

УДК 599.323.45:57.033

## ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ КРЫС НА УРОВЕНЬ ДОФАМИНА И ТРИБУЛИНОВОЙ АКТИВНОСТИ МОЧИ

*Т. В. Сирецкая, А. В. Еньшин, Д. Г. Петров, А. И. Ерофеев*

Исследовано изменение показателей мочи крыс — уровень дофамина и трибулиновой активности — после краткосрочного иммобилизационного стресса в раннем и отсроченном периодах. Показано, что реакция организма на иммобилизацию в ранний период (через 1 ч) в целом носила характер типичной стрессовой реакции — увеличение уровня дофамина и трибулиновой активности в порционной моче, а направленность изменений указанных показателей через сутки отражает индивидуальные особенности приспособительной реакции животных к стрессу.

**Ключевые слова:** иммобилизационный стресс, катехоламины, трибулиновая активность, компенсаторные реакции.

**Keywords:** immobilized stress, catecholamine, tribulane activity, compensatory reactions.

### Введение

Основными маркерами стресса являются катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин) и их метаболиты (метанефрин, норметанефрин, гомованиловая кислота). Контроль содержания этих компонентов в биологических жидкостях (спинномозговой жидкости, крови, моче, слюне) позволяет диагностировать состояние острого и хронического стресса и контролировать восстановление организма после стресса [1].

Центральную роль в метаболизме катехоламинов играет моноаминоксидаза (МАО) разного типа. Важным регулятором активности моноаминоксидаз является фракция эндогенных ингибиторов МАО, известных под названием «трибулины» [2]. В состав ингибиторов входит несколько веществ, влияющих на активность МАО разного типа. Так, изатин (2,4-диоксоиндол) ингибирует МАО-Б, для которой субстратом является бензиламин.

При различных видах стресса в тканях и биологических жидкостях обнаружено существенное увеличение трибулинов (трибулиновая активность мочи – ТАМ) [3]. Ранее было установлено, что содержание этого ингибитора в моче увеличивается в состоянии эмоционального стресса и тревоги [4]. Причем изменение ТАМ и тканей установлено и при холодовом, и при иммобилизационном стрессах. Согласно исследованию, проведенному Tozawa, содержание изатина при холодовом стрессе (от 2

до 48 ч) в суточной моче увеличивается в 2–3 раза, однако на другой день этот же показатель падает со значением ниже исходного уровня [5]. Важно подчеркнуть, что изменение активности МАО в биожидкости и ткани должно влиять на содержание в них дофамина. Высказаны [6] предположения о том, что дофаминергическая передача реципрочно связана с деградацией медиатора моноаминоксидазой, т. е. чем активнее МАО, тем ниже эффективность дофаминергической системы мозга. Соотношение активности МАО (по значению ТАМ) и уровень дофамина в крови и моче исследованы, например, в работе К. А. Бабина и др. [7]. Однако в целом данные о динамике ТАМ и содержании дофамина после окончания стресса в краткосрочном периоде представлены в литературе недостаточно полно. Эти данные дают информацию о скорости восстановления функционального состояния экспериментальных животных после стресса, что особенно важно при оценке состояния человека в экстремальных ситуациях.

В связи с этим цель работы — анализ характера изменения показателей стресс-реакции сразу после окончания иммобилизационного стресса и через сутки. В качестве маркеров стресса были выбраны трибулиновая активность порционной мочи и содержание в ней дофамина. Необходимость анализа порционной мочи объясняется тем, что анализ суточной мочи показывает общее количество поступившего в мочу соединения (например, до-

фамина), однако он не отражает динамики поступления анализируемого соединения. Исследование закономерностей ранних постстрессорных изменений показателей порционной мочи дает информацию о динамике компенсаторных процессов в постстрессорный период.

