

ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРЫС, НАХОДЯЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ХРОНИЧЕСКОГО И ОСТРОГО СТРЕССА

М. Ю. Раваева, Е. Н. Чуян, Е. А. Бирюкова, Р. Н. Аблаева, С. Н. Файчак

*ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»,
Таврическая Академия, Симферополь, Россия; ravaevam@yandex.ru*

Исследование направлено на решение актуальной фундаментальной проблемы, связанной с установлением механизмов адаптации тканевой микрогемодинамики животных к условиям острого и хронического стресса. С помощью лазерной доплеровской флоуметрии установлено, что в ответную реакцию микроуacula кожи крыс на сочетанное действие стресс-факторов включаются все регуляторные механизмы, как сосудистого, так и внесосудистого генеза. Показано, что комбинация хронического и острого стресса способствует нивелированию развития гиперемии, сопровождающей изолированное действие острого стресса.

Ключевые слова: лазерная доплеровская флоуметрия, микроциркуляция, хронический и острый стресс, адаптация.

Введение

В современных условиях человек находится под постоянным давлением социально-значимых факторов, техногенной загрязненности и все более ускоряющегося темпа жизни. По мнению многих авторов [1, 2], именно это давление, которое по своей сути является стрессом, лежит в основе так называемых болезней цивилизации. Обращает на себя внимание, что в основе патогенеза большинства заболеваний современности лежит нарушение микроциркуляции и, как следствие – накопление продуктов окисления и повреждающих ткани свободных радикалов.

Действительно, любые физиологические и патологические процессы в организме всегда происходят при участии микроциркуляторной системы. Микроциркуляция является не только структурно-функциональной единицей системы кровообращения, обеспечивающей обмен между кровью и тканями, но и важнейшим источником информации о состоянии организма в целом. Это позволяет использовать параметры микрогемодинамики в качестве интегрального показателя в оценке общего функционального состояния организма при различных видах воздействий, в том числе и стрессе, поскольку они отражают общие тенденции адаптивной перестройки кровообращения.

На сегодняшний день не сформировано единого мнения о механизмах реакции микроциркуляции на действие различных стрессоров. В наших предыдущих исследованиях [3, 4] были изучены реакции микроциркуляции на хронический гипокинетический стресс и выявлены нейроиммунноэндокринные механизмы развития стресс-реакции в организме, однако до сих пор не исследована реакция тканевой микрогемодинамики на комбинированное действие хронического и острого стресса, что и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы выполнялась на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики КФУ имени В.И. Вернадского.

Исследование проведено в соответствии с ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований [5].

Эксперимент проводился на 36 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 190-210 грамм, которые содержались в стандартных условиях вивария с естественным 12-часовым свето-темновым режимом, при температуре 18 - 22°C, со свободным доступом к воде и полноценному гранулированному корму [15].

После предварительного отбора животных разделили на 3 группы по 12 особей в каждой. Животные, находящиеся в первой группе, являлись биологическим контролем и находились в обычных условиях вивария; животные второй группы подвергались изолированному действию острого стресса (ОС) (10-12 сутки эксперимента). Животные третьей группы подвергались последовательному воздействию хронического гипокинетического (1-10 сутки эксперимента), а затем действию острого стресса (10-12 сутки) (ГК-ОС).

Хронический стресс моделировался ограничением подвижности, (гипокинезией, ГК), что достигалось помещением крыс в специальные кассеты из оргстекла (140 × 60 × 60 мм для каждой крысы), в которых они находились в течение 10-ти суток по 20 часов. В течение 4-х остальных часов проводили экспериментальные исследования, кормление и уход за животными.

Стресс-реакция была индуцирована в модели теста вынужденного плавания, методика моделирования которого подробно описана в [6]. При этом животных помещали в бассейн (уровень воды – 30 см, температура воды +20°C), где они находились в течение 60 мин без возможности выбраться из воды. За 24 часа до стрессорного воздействия животные были лишены пищи при свободном доступе к воде.

ЛДФ-метрию проводили при помощи лазерного анализатора кровотока «Лазма-МЦ» во втором исполнении (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 2.20.0.507WL. Методика ЛДФ-метрии подробно описана в статье [6].

