

Эффекты хронического мягкого стресса у крыс Вистар и Август: поведение и содержание моноаминов в стриатуме

Крупина Н.А.¹, Хлебникова Н.Н.¹, Орлова И.Н.¹, Попкова Е.В.², Родина В.И.¹, Крыжановский Г.Н.¹

¹ — ФГБУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии» РАМН

² — ГБОУ ВПО МГМСУ Минздравсоцразвития России

Анализ изменений поведения крыс под влиянием хронического мягкого стресса (ХМС) выявил более высокую устойчивость животных популяции Август по сравнению с Вистар. У крыс Вистар ХМС приводил к снижению предпочтения сахарозы воде в тесте альтернативного выбора, замедлению нарастания массы тела в процессе стрессирования, небольшой психомоторной активации в тестах «открытого поля» и принудительного плавания без существенного изменения тревожности. По совокупности оценок, данные свидетельствуют о развитии у них признаков депрессивности и дезадаптации. У крыс Август, уровень тревожности которых на протяжении всего эксперимента был ниже, чем у Вистар, на фоне стресса выявлено только снижение ориентировочно-исследовательской деятельности в сочетании с усилением реакции на новизну по сравнению с контролем. Содержание моноаминов и их метаболитов оценивали в стриатуме. На фоне ХМС у крыс Август содержание ДА было выше, чем в контроле, но оборот ДА не изменялся. У крыс Вистар содержание катехоламинов, предшественника и метаболитов ДА в стриатуме на фоне стресса не изменялось, однако оборот ДА был увеличен. ХМС привел к снижению содержания 5-ОТ в стриатуме крыс Август и к увеличению содержания метаболита 5-ОТ у крыс Вистар, при этом оборот 5-ОТ был увеличен у крыс обеих популяций. Предполагается, что устойчивость крыс Август к острому и хроническому мягкому стрессу обеспечивается разными патофизиологическими механизмами, обусловленными различием в реактивности генетически детерминированных нейромедиаторных систем.

Ключевые слова: крысы Вистар и Август, хронический мягкий стресс, поведение, моноамины, стриатум

Введение

Реакция на стресс входит в обязательный репертуар поведенческого ответа при взаимодействии живого субъекта с окружающей средой. Стресс может оказывать двоякое действие — протекторное (адаптивное) или повреждающее, что является следствием соответственно активации либо гиперактивации целого ряда физиологических систем (нейроэндокринных, нейрогуморальных, нейромедиаторных и др.), взаиморегулирующих друг друга на реципрокной основе по многим путям — парасимпатическим, симпатическим, глюкокортикоидным, через активацию продукции цитокинов и изменение уровня моноаминов [10, 16, 18]. Адаптивные изменения в ответ на стресс включают поведенческий и физический аспекты, повреждающее действие хронического стрессирования также проявляется по двум направлениям — развитием психоневрологических нарушений и психосоматических расстройств [13, 16]. Конечный эффект стрессирования (стресс-реакция) определяется индивидуальной чувствительностью организма к действию стрессогенов, которая, в свою очередь, зависит от влияния эпигенетических факторов в раннем периоде развития и во взрослой жизни [11, 19, 22] и генетических факторов, действие которых лежит в основе формирования типологических особенностей реактивности ЦНС особи [14, 23].

Индивидуальная стресс-чувствительность организма во многом определяется генетически обусловленным состоянием так называемых стресс-лимитирующих систем, к которым относят в том числе дофаминергическую и серотонинергическую системы [5]. К числу структур, вовлеченных в регуляцию стресс-ответа, как правило, относят префронтальную кору, миндалину, гиппокамп, прилежа-

щее ядро [19]. Однако, по данным многих исследований, большая роль в организации стресс-ответа отводится стриатуму — одной из основных составляющих nigrostriатной дофамин (ДА)-ергической системы. Так, показано, что стресс разных видов вызывает существенные изменения в состоянии ДА-ергической системы в стриатуме у людей [17, 22] и крыс [7, 9].