## Материалы и методы

Исследования проведены на восьми половозрелых самцах крыс массой 250–300 г линии ВД9. Все животные до начала эксперимента содержались в одинаковых условиях с обычной сменой светового режима без ограничений в пище и воде. Характер и режим питания в ходе опытов в различных группах не изменялись. Температура содержания лабораторных животных — +22...+24 °С. Условия стресса моделировали путем фиксирования животных в течение 30 мин в клетке-пенале в вертикальном положении с полным исключением любой двигательной активности. Манипуляции по проведению иммобилизационного стресса и отбору проб мочи проводились в утренние часы (с 9:30 до 11:00). После окончания иммобилизации животное извлекали из клетки-пенала и ему выполняли нейролептаналгезию рометаром 2 % (Spofa, Praha, в дозе 2 мг/100 г) и золетилом 50 (Virbac, France, в дозе 1 мг/100 г). Для отбора порционной пробы мочи животное помещали на решетчатую площадку в горизонтальном положении, мочу собирали самотеком в специальные емкости, находящиеся под животным. Отобранные пробы мочи (до 2 мл) консервировали в 0,5 мл 0,5% раствора соляной кислоты с последующим анализом (либо замораживали при температуре –20 °С). Пробы мочи брали через 1 и 24 ч после иммобилизации.

ТАМ определяли по стандартной методике степени угнетения МАО-активности стандартизованного препарата митохондрий печени крыс [8], адаптированной нами для исследований на спектрофотометре Nanodrop 1000 Spectrophotometer в режиме ProteinA280 (Thermo Scientific), который позволяет измерять оптическую плотность в капле объемом более 1 мкл. В качестве субстрата для МАО использовали бензиламина гидрохлорид, о дезаминировании которого судили по уменьшению интенсивности полосы поглощения при длине волны 254 нм. Для измерения в пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл помещали биологическую жидкость (взвесь митохондрий или мочу) — 800 мкл, 1 Н К-На-фосфатный буфер — 500 мкл (рН 7,4). Пробы инкубировали в термостате 30 мин при 37 °С, затем добавляли 100 мкл субстрата (раствор бензиламина в буфере 1:50), измерения проводили сразу после добавления субстрата и через 60 мин. Трибулиновую активность мочи рассчитывали по формуле

$$\text{ТАМ} = (1 - \text{МАО}_{\text{опыт}} / \text{МАО}_{\text{контроль}}) 100 \%, \quad (1)$$

где  $\text{МАО}_{\text{опыт}}$  и  $\text{МАО}_{\text{контроль}}$  — активности МАО анализируемых проб с добавлением мочи и без добавления мочи.

Содержание дофамина в моче оценивали по методике спектрофлуориметрического определения катехоламинов в биологических жидкостях, представленной в работе [9] и адаптированной нами для жидкостного хроматографа LC 1260 с флуориметрическим детектором (AgilentTech, Inc., США). Пробоподготовка осуществлялась методом твердофазной экстракции. Для выделения дофамина из пробы использовали картриджи с фенилборной кислотой BondElutPBA объемом 10 мл. Скорость потока через картридж на протяжении всей процедуры не превышала 1 мл/мин. Массовую концентрацию дофамина определяли методом внешнего стандарта по площади соответствующего пика на хроматограмме. Идентификацию дофамина производили по времени удерживания. Концентрация рабочего калибровочного раствора составляла 180 нг/мл.

Достоверность изменений катехоламинов проверяли с помощью непараметрического критерия Уилкоксона (Wilcoxon) для двух несвязанных выборок при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Данные представлены в виде средних значений и их ошибок.

## Результаты

Показано, что через 1 ч после иммобилизации у всех животных рассчитанная трибулиновая активность увеличивается с 10,4 до 24,1 % (в среднем в 2,4 раза), что указывает на снижение активности фермента МАО.

Однако через 24 ч проявляются разнонаправленные изменения — у 60 % особей значение ТАМ снижается и в среднем составляет 18,2 %, а превышение относительно фона составляет только 74 %, т. е. трибулиновая активность имеет тенденцию к нормализации, тогда как у 40 % животных, наоборот, происходит активация МАО, что отражается на значениях ТАМ — они становятся отрицательными.