В качестве параметров, анализируемых методом ЛДФ, регистрировали неосцилляторные показатели базального кровотока: показатель перфузии (ПМ, перф. ед.), среднее квадратичное отклонение (флакс, СКО, перф. ед.), коэффициент вариации (КВ, %) [7, 8]. С помощью вейвлет-анализа ЛДФ-сигнала определяли амплитуды колебаний кровотока разных частотных диапазонов. Наиболее низкая частота (0,0095-0,02 Гц) характерна для эндотелиальных колебаний, обусловленных периодическими сокращениями цитоскелета эндотелиоцитов. Эндотелиальные колебания отражают воздействие гуморально-метаболических факторов на микрососудистое русло и характеризуют состояние нутритивного кровотока [8]. Колебания в частотах 0,07-0,15 Гц, или миогенные колебания, обусловлены периодической активностью гладкомышечных волокон артериол, приводящих к изменению диаметра их просвета (вазомоции) [8]. На такую периодичность констрикции и дилатации микрососудов накладываются нейрогенные колебания (0,02-0,046 Гц), отражающие симпатическую регуляторную активность [9]. К высокочастотным колебаниям относятся дыхательные (0,15-0,4 Гц) и пульсовые (0,8-0,16 Гц). Дыхательные волны представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки [8]. Пульсовые колебания

кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [8].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета STATISTICA-8.0. Так как распределение значений переменных отличалось от нормального, то оценка достоверности межгрупповых различий проводилась с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$. При представлении результатов использовался коэффициент эффективности (КЭ), который вычислялся по формуле:

$$КЭ = (ХГК-ОС * 100 / ХК) - 100$$

где ХГК-ОС – значение изученного показателя в группе животных, которые до экспериментального воздействия ОС подвергались предварительному действию ГК.

Результаты исследования и их обсуждение

Как показали результаты проведенного исследования, у животных контрольной группы в течение 13 суток исследования достоверных изменений неосцилляторных и осцилляторных показателей микроциркуляции (Мц) не происходило. В тоже время, у животных, находящихся в условиях экспериментальной ГК, наблюдались изменения микроциркуляторных показателей, причем степень изменений зависела от продолжительности ГК (рис. 1).

Максимальные изменения Мц происходили на 10 сутки ГК, что выражалось в снижении эндотелиальных ритмов (Аэ) на 19 % ($p \leq 0,05$), нейрогенных амплитуд (Ан) – на 20 %, амплитуд миогенных ритмов (Ам) – на 19 % ($p \leq 0,05$), по отношению к контролю.

Поскольку известно, что амплитуды эндотелиального генеза (Аэ) синхронизированы с периодическим релизингом оксида азота (NO) эндотелием сосудов [7], то снижение данного показателя свидетельствует об уменьшении метаболической активности эндотелия и уменьшение базального уровня секреции NO.

Нейрогенные колебания (Ан) связаны с симпатическими адренергическими влияниями на гладкие мышцы артериол и артериолярных участков артерио-венулярных анастомозов [8, 9]. Снижение Ан свидетельствует о выраженной активации симпатических вазомоторных волокон, при этом симпатическая импульсация усиливается, приводя к увеличению нейрогенного компонента артериолярного тонуса и возрастанию жесткости сосудистой стенки.

Миогенные осцилляции (Ам) обусловлены пейсмекерной активностью прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол [10] и отражают колебания концентрации ионов Ca^{2+} через мембраны мышечных клеток [10, 11]. Следовательно, снижение Ам свидетельствует о повышении тонуса прекапилляров, обусловленном нарушением кальциевого трансмембранного обмена.