К числу наиболее распространенных видов стресса относится хронический мягкий стресс (ХМС), вызываемый воздействием различных меняющихся факторов окружающей среды, которые характеризуются небольшой силой, однако действуют в течение длительного времени. Экспериментальная модель ХМС у грызунов [24] рассматривается как одна из наиболее адекватных моделей стрессогенного воздействия. Данные литературы свидетельствуют о том, что ХМС оказывает неодинаковый эффект на крыс разных линий по физиологическим, биохимическим показателям и по развитию гедонических нарушений [15, 20, 21, 25]. По результатам многолетних сравнительных исследований чувствительности крыс линий Август и Вистар к острому эмоциональному стрессу сформулирована концепция, предполагающая прямую связь устойчивости к повреждающему действию стресса с высокой активностью стресс-лимитирующих систем [5]. Представляло интерес провести изучение эффектов ХМС на поведение крыс этих линий в сопоставлении с изменениями катехоламинергических и серотонинергической систем в ЦНС.

Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ влияния ХМС на развитие эмоционально-поведенческих расстройств и состояние моноаминергических систем мозга в стриатуме у крыс Вистар и Август.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах популяции Август (39 животных) и популяции Вистар (48 животных) в возрасте 5–6 мес. с исходной массой 350–400 и 200–250 г соответственно. Крысы были выращены в виварии ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН в условиях группового содержания (по 6–7 животных в клетке). Эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР N755 от 12.08.1977) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения РФ №267 от 19.06.2003).

До начала исследования все животные прошли обследование в тесте «открытого поля» и по шкале для оценки тревожно-фобических состояний у крыс (описание методики см. ниже). По результатам обследований животные обеих популяций были разделены на контрольную и опытную группы таким образом, чтобы средние значения исходных показателей двигательной, исследовательской активности, уровня тревожности и массы тела в этих группах для крыс каждой популяции не различались. В ходе эксперимента животных контрольных ($n_{\text{Август}} = 20$ и $n_{\text{Вистар}} = 23$) и опытных ($n_{\text{Август}} = 19$ и $n_{\text{Вистар}} = 25$) групп содержали индивидуально в стандартных условиях вивария с естественной сменой светового цикла и свободным доступом к воде и корму (в течение всего эксперимента животные получали только сухой корм).

Хронический мягкий стресс (ХМС). Животных подопытных групп в течение 4 недель подвергали ежедневному действию сменяющихся слабых стрессорных факторов. За основу была взята классическая методика ХМС Уилнера [24], адаптированная к условиям и задачам нашего эксперимента. Суть метода ХМС состоит в том, что в течение определенного промежутка времени (обычно в

течение нескольких недель) крыс ежедневно подвергают действию мягких стрессогенных раздражителей, чередующихся в непредсказуемой для животных последовательности. Серия воздействий повторяется циклически. В данной работе ХМС проводили со 168-часовым (7-дневным) циклом смены раздражителей (табл. 1).

Определение двигательной и исследовательской активности у крыс в тесте «открытого поля» проводили по стандартной методике дважды: до начала стрессирования и через 3 недели ХМС. Диаметр поля, разделенного на квадраты со стороной 20 см, был равен 120 см, высота стенок составляла 28 см. Лампы накаливания (6 шт. по 60 Вт) располагались по кругу диаметром 60 см на высоте 80 см от поверхности поля. За 3 мин наблюдения при яркой освещенности оценивали суммарную двигательную активность по числу пройденных квадратов и исследовательскую активность по числу вертикальных стоек.

Оценка реакции на новизну. Реакцию на новизну определяли по отношению числа пересеченных квадратов в «открытом поле» за 4-ю минуту наблюдения при красном свете к их числу за 1-ю минуту при яркой освещенности.

Определение уровня тревожности. Использовали два способа оценки тревожности у крыс:

Определение латентности выхода крыс из центра «открытого поля». Измеряли латентный период выхода животного из четырёх центральных квадратов «открытого поля».