Одновременно в порционной моче была измерена концентрация дофамина. В таблице представлены данные по анализу дофамина и ТАМ в порционной моче после иммобилизации животного через 1 и 24 ч. Установлено, что по этому показателю и закономерностям его изменения после иммобилизационного стресса животных также можно разделить на две группы.

Группу 1 составили животные с изначально низким содержанием ДА ( $16,0 \pm 2,6$  нг/мл), иммобилизация которых сопровождалась увеличением в 10 раз количества ДА в моче через 1 ч после стресса с сохранением повышенного значения (в среднем до 8 раз) через 24 ч. Соответствующие индивидуальные значения ТАМ имели положительное значение выше фонового, т. е. стресс сопровождался ингибированием МАО.

У группы 2 животных при более высоком, чем в группе 1 значении уровня ДА стресс не вызывал резкого увеличения содержания ДА (не более чем в 2 раза) либо количество ДА уменьшалось в моче через 1 ч и значительно падало через 24 ч, при этом активность МАО

| Динамика изменения уровня дофамина (ДА) и трибулиновой активности мочи крыс (ТАМ) |                  |               |  |
|---|------------------|---------------|--|
| Показатель  | Контроль (n = 8) | Через 1 ч     | Через 24 ч                               |
| ДА, нг/мл:  |                  |               |  |
| 1-я группа (n = 4)  | 16,0 ± 2,6       | 153,3 ± 18,0* | 91,0 ± 8,3*                              |
| 2-я группа (n = 4)  | 60,3 ± 15,0      | 65,0 ± 15,0** | 18,5 ± 1,7*                              |
| ТАМ, %  | 10,4 ± 1,4       | 24,1 ± 1,9    | 18,2 ± 2,5 (n = 5)<br>-7,4 ± 4,1 (n = 3) |
| * p ≤ 0,05. ** p ≥ 0,05.  |                  |               |  |

возрастала, так как именно у этих животных ТАМ имела отрицательные значения (рисунок).

Таким образом, показано, что через 24 ч восстановления исходных показателей у всех животных, подвергнутых кратковременному стрессу, не происходит. Более того, наблюдается различная направленность изменения уровней ДА и ТАМ у разных животных в двух группах.

Разнонаправленность биохимических показателей у животных в ответ на мягкий хронический стресс ряд авторов связывают с различным поведенческим профилем биологических объектов (активные или пассивные) и генетически детерминированным исходным функциональным состоянием [10]. Выявленные разнонаправленные изменения ДА и ТАМ через сутки после краткосрочного иммобилизационного стресса также связаны с различным поведенческим профилем крыс, но проявляется он не сразу после воздействия иммобилизации, а через сутки.

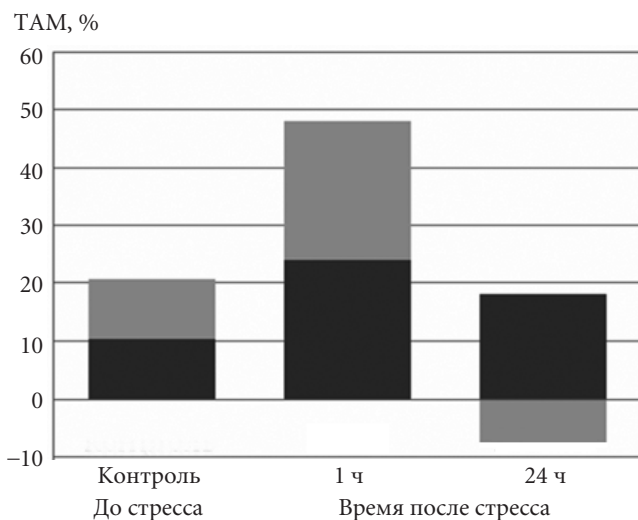
Как известно, развитие стресса проходит несколько стадий. На первой стадии активизируются все защитные механизмы, что отражается в однонаправленности реакций животных в ранний острый период после стресса (через 1 ч). Это приводит к росту содержания в моче ДА и увеличению ТАМ, следствием чего является уменьшение активности МАО у всех исследованных животных, но в разной степени. Далее запускаются компенсаторные ме-