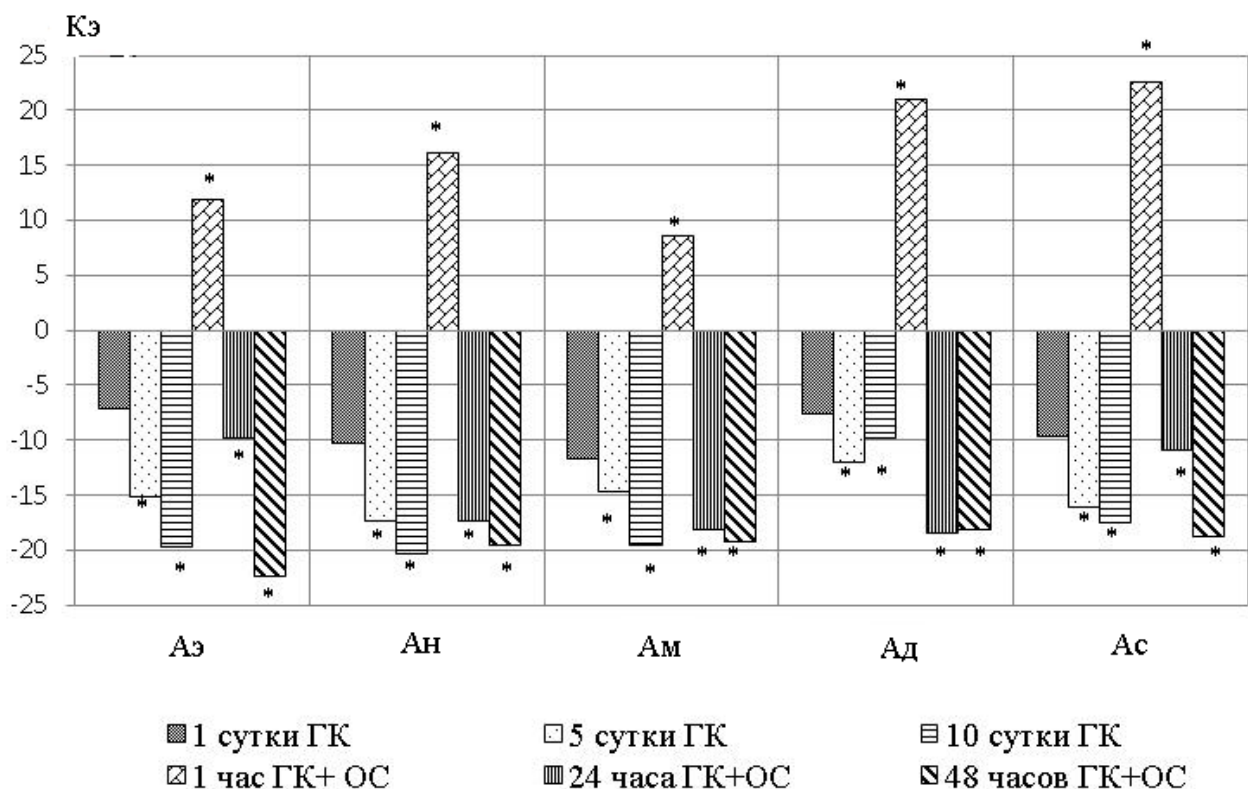
Кроме сосудистых компонентов регуляции Мц, после пятисуточной ГК снижались и внесосудистые. Так, амплитуда дыхательных ритмов (Ад), которые связаны с дыхательной модуляцией венулярного кровотока и с респираторными влияниями на вегетативное обеспечение деятельности сердца [10] снизилась на 9 % ($p \leq 0,05$), а сердечных (Ас), которые отражают перфузионное давление в микрососудах и обусловлены как сердечным выбросом, перепадами систолического и диастолического давления, так и влиянием посткапиллярного сопротивления [10] – на 17,5 % ($p \leq 0,05$). Следовательно, снижение данных показателей отражает уменьшение объема притока артериальной крови в микроциркуляторное русло со стороны магистральных сосудов, модулируемый пульсовой волной, и снижение кровенаполнения в венулярном звене микроциркуляции и развитие застойных явлений.

Снижение показателей активности сосудистых и внесосудистых компонентов регуляции отражалось в снижении интегральных показателей перфузии тканевого кровотока: показателя микроциркуляции (ПМ) и среднего квадратичного отклонения (СКО) уменьшились на 40 % ($p \leq 0,05$), а коэффициент вариации (Кв) – на 33,4% ($p \leq 0,05$). Поскольку известно, что ПМ отражает усредненную величину перфузии в капиллярах, артериолах и венах [8], СКО – среднюю модуляцию кровотока во всех частотных диапазонах, а Кв указывает на процентный вклад вазомоторного компонента в общую модуляцию тканевого кровотока [8], то можно заключить, что при ГК стрессе уменьшался кровоток в тканях.

Таким образом, 10-тисуточная ГК приводила к нарушению регуляции тканевой микроциркуляции на всех уровнях, что отражалось в развитии вазоконстрикции, нарушении притока и оттока крови и доминировании шунтового кровотока, уменьшении количества функционирующих капилляров.