Комплексный многопараметровый метод оценки тревожно-фобических состояний у крыс (в баллах). Метод основан на количественной оценке изменения видоспецифических поведенческих ответов у крыс в батарее этологически адекватных тест-стимулов, моделирующих мягкое стрессогенное воздействие, провоцирующее проявление состояний тревожности и страха у животных [8]. В состав шкалы для оценки тревожно-фобических состо-

Таблица 1

Схема проведения хронического мягкого стресса

Воздействие	День недели						
	Вторник	Среда	Четверг	Пятница	Суббота	Воскресенье	Понедельник
Наклон клеток под углом 30°	10.00 – 17.00			10.00 – 17.00			
Искусственная освещенность в течение темного периода суток		17.00 – 11.00					
Мелькающий свет		11.00 – 17.00					
"Грязная клетка"		17.00 – 10.00					
Питьевая депривация			10.00 – 17.00				
Пустые поилки			17.00 – 10.00				
Воздействие резкого запаха и пищевая депривация					17.00 – 10.00		
"Тесная" клетка						10.00 – 10.00	

Примечание. Пищевая депривация — лишение пищи на 41 ч; питьевая депривация — лишение воды на 7 ч с последующим помещением в клетку пустых бутылочек на 17 ч; мелькающий свет (частота 5 Гц, в условиях затемнения) — на 5 ч; раздражающий новый запах — помещение в клетку деревянных кубиков с запахом дегтя (41 ч, совместно с пищевой депривацией); "грязная" клетка — в домашнюю клетку выливали 500 мл воды на 17 ч; наклон 30° — смена горизонтального положения клетки на угловое (2 раза по 7 ч); "тесная" клетка — домашнюю клетку разделяли перегородкой пополам на 24 ч

яний у крыс входят 9 тестов, для каждого из которых установлены единые пределы изменения выраженности ответной реакции, связанной с преодолением эмоций страха и тревоги: от 0 до 3 баллов. Для характеристики тревожно-фобического уровня у крысы используется показатель суммы баллов, присваиваемых животному по результатам полного обследования по ранжированной шкале.

Оценка изменения массы тела крыс. Взвешивание животных осуществляли еженедельно. Данные использовали как косвенный показатель изменения пищевого драйва (ведущей жизненно важной мотивации), изменение которого может свидетельствовать о возникновении депрессивного компонента в поведении крыс.

Определение потребления жидкости и предпочтения крысами 10%-ного раствора сахарозы воде используется для оценки питьевой мотивации (одной из жизненно важных мотиваций) и гедонических расстройств (снижение предпочтения сахарозы воде свидетельствует о развитии агедонии) [24]. Определение проводили до начала ХМС и далее в течение 4 недель еженедельно следующим образом. В 17 часов в понедельник в каждую клетку устанавливали 2 поилки с фиксированным количеством 10%-ного раствора сахарозы и воды. В 10 часов утра во вторник регистрировали количество выпитой воды и раствора сахарозы для каждого животного. Рассчитывали суммарное потребление жидкости (сахароза + вода) и процент потребления раствора сахарозы от общего объема выпитой жидкости в группах крыс за 17 часов. Во время проведения теста на агедонию и оценки потребления жидкости животных не подвергали никаким стрессогенным воздействиям.

Определение структуры и параметров плавательного поведения крыс в тесте принудительного (форсированного) плавания выполняли на основе классической методики Порсолта в более поздней модификации [3] с применением биоритмологического подхода к анализу плавательного поведения крыс. Увеличение длительности иммобильности крыс в авersive ситуации принудительного плавания свидетельствует о развитии у животных депрессивно-подобного состояния — так называемого «поведенческого отчаяния», — а изменение соотношения числа кратких периодов иммобильности (длительностью до 6 с) к числу периодов активного плавания — так называемый индекс депрессивности — о развитии у животного биоритмологических нарушений, характерных для состояния депрессии.

Оценку проводили через 2 недели ХМС. Каждую крысу помещали на 10 мин в сосуд, заполненный водой до отметки на высоте 30—35 см, температура воды соответствовала 24—25°C. Фиксировали длительность активного плавания (энергичные движения всеми лапами с активным перемещением), пассивного плавания (слабые гребки лапами, необходимые для поддержания тела на плаву) и иммобильности (отсутствие плавательных движений). Кроме того, рассчитывали ИД.

