markers of hidden functional organism reserves. These markers were immobilization, carbocholine and saline. The study was carried out on male rats weighing 180–240 g and dogs weighing 15–22 kg. Immobilization of the rats was performed once a day for 18 hours, fixing on the back by all the limbs on the operating table, the dogs were placed in a narrow cage of the wooden slats. Non-selective cholinomimetic carbocholine (“Reanal”, Hungary) was administered intramuscularly to rats at a dose of 25 mg/kg, the dogs – 6 mg/kg. Physiologic saline was administered intraperitoneally to rats in a volume of 1 ml per 200 g body weight, dogs – intravenously in a volume of 1 ml per 10 kg bodyweight. Blood for laboratory tests was taken from an artery in rats during decapitation, in dogs – from the subcutaneous vein of the shin. The intensity of the stress-reaction is determined by such criteria as the level change of 11-oksicorticosteroids (11-OCS) in plasma, as well as the total content of leukocytes and the leukocytal formula in peripheral blood in dogs and rats. Statistical procedures were performed with the help of StatSoft STATISTICA 6.0 application package using the average values of the analyzed indicator (M), standard error of the mean (m), the criterion of Mann–Whitney (U-test) and Student’s t-test (t). The differences were considered significant at $p < 0.05$. As a result, we obtained the adaptive response of different types with a characteristic set of changes in blood parameters. Using a different interval of time between the injections of saline and carbochol, changes in the concentration of corticosterone in rats were obtained after immobilization, as well as neutrophilia (due to the segmented neutrophils), monocytopenia and lymphopenia. In the animals, the most striking changes in blood were observed with the simultaneous combination of saline and carbochol. In dogs, the results were obtained which indicated the dependence of the blood and the direction of change after the action of immobilization on the baseline indicators. Thus, in animals with low baseline levels 11-OCS an increase in hormones in plasma after stress is more pronounced than in the group of animals which have higher level control 11-OCS. Changes of leukogram after immobilization consisted of a pronounced neutrophilia (due to the segmented forms in animals with initially high content of band neutrophils and due to the stab forms in animals with initially low level of their content), monocytosis and lymphopenia. Basophils were detected only in the first group of animals and their number increased after the immobilization. The number of eosinophils decreased in the group of dogs with initially high level of eosinophils and increased in animals that had low baseline level of eosinophils. After immobilization, in animals with a low baseline of stab neutrophils, eosinophils, monocytes and with initially high content of lymphocytes, the level of numerical values of eosinophils, monocytes and lymphocytes was higher and the content of stab neutrophils was lower than in the other group of dogs.

Key words: stress; immobilization; carbocholine; glucocorticoids; leukogram.

Received November 27, 2013

References

1. Trofimova L.K., Surova I.A., Maslova M.V. Vliyanie odnokratnogo immobilizatsionnogo stressa na metabolism GAMK i povedenie beremennykh i neberemennykh samok kryv v rannem poststressornom periode. *Neyrokhiimiya*. 2009. Vol. 26, No 3. PP. 220-224. [Trofimova LK, Suvorova IA, Maslova MV et. al. Effects of single immobilization stress on the GABA metabolism and behavior of pregnant and nonpregnant female rats during early post-stress period. *Neurochemical Journal*. 2009;26(3):220-224.] In Russian
2. Buzueva I.I., Filyushina E.E., Shmerling M.D. i dr. Vliyanie khronicheskogo stressa na strukturu nadpochechnika kryv gipertenzivnoy linii Nisag posle preventivnogo lecheniya terazozinom. *Byulleten' SO RAMN*. 2010. Vol. 30, No 4. PP. 267-273. [Buzueva II, Filyushina EE, Shmerling MD, Markel' AL, Jacobson GS. The chronic stress influence on the adrenal glands structure in hypertensive Isiah rats after preventive treatment with terazosin. *Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2010;30(4):56-61.] In Russian
3. Cohen S, Janicki-Deverts D, Doyle WJ et al. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(16):5995-5999.
4. Yasyavskaya A.L. Izuchenie vliyaniya immobilizatsionnogo stressa i antioksidantov na gormonal'nuyu aktivnost' shchitovidnoy zhelezy belykh kryv na raznykh etapakh ontogeneza. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2010. No 2(2). PP. 689-693. [Yasyavskaya AL. The effect of immobilization stress and antioxidants on the thyroid gland hormonal activity of white rats at different stages of ontogenesis. *Vestnik UNN*. 2010;2(2):689-693.] In Russian
5. Mariotti S. Normal'naya fiziologiya gipotalamo-gipofizarno-tireoidnoy sistemy i ee svyaz' s drugimi endokrinnyimi zhelezami i nervnoy sistemoy. *Meditinskiy nauchnyy i uchebno-metodicheskiy zhurnal*. 2005. № 24. PP. 203-222. [Mariotti S. Normal physiology of the hypothalamic-pituitary-thyroid and other endocrine glands and the nervous system. *Medical scientific and educational-methodical magazine*. 2005;24:203-222.] In Russian
6. Zagrebin V.L., Boyko A.S., Ivanova D.P. Sravnitel'naya mikromorfologiya khromofil'nykh kletok adenogipofiza v norme i pri khronicheskom psikhoemotsional'nom i smeshannom stressakh v rannem postnatal'nom ontogeneze belykh kryv. *Byulleten' Volgogradskogo nauchnogo tsentra RAMN i Administratsii Volgogradskoy oblasti*. 2007. No 2. PP. 25-26. [Zagrebin VL, Boyko AS, Ivanova DP. Comparative micromorphology chromophilic cells adenogipofiza in health and chronic psycho-emotional and mixed stress in early post-natal ontogenesis of the white rats. *Bulletin of the Volgograd scientific center of Russian Academy of Medical Sciences and the administration of Volgograd region*. 2007;2:25-26.] In Russian
7. Zhurnist A.G., Uteshev A.B., Makashev Zh.A., Abylaev Zh.A. Funktsional'noe sostoyanie simpatiko-adrenalovoy sistemy v zhivotnom organizme pri vozdeystvii ioniziruyushchey radiatsii. *Mezhdunarodnaya konferentsiya «Mekhanizmy funktsionirovaniya vistseral'nykh sistem»*: tez. dokl. SPb., 1999. PP. 134-135. [Zhurnist AG, Uteshev AB, Makashev ZhA, Abilaev ZhA. Functional state of sympathetic-adrenal system in the animal organism under the influence of ionizing radiation. International conference "Mechanisms of functioning of visceral systems": Abstracts of reports. Saint-Petersburg: 1999. pp.134-135.] In Russian
8. Batvitenko N.N., Khama-Mudar A.L. Izmeneniya biokhimicheskikh pokazateley krovi kryv linii Wistar i WKY pri funktsional'noy nagruzke (beg na tredmle). III Vserossiyskaya konferentsiya s mezhd. uchastiem «Mekhanizmy funktsionirovaniya vistseral'nykh sistem»: tez. dokl. SPb., 2003. PP. 31. [Batvitenko NN, Hama-Mudar AL. Changes in the biochemical indices of the blood of rats Wistar and WKY under functional load (running on the treadmill). III All-Russian conference with international participation "Mechanisms