В тоже время, у животных при изолированном действии ОС, спустя один час после моделирования острого стресса, зарегистрировано повышение осцилляторных и неосцилляторных показателей: наиболее существенно увеличивались амплитуды колебаний эндотелиального (Аэ, на 57 %, $p \leq 0,01$), нейрогенного (Ан, на 57 %, $p \leq 0,01$), миогенного (Ам, на 69 %, $p \leq 0,01$) ритмов, а также увеличились амплитуды дыхательных (Ад, на 25 %, $p \leq 0,05$) и пульсовых колебаний (Ас, на 27 %, $p \leq 0,05$), ПМ на 49 %, ($p \leq 0,05$) и снижение Кв (на 35 %; $p \leq 0,05$) по отношению к таковым в контрольной группе животных.

Таким образом, при ОС в микрорусле снижается тонус сосудов, что приводит к увеличению притока крови на фоне нарушения венозного оттока.



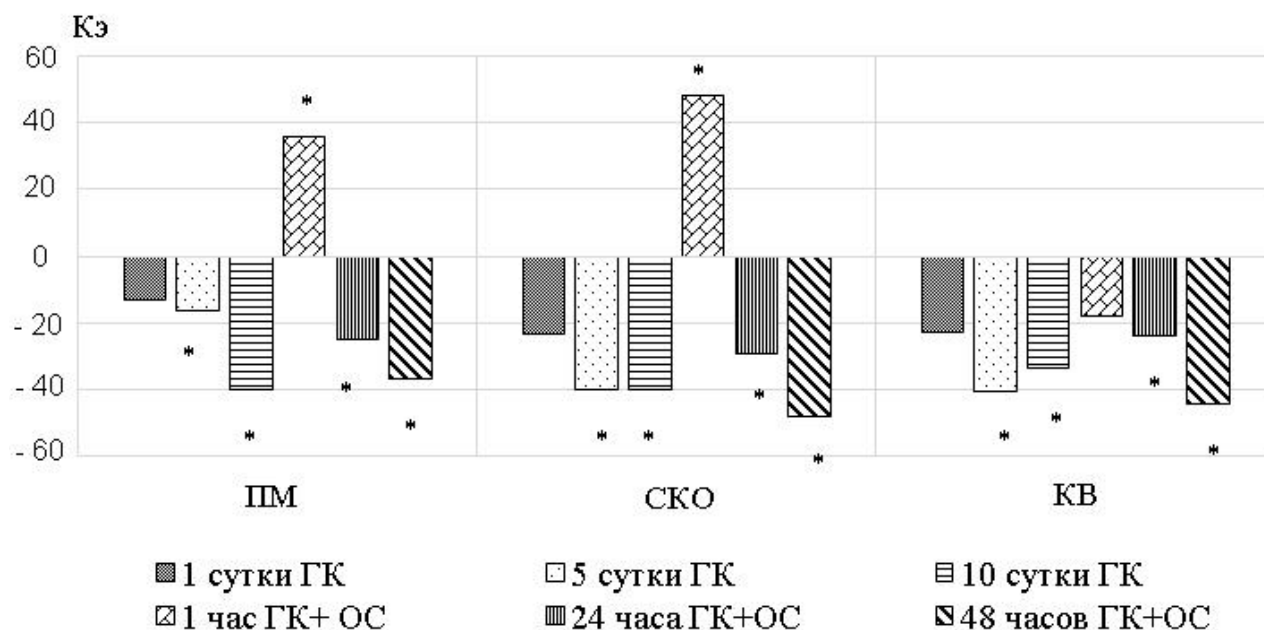


Рис. 1. Показатели микроциркуляции (Кэ) при последовательном действии хронического и острого стресса.

Примечание: * - достоверность различий показателей по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Результаты настоящего исследования показали, что в результате последовательного действия хронического и острого стрессоров (рис. 1), через 1 час после экспериментального моделирования острого стресса у крыс наблюдалось достоверное увеличение осцилляторных и неосцилляторных показателей по сравнению с биологическим контролем: показатель Аэ увеличился на 12% ($p \leq 0,05$), Аи – на 16,6% ($p \leq 0,05$), Ам – на 8,5 % ($p \leq 0,05$), Ад – на 21% ($p \leq 0,05$), Ас – на 23% ($p \leq 0,05$), ПМ – на 36 % ($p \leq 0,05$), СКО – на 47,8% ($p \leq 0,05$), КВ уменьшился на 18 % ($p \leq 0,05$).