Определение уровня моноаминов и их метаболитов в структурах мозга. По истечении 4 недель стрессирования крыс опытных и контрольных групп декапитировали и немедленно под визуальным контролем на льду выделяли ткань стриатума из обеих полушарий головного мозга, определяли её массу (в среднем, около 50 мг), замораживали и хранили в жидком азоте до анализа. Экстракцию моноаминов проводили холодной 0,1 М хлорной кислотой, содержащей 0,01% метабисульфита натрия в качестве

консерванта (соотношение масса ткани/объем кислоты = 1:10) с помощью гомогенизатора «Ultra-Turrax». Полученные супернатанты хранили при -20°C 2—3 недели или при -70°C 2—3 мес. до анализа. Содержание моноаминов в экстрактах определяли методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. В работе использовали автоматизированный комплекс для ВЭЖХ серии «HP1050» и электрохимический детектор «HP1049» («Hewlett Packard»). Использовали хроматографическую колонку (125×4) мм «Spherisorb ODS2» с преколонкой (4×4) мм «Lichrospher100RP-18». Температура колонки поддерживалась на уровне $+35^{\circ}\text{C}$. Подвижная фаза была приготовлена на основе цитрат-фосфатного буфера (20/70 mM) pH 3,0, содержащего 2 mM ЭДТА натрия, 1—2 mM ион-парного реагента — гептансульфоната натрия и 1—2% трижды перегнанного этанола. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Потенциал стеклотитродного рабочего электрода относительно твердотельного хлорсеребряного электрода сравнения составлял 550 мВ. В качестве стандарта моноаминов использовали реактивы фирмы «Sigma»: норадrenalин (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), дофамин (ДА), 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (ДОФУК), гомованилиновую кислоту (ГВК), 5-гидрокситриптамин (5-ОТ, серотонин) и 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-ОИУК). Величины концентрации моноаминов в опытных образцах выражали в нг/мг ткани.

Статистическую обработку результатов проводили по алгоритмам программы «Statistica 6.0» после предварительной проверки предположения о нормальном характере распределения полученных данных по тесту Колмогорова—Смирнова. В случае подтверждения предположения использовали параметрические критерии: дисперсионный анализ для повторных измерений REPEATED MEASURES ANOVA, двух- и однофакторный дисперсионный анализ (TWO- и ONE-WAY ANOVA) (*post hoc* анализ по тесту Ньюмана—Кеулса). В случае отрицания нормального характера распределения данных использовали непараметрические критерии: непарный двусторонний U-критерий Манна—Уитни, парный критерий Вилкоксона, ранговый дисперсионный анализ Friedman ANOVA для зависимых переменных (*post hoc* анализ по парному критерию Вилкоксона). Принятый уровень значимости составлял 5%.

Результаты исследований

Поведение

Интактные крысы Август по сравнению с крысами Вистар демонстрировали более высокую *двигательную* (рис. 1А) и *исследовательскую активность* (рис. 1Б). Кроме того, интактные крысы Август быстрее *покидали центр «открытого поля»* и имели менее выраженную *реакцию на новизну* (табл. 2).

Через 3 недели от начала эксперимента было выявлено снижение двигательной и исследовательской активности, как в опытных, так и в контрольных группах крыс обеих популяций (рис. 1). При этом в контрольных группах, так же как и у интактных животных, двигательная активность крыс Август существенно превышала величину показателя у крыс Вистар. Однако в опытных группах соотношение менялось.

У крыс Вистар, подвергшихся ХМС, двигательная активность статистически значимо превышала активность в контроле, а у крыс Август, напротив, была ниже, чем в контрольной группе (рис. 1А). В результате двигательная активность в опытных группах на данном сроке тестирования не различалась.

Через 3 недели от начала эксперимента у крыс Вистар снижение исследовательской активности было одинаковым в контрольной и подопытной группах, а у крыс Август под воздействием ХМС исследовательская активность снижалась сильнее, чем в контроле (рис. 1Б).