ханизмы, которые в нашем случае выражаются не только в ингибировании активности МАО (положительные значения ТАМ), но и в активации МАО (отрицательные значения ТАМ), что, вероятно, отражает адаптацию нервной системы организма к новым условиям существования. За счет торможения активности фермента МАО в крови поддерживается высокое содержание циркулирующих катехоламинов, обеспечивающих комплекс защитных и компенсаторных реакций при стрессе.

## Заключение

Показано, что реакция экспериментальных животных на иммобилизацию в ранний период (через 1 ч) после стресса в целом носит характер типичной защитной реакции — увеличение уровня дофамина в порционной моче и уменьшение активности МАО, выраженной в увеличении трибулиновой активности. Через сутки после окончания иммобилизации исследованные показатели мочи не восстанавливаются.

Исходя из характера изменения показателей мочи в отсроченный период можно сделать вывод, что в компенсаторных процессах, продолжающихся в течение суток, проявляются индивидуальные особенности протекания системных защитных реакций организма.



Изменение ТАМ после стресса:

■ — 1-я группа; ■ — 2-я группа

## Литература

1. Богданова И. В. Роль дофамина в механизмах формирования некоторых расстройств ЦНС и состояний зависимости: обзор литературы // Украинский вестник психоневрологии. 2011. Т. 19, вып. 2. С. 5–8.
2. Медведев А. Е. Эндогенный ингибитор моноаминооксидазы А (Трибулин А) из мозга: очистка и идентификация структуры // Биохимия. 1995. Т. 60, вып. 5. С. 659–666.
3. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M. Isatin: Role in stress and anxiety // Stress. 2005. Vol. 8, N 3. P. 175–183.
4. Волчегорский И. А., Хребтова А. Ю., Колесников О. Л. Показатели «трибулиновой» активности мочи как индикатор психологических особенностей и состояния гемодинамики // Физиология человека. 1998. Т. 24, № 4. С. 126–129.
5. Stress-induced increase in urinary isatin excretion in rats: Reversal by both dexamethasone and alpha-methyl-p-tyrosine / Y. Tozawa, A. Ueki, S. Manabe, K. Matsushima // Biochem Pharmacol. 1998. Vol. 56. P. 1041–1046.

6. Мидзяковская И. С. Концентрация дофамина и его метаболитов в структурах мозга крыс линии WAES/Rij и Вистар: сравнительный анализ аудигенной absence, эпилепсии и их смешанной формы // *Нейрохимия*. 2004. Т. 21, № 4. С. 254–260.

7. **Соотношение** между уровнем биогенных аминов, активностью тромбоцитарной MAO-B и свободнорадикальным окислением в условиях алкогольного делирия / К. А. Бабин, Д. Б. Виноградов, Б. В. Изаровский [и др.] // *Наркология*. 2013. № 3. С. 49–52.

8. Волчегорский И. А., Скобелева Н. А., Лифшиц Р. И. Модифицированный метод спектрофотометрического определения активности моноаминоксидаз с бензиламином в качестве субстрата // *Вопр. мед. химии*. 1991. № 1. С. 86–89.

9. **Huai You Wang, Yue Sun, Bo Tang**. Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluoremetry // *Talanta*. 2002. Vol. 57. P. 899–907.

10. **Эффекты** хронического мягкого стресса у крыс Вистар и Август: поведение и содержание моноаминов в стриатуме / Н. А. Крупина, Н. Н. Хлебникова, И. Н. Орлова [и др.] // *Патогенез*. 2012. Т. 10, № 2. С. 50–58.