Таким образом, у животных, предварительно подвергавшихся хроническому гипокинетическому стрессу, реакция Мц на действие острого стресса имела фазный характер: через 1 час развивалась вазодилатация, как и при изолированном действии ОС, однако данный эффект был менее выражен. В последующие сутки (через 24 и 48 часов после ОС) в микрорусле развивалась вазоконстрикция, поскольку показатели микроциркуляции приближались к показателям, зарегистрированным на 10-е сутки ГК,

Можно заключить, что предварительное действие хронического ГК стресса приводит к истощению адаптационного резерва и снижению адаптационного потенциала организма, что, как показано в настоящем исследовании, и проявилось в развитии вазоконстрикции (на 11-12 сутки эксперимента). Подобные результаты были получены и в исследованиях [12], которые показали, что «предварительная экспозиция хронического комбинированного стрессорного воздействия, по-видимому, приводит скорее к истощению способностей противостоять последующим стрессорным воздействиям... в тесте вынужденного плавания».

Вероятно, в условиях последовательного сочетания хронического и острого стресса, использованного в настоящем исследовании, интенсивная мобилизация ресурсов при гипокинезии истощается при предъявлении нового стимула в виде острого стресса, что приводит к прогрессивному снижению адаптационного потенциала организма.

Информация о финансировании

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Совета Министров Республики Крым в рамках научного проекта № 18-44-910008 p_a.

Литература

1. Sikter A. New aspects in the pathomechanism of diseases of civilization, particularly psychosomatic disorders. Part 1. Theoretical background of a hypothesis / A. Sikter, Z. Rihmer, R. Guevara // *Neuropsychopharmacol Hung.* – 2017. – Vol. 19, No 2. – P. 95-105.

2. Lahelma E. Multiple roles and health among British and Finnish women: the influence of socioeconomic circumstances / E. Lahelma, S. Arber, K. Kivelä, E. Roos // *SocSci Med.* – 2002. – Vol. 54, No 5. – P. 727-40.

3. Чуян Е.Н. Механизмы вазопротекторного действия электромагнитного излучения крайне высокой частоты в условиях хронического гипокинетического стресса / Е.Н. Чуян, М.Ю. Раваева // *Биомедицинская радиоэлектроника.* – 2017. – № 3. – С. 55-65.

4. Чуян Е.Н. Гипокинетический стресс влияет на межполушарную асимметрию метаболических процессов мозга крыс / Чуян Е.Н., Раваева М.Ю. // *Образование и наука: современные тренды Коллективная монография. Сер. "Научно-методическая библиотека".* – 2016. – С. 38-49.

5. ГОСТ Р–53434–2009 Принципы надлежащей лабораторной практики. – <http://internet-law.ru/gosts/gost/48600/>

6. Раваева М.Ю. Тканевая микрогемодинамика животных в условиях острого стресса / М.Ю. Раваева, Е.Н. Чуян, А.В. Пивоварчук, В.В. Колесник // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского Биология. Химия.* – 2018. – Т.4(70), № 3. – С. 151–162.

7. Kvandal P. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines. / Kvandal P., Stefanovska A., Veber M. // *Microvascular Research.* – 2003. – P. 160-171.

8. Крупаткин, А. И. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: руководство для врачей. / А. И. Крупаткин, В. В. Сидоров. – М.: Медицина, 2005. – 254 с.

9. Schmid – Schonbein H. Synergetic interpretation of patterned vasomotor activity in microvascular perfusion: discrete effects of myogenic and neurogenic vasoconstriction as well as arterial and venous pressure fluctuations / H. Schmid – Schonbein, S. Ziege, R. Grebe // *Int. J. Microcir.* – 1997. – №17. – P. 346-359.

10. Stefanovska A. Physics of the human cardiovascular system / A. Stefanovska // *Contemporary Physics.* – 1999. – Vol. 40. – №1. – P. 31-35.

11. Маколкин В.И. Метод лазерной доплеровской флоуметрии в кардиологии / В.И. Маколкин, В.В. Бранько, С.А. Богданова. // *Пособие для врачей.* – М.: Россельхозакадемия. – 1999. – 48 с.