Латентность выхода из центра «открытого поля» у крыс Вистар, подвергавшихся ХМС, была ниже, чем у интактных животных (табл. 2). Реакция на новизну у крыс Вистар статистически значимо не изменялась, тогда как у крыс Август, подвергавшихся ХМС, реакция на новизну возрастала.

На протяжении всего обследования тревожно-фобический уровень у крыс Вистар был выше, чем у крыс Август (рис. 2). Небольшое статистически значимое увеличение уровня тревожности через 3 недели от начала эксперимента выявлено только в группе контрольных крыс Вистар.

По предпочтению сахарозы воде в динамике обследования статистически значимое снижение было выявлено только в группе крыс Вистар, подвергнутых ХМС [Friedman ANOVA Chi Sq. ($N=25, df=4$) = 12,048; $p<0,017$]. На 2-й и 3-й неделях стрессирования предпочтение сахарозы воде у крыс этой группы было снижено по сравнению с исходными показателями и показателями на 1-й неделе обследования (рис. 3). Для крыс каждой из популяций не было выявлено различий по данному показателю между опытной и контрольной группами на всех сроках обследования. Однако между крысами разных популяций отличия были обнаружены. По сравнению с крысами Август у контрольных крыс Вистар предпочтение сахарозы воде было меньше на 1-й, 3-й и 4-й неделях обследования, у подопытных — на 2-й и 3-й неделях наблюдения.

Суточное потребление жидкости в процессе 4-недельного обследования статистически значимо возрастало в опытной и контрольной группах крыс Вистар [соответственно $F_{(4,96)}=4,599, p<0,002$ и $F_{(4,88)}=6,975, p<0,001$; REPEATED MEASURES ANOVA], у подопытных крыс Август небольшое увеличение не достигло уровня статистической значимости [$F_{(4,72)}=2,407, p=0,057$], а у контрольных крыс Август увеличения потребления жидкости не было выявлено [$F_{(4,76)}=0,222, p=0,925$]. Суточный объем потребления жидкости у крыс обеих популяций варьировал в пределах 40—70 мл. Взаимодействия факторов «По-

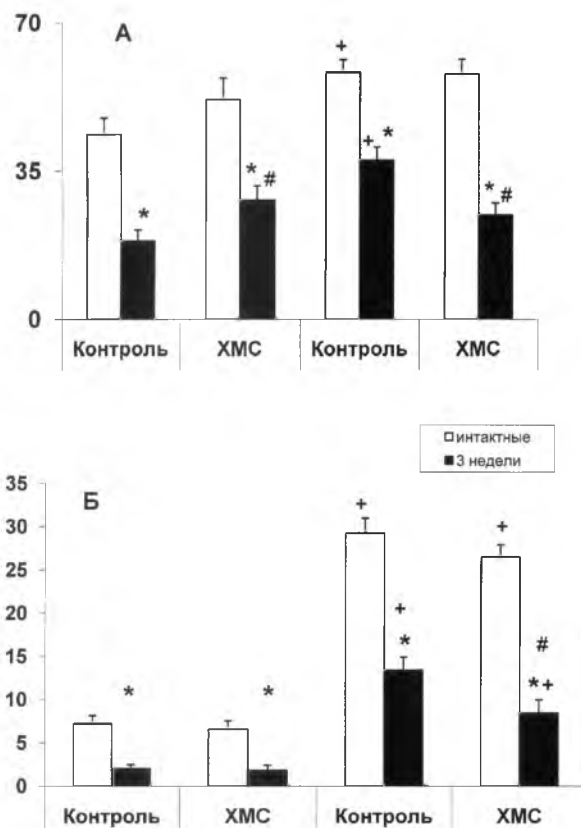


Рис. 1. Двигательная (А) и исследовательская (Б) активность в тесте «открытого поля» у крыс Вистар и Август в контроле и под влиянием ХМС: По оси ординат: А — число пересеченных квадратов; Б — число вертикальных стоек. Светлые столбики — интактные животные, темные столбики — через 3 недели после начала эксперимента. * $p<0,001$ по сравнению с интактными животными (парный критерий Вилкоксона); + $p<0,05$ (для А) и $p<0,001$ (для Б) по сравнению со значением в соответствующей группе крыс Вистар; # $p<0,05$ по сравнению со значением в контрольной группе данной популяции (непарный критерий Манн-Уитни).