- of functioning of visceral systems*": Abstracts of reports. Saint-Petersburg: 2003. pp. 31.] In Russian
9. Cohen S, Hamrick N. Stable individual differences in physiological response to stressors: implications for stress-elicited changes in immune related health. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2003;2:407-414.
 10. Nemeth N, Kiss F, Furka I, Miko I. Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010; 45(2-4):263-272.
 11. Semenova M.G., Rakitskaya V.V. Gormonal'naya funktsiya adrenokortikal'noy sistemy u aktivnykh i passivnykh kryss v usloviyakh neizbegaemogo stressa. III Vseros. konf. s mezhd. uchastiem, posvyash. 175-letiyu so dnya rozhd. F.V. Ovsyannikova «Mekhanizmy funktsionirovaniya vistseral'nykh sistem»: tez. dokl. SPb., 2003. PP. 296. [Semenova OG, Rakitskaya VV. The endocrine function of adrenal cortical systems for active and passive rats in conditions of the inevitable stress. III All-Russian conference with international participation "*Mechanisms of functioning of visceral systems*": Abstracts of reports. Saint-Petersburg: 2003. pp. 296.] In Russian
 12. Chichinadze K.N. Agressivnoe povedenie i stress: nalichie sootvetstviy na urovne fiziologicheskogo i etologicheskogo reagirovaniya. III Vseros. konf., posvyash. 175-letiyu so dnya rozhd. F.V. Ovsyannikova «Mekhanizmy funktsionirovaniya vistseral'nykh sistem»: tez. dokl. SPb., 2003. PP. 346. [Chichinadze KN. Aggressive behavior and stress: the presence of matches at the level of physiological and ethological response. III All-Russian conference with international participation "*Mechanisms of functioning of visceral systems*": Abstracts of reports. Saint-Petersburg: 2003. pp. 346.] In Russian
 13. Kovtunen A. Yu. Adaptatsionnye reaktsii u kur pri transportirovke i shumovom vozdeystvii: dis. ... kand. biol. nauk. Belgorod, 2009. 135 pp. [Kovtunen AYU. Adaptable reactions in chickens during transport and noise levels [CandSci dissertation]. Belgorod: Belgorod State Agricultural Academy; 2009. 135 p.] In Russian
 14. Garkavi L.Kh., Kvakina E.B., Kuz'menko T.S. Antistressornye reaktsii i aktivatsionnaya terapiya (Reaktsiya aktivatsii kak put' k zdorov'yu cherez protsessy samoorganizatsii). M.: IMEDIS, 1998. 656 PP. [Garkavi LKh, Kvakina EB, Kuzmenko TS. Anti-stress reaction, and activation therapy (Reaction activation as a way to health through processes of self-organization). Moscow: IMEDIS; 1998. 656 p.] In Russian
 15. Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh : ucheb. posobie / pod red. N.N. Karkishchenko, S.V. Gracheva. M.: Izd-vo «Profil'-2S», 2010. 358 pp. Guidelines on laboratory animals and alternative models in biomedical research: a Training manual / Ed. by NN. Karkischenko, SV. Grachev. Moscow: Profile-2C; 2010. 358 p.] In Russian
 16. Zamoshchina T.A., Meleshko M.V. Ritmomoduliruyushchie svoystva litiya oksibutirata na fone elektroliticheskogo razrusheniya pravogo suprakhiatzmaticheskogo yadra gipotalamusa. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2005. No 1. PP. 13-16. [Zamoshchina TA, Meleshko MV. The rhythm-modulant effect of lithium hydroxybutyrate on the background of electrolytic lesion of the right suprachiasmatic nucleus of hypothalamus. *Experimental and clinical pharmacology*. 2005;1:13-16.] In Russian
 17. Sel'e G. Stress bez distressa. M.: Progress, 1979. 126 pp. [Selye G. Stress without distress. Moscow: Progress, 1979. 126 p.] In Russian
 18. Kolesnikova L.A., Os'kina I.N. Kotsentratsiya kortikosterona v krovi i leykotsitarnaya formula pri izuchenii stressa u serykh kryss s razlichnymi tipami povedeniya. Izvestiya AN. Ser. Biologicheskaya. Fiziologiya zivotnykh i cheloveka. 2003. No 1. PP. 88-92. [Kolesnikova LA, Oskina IN. Blood corticosterone concentration and differential blood-count in stressed Norway rats with different modes of behavior. *Izvestia of Russian Academy of Sciences Biological Series*. 2003;1:88-92.] In Russian