12. Степаничев М. Ю. Эффекты хронического комбинированного стресса: изменения поведения крыс с разной реакцией на новизну / М. Ю. Степаничев, А. О. Тишкина, М. Р. Новикова, И. П. Левшина, А. К. Пискунов, Н. А. Лазарева, Н. В. Гуляева // *Журнал высшей нервной деятельности.* – 2016. – Т. 66, № 5. – С. 611–625.

**PARAMETERS OF RATS MICROCIRCULATION UNDER CHRONIC AND ACUTE
STRESS COMBINED ACTION**

Ravaeva M. Yu.¹, Chuyan E. N.¹, Birukova E. A.¹, Ablaeva R. N.¹, Faichuk S. N.¹

1 – Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky, Taurian Academy, Simferopol, Russia; ravaevam@yandex.ru

Abstract. The study is aimed at solving the urgent fundamental problem associated with the establishment of animals' tissue microhemodynamics adaptation mechanisms to acute and chronic stress. By laser Doppler flowmetry it was found that regulatory mechanisms rat skin microfoil on stress factors combined effect included vascular and extravascular genesis sponse. The chronic and acute stress combination decreased of acute stress isolated effect hyperemia was found.

Key words: laser doppler flowmetry, microcirculation, chronic and acute stress, adaptation.

References

1. Sikter A., Rihmer Z, Guevara R. New aspects in the pathomechanism of diseases of civilization, particularly psychosomatic disorders. Part 1. Theoretical background of a hypothesis, *Neuropsychopharmacol Hung.*, 19 (2) 2017.
2. Lahelma E. Arber S, Kivelä K, Roos E Multiple roles and health among British and Finnish women: the influence of socioeconomic circumstances, *SocSci Med.*, 54 (5), (2002).
3. Chuyan Ye.N. Ravayeva M.YU. Mekhanizmy vazoprotektornogo deystviya elektromagnitnogo izlucheniya krayne vysokoy chastoty v usloviyakh khronicheskogo gipokineticheskogo stressa, *Biomeditsinskaya radioelektronika*, 3 (2017).
4. Chuyan Ye.N., M.YU. Ravayeva Gipokineticheskiy stress vliyayet na mezhpolusharnuyu asimmetriyu metabolicheskikh protsessov mozga krys *Obrazovaniye i nauka: sovremennyye trendy Kollektivnaya monografiya. Ser. "Nauchno-metodicheskaya biblioteka"*, (2016).
5. GOST R–53434–2009 Printsipy nadlezhashchey laboratornoy praktiki. – <http://internet-law.ru/gosts/gost/48600/>
6. Ravayeva M.YU., Chuyan Ye.N., Pivovarchuk A.V., Kolesnik V.V. Tkaneyaya mikrogemodinamika zhivotnykh v usloviyakh ostrogo stressa, *Uchenyye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo Biologiya. Khimiya*, 4 (70), 3 (2018).
7. Kvandal P., Stefanovska A., Veber M. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostangladines, *Microvascular Research*. (2003).
8. Krupatkin, A.I., Sidorov V.V. Lazernaya dopplerovskaya floumetriya mikrotsirkulyatsii krovi: rukovodstvo dlya vrachey. *M.: Meditsina*, (2005).
9. Schmid – Schonbein H., Ziege S., Grebe R .Synergetic interpretation of patterned vasomotor activity in microvascular perfusion: discrete effects of myogenic and neurogenic vasoconstriction as well as arterial and venous pressure fluctuations, *Int. J. Microcir.* 17 (1997).
10. Stefanovska A. Bran'ko V.V., Bogdanova Ê.A. Physics of the human cardiovascular system, *Contemporary Physics.*, 40. (1999).
11. Makolkin V.I. Metod lazernoy dopplerovskoy floumetrii v kardiologii. Posobiye dlya vrachey, (*M., Rossel'khozakademiya*, 1999), p. 48.
12. Stepanichev M. YU., Tishkina A. O., Novikova M. R., Levshina I. P., Piskunov A. K., Lazareva N. A., Gulyayeva N. V. Effekty khronicheskogo kombinirovannogo stressa: izmeneniya povedeniya krys s raznoy reaktsiyey na noviznu, *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti*, 66 (2016).