пуляция» и «ХМС» не было обнаружено [$F_{(5,79)}=0,722, p=0,609$]. По результатам постдисперсионного анализа по тесту Ньюмана—Кеулса суточное потребление жидкости было выше в контрольной группе интактных крыс Август ($56,1\pm5,4$ мл) по сравнению с крысами Вистар ($38,5\pm4,1$ мл) ($p=0,044$), та же тенденция отмечалась в группах интактных крыс, в дальнейшем подвергнутых стрессированию. Превышение суточного потребления жидкости в контрольных группах крыс Август по сравнению с крысами Вистар сохранялось через 1 неделю и отмечалось как выраженная тенденция ($p=0,062$) через 3 недели обследования. У подопытных крыс Август по срав-

Таблица 2

Поведенческие характеристики крыс в тесте «открытого поля»

Группы	Латентность выхода из центра поля (с)		Реакция на новизну	
	Интактные	Через 3 недели	Интактные	Через 3 недели
Вистар, ХМС (n=25)	27,0±5,2	16,0±2,1*	2,9±0,8	1,6±0,2
Вистар, контроль (n=23)	30,7±3,4	31,6±8,1	3,1±1,0	2,0±0,7
Август, ХМС (n=19)	12,6±1,3 ^x	12,9±1,7	0,9±0,1 ⁺	1,7±0,2 [#]
Август, контроль (n=20)	12,6±1,4 ⁺	12,4±1,3	0,9±0,1 ^x	1,2±0,1

Примечание. ⁺ $p<0,05$; ^x $p<0,1$ по сравнению с соответствующей группой крыс Вистар; [#] $p<0,05$ по сравнению с интактными крысами той же популяции в той же группе

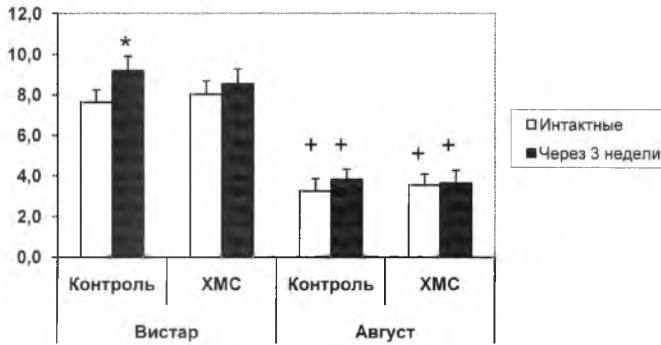


Рис. 2. Тревожно-фобический уровень у крыс Вистар и Август в контроле и под влиянием ХМС:

По оси ординат: баллы. Светлые столбики – интактные животные, темные столбики – через 3 недели после начала эксперимента.

* $p < 0,001$ по сравнению с интактными животными (парный критерий Вилкоксона); + $p < 0,05$ по сравнению со значением в соответствующей группе крыс (непарный критерий Манна–Уитни)

нению с крысами Вистар превышение суточного потребления жидкости наблюдалось через 3 недели стрессирования (соответственно $68,7 \pm 5,3$ и $51,7 \pm 3,9$ мл, $p = 0,018$).

В тесте принудительного плавания выявлено отличие в биоритмологической структуре плавательного поведения у крыс двух популяций (табл. 3). У контрольных крыс Август длительность активного плавания была увеличена, а пассивного – снижена по сравнению с показателями у крыс Вистар, ИД по величине был меньше, чем у крыс Вистар. У крыс Август, подвергшихся двухнедельному стрессированию, по сравнению со стрессированными крысами Вистар сохранялось превышение в длительности активного плавания и меньшая длительность пассивного плавания, однако различий в величине ИД с крысами Вистар не было. Стрессированные крысы Вистар демонстрировали меньшую длительность иммобильности, меньшее число кратких периодов иммобильности и меньший ИД по сравнению с контрольными крысами Вистар. У крыс Август различий между показателями в контрольной и опытной группах не обнаружено. Следует отметить, что величина ИД ни в одной из групп не превышала единицы, что свидетельствует об отсутствии выраженного депрессивного компонента в поведении животных [3].