19. Panin L.E. Biokhimicheskie mekhanizmy stressa. Novosibirsk: Nauka, 1983, 243 pp. [Panin L.E. Biochemical mechanisms of stress. Novosibirsk: Nauka; 1983, 243 p.] In Russian
20. Kravchenko I.N., Khokhlova O.N., Kravchenko N.N. i dr. Gematologicheskie pokazateli svobodnykh ot patogennoy flory krysy CD (SPRAGUE-DAWLEY) i myshey CD-1 v norme. *Biomeditsina*. 2008. No 2. PP. 20-30. [Kravchenko I.N., Khokhlova O.N., Kravchenko N.N. et al. Hematological indices free from pathogenic flora rats CD (SPRAGUE-DAWLEY) and mice CD-1 in the norm. *Biomedicine*. 2008;2:20-30.] In Russian
21. Lakin G.F. Biometriya: uchebnoe posobie dlya biol. spets. vuzov. M.: Vysshaya shkola, 1990. 352 pp. [Lakin G.F. Biometrics: a training manual for biol. spec. universities. Moscow: Higher school; 1990. 352 p.] In Russian
22. Beker R. Funktsional'noe issledovanie vegetativnoy nervnoy sistemy. URL: <http://www.sisibol.ru/issled/351.shtml> (24.11.2012). [Becker R. Functional studies of autonomic nervous system. URL: <http://www.sisibol.ru/issled/351.shtml> (accessed on 24 Nov 2012).] In Russian
23. Raginene I.G. Zavisimost' funktsional'nogo sostoyaniya immunoj sistemy ot iskhodnogo vegetativnogo tonusa organizma: dis. ... kand. med. nauk. Tomsk, 2003. 110 pp. [Raginene I.G. The dependence of the functional condition of the immune system from source vegetative tonus of the organism [CandSci dissertation]. Tomsk: Siberian State Medical University; 2003. 110 p.] In Russian
24. Zhang R, Jankord R, Flak J et al. Role of Glucocorticoids in Tuning Hindbrain Stress Integration. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(44):14907-14914.
25. Zamoshchina TA, Saratkov AS, Lishmanov YuB. Effect of lithium hydroxybutyrate on circadian rhythms of brain serotonin content and plasma corticosteroids in reserpine-treated mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1997 July; 124(1):709-712
26. Apchel V.Ya., Tsygan V.N. Stress i stressustoychivost' cheloveka. SPb.: Pravda, 1999. 86 pp. [Apchel V.Ya., Tsygan V.N. Stress and stress resistance person. Saint-Petersburg: Pravda; 1999. 86 p.] In Russian
27. Gridneva V.I. Znachenie iskhodnogo urovnya pokazateley zheludochnoj sekretsii dlya reaktivnosti sekretornogo apparata zheludka v otvet na deystvie vozmushchayushchikh faktorov. *Doklady Akademii nauk Vysshey shkoly Rossii*. 2004, No 2(3). PP. 106-118. [Gridneva V.I. The value of the initial level of rates of gastric secretion for reactivity secretory apparatus of the stomach in response to the disturbing factors. *Reports of Academy of Sciences of Higher school of Russia*. 2004;2(3):106-118.] In Russian