В процессе 4-недельного обследования масса тела контрольных и подопытных крыс Вистар статистически значимо увеличивалась [$F_{(4,88)} = 48,913$, $p < 0,001$ и $F_{(4,96)} = 33,385$, $p < 0,001$; REPEATED MEASURES ANOVA]

(рис. 4), однако динамика нарастания была разной. В контрольной группе крыс Вистар нарастание было стабильным и отмечалось уже через неделю после начала эксперимента, тогда у подопытных крыс масса увеличивалась по сравнению с исходным значением только на 3 и 4-й неделях после начала обследования. Начиная с 1 недели наблюдения, масса контрольных крыс превышала массу подопытных животных (рис. 4А). У подопытных крыс Август обнаружено незначительное транзиторное снижение массы тела на 3 неделе стрессирования [$F_{(4,72)} = 4,105$, $p = 0,005$], которое на 4-й неделе уже не выявлялось, тогда как у контрольных крыс этой популяции масса тела в процессе наблюдения не изменялась [$F_{(4,76)} = 1,707$, $p = 0,157$] (рис. 4Б). Взаимодействия факторов «Популяция» и «ХМС» по показателю массы тела не было обнаружено [$F_{(5,79)} = 2,0$, $p = 0,084$]. Исходно крысы Вистар превосходили по массе крыс Август того же возраста. Это различие сохранялось на всех сроках обследования и в контрольных, и в опытных группах (во всех случаях $p < 0,001$ по тесту Ньюмана–Кеулса).

Содержание моноаминов в стриатуме

При межпопуляционном сравнении было выявлено, что у крыс Август контрольной группы содержание НА, ДА, ДОФА, ДОФУК и ГВК в стриатуме меньше, а 5-ОТ, напротив, – больше, чем у контрольных крыс Вистар (рис. 5А, Б). По уровню 5-ОИУК крысы двух популяций не различались. У подвергнутых ХМС крыс Август содержание НА, ДА, ДОФУК и ГВК, так же как и в контроле, было меньше, чем у стрессированных крыс Вистар. Однако по уровню ДОФА и 5-ОТ стрессированные крысы Август и Вистар не различались, при этом содержание метаболита серотонина 5-ОИУК у крыс Август, подвергнутых ХМС, было меньше, чем у Вистар.

У контрольных крыс Август отношение ДОФУК/ДА в стриатуме было ниже, чем у контрольных крыс Вистар, отмечалась тенденция к снижению отношения ГВК/ДА ($p = 0,115$) (табл. 4). После ХМС снижение оборота ДА у крыс Август по сравнению с крысами Вистар было статистически значимым по обоим показателям.

При внутривидовом сравнении обнаружено, что у подвергнутых ХМС крыс Август по сравнению с контрольными животными уровень ДА в стриатуме был выше, а уровень 5-ОТ – ниже. У подвергнутых ХМС крыс Вистар содержание 5-ОИУК было выше, чем в контроле, по всем остальным показателям отличий от контроля не было выявлено (рис. 5А, Б).

Таблица 3

Изменение биоритмологической структуры плавательного поведения крыс Вистар и Август в контроле и после ХМС

Показатели	Вистар		Август	
	Контроль	ХМС	Контроль	ХМС
Активное плавание, с	146,8±9,3	163,2±8,1	185,5±8,5*	199,5±9,7*
Пассивное плавание, с	445,4±9,5	435,2±12,4	409,0±8,6*	396,8±9,3*
Иммобильность, с	7,8±1,7	1,6±0,8 ⁺	5,6±1,5	3,7±1,5
Число периодов иммобильности до 6 с	3,8±0,8	0,8±0,4 ⁺	2,2±0,6	2,1±0,8
Число периодов активного плавания	7,9±0,9	8,0±0,4	8,7±0,7	7,3±0,4
Индекс депрессивности	0,74±0,20	0,10±0,05 ⁺	0,19±0,06*	0,35±0,12

Примечание. ⁺ $p < 0,001$ – отличия стрессированных крыс Вистар от контрольных крыс той же популяции; * $p < 0,01$ – отличия крыс Август от соответствующих групп крыс Вистар (по непарному непараметрическому критерию Манна–Уитни)

У контрольных крыс Август отношение ДОФУК/ДА в стриатуме было ниже, чем у Вистар (табл. 4). ХМС привел к увеличению оборота ДА и 5-ОТ в стриатуме у крыс Вистар, тогда как у крыс Август такое увеличение наблюдалось только в отношении 5-ОТ. Оборот ДА у крыс Август по сравнению с Вистар на фоне ХМС оставался сниженным.

Обсуждение результатов

Интактные крысы Август и Вистар различались по базовым поведенческим характеристикам: крысы Август демонстрировали более высокий уровень ориентировочно-исследовательской деятельности по показателям двигательной и исследовательской активности в «открытом поле». Более высокий уровень исследовательской активности у крыс Август был ранее показан в работах других исследователей [6]. Оказалось также, что у интактных крыс Август уровень тревожности был ниже, латентность выхода из центра «открытого поля» — меньше, а реакция на новизну — менее выражена, чем у крыс Вистар. Известно, что при разделении крыс Вистар по активности в «открытом поле» животные, демонстрировавшие большую латентность первого движения и пересечения центральных квадратов в совокупности с меньшей локомоторной и исследовательской активностью, обладали меньшей устойчивостью к острому эмоциональному стрессу (по характеристикам поведения в «открытом поле», показателям массы стресс-компетентных органов и выживаемости) [2]. С учетом этих данных, на основании результатов сравнения поведения интактных крыс Август и Вистар в тесте «открытого поля» можно полагать, что крысы Вистар менее устойчивы к острому эмоциональному стрессу, чем крысы Август. Действительно, ранее показано, что крысы Август, подвергнутые острому стрессу (свободное плавание в домашней клетке в течение получаса), демонстрируют более устойчивый паттерн поведения в «открытом поле» в сочетании с высокой устойчивостью к стрессогенному язвобразованию [5, 6]. По данным другой группы авторов, крысы Вистар, напротив, более устойчивы к острому эмоциональному стрессу, тогда как крысы Август к нему предрасположены [1]. В настоящем исследовании животных подвергали не острому стрессу, а длительному мягкому стрессированию. В этих условиях оказалось, что у исходно более активных в «открытом поле» крыс Август после 3-недельного ХМС двигательная и исследовательская активность была меньше, чем у крыс той же популяции, не подвергавшихся стрессированию, тогда как у крыс Вистар, напротив, было отмечено превышение двигательной активности над контрольным уровнем. В совокупности с данными о том, что тревожно-фобический уровень у крыс Август на протяжении всего времени эксперимента был ниже, чем у крыс Вистар, и, в отличие от последних, даже кратковременно не повышался, а также о том, что реакция на новизну у крыс Август не снижалась, что является одним из характерных последствий стресса [12], а, напротив, повышалась, можно заключить, что крысы Август оказались более устойчивы к ХМС, чем крысы Вистар, что соответствует их более высокой активности в тесте «открытого поля».

На основании снижения предпочтения сахарозы воде (специфический показатель развития депрессивной сим-

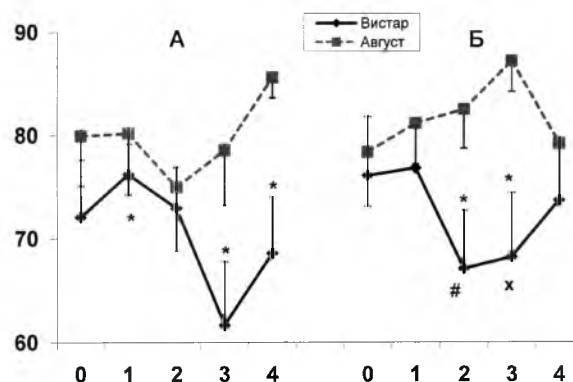


Рис. 3. Динамика предпочтения раствора сахарозы у крыс Вистар и Август в контроле и под влиянием ХМС: По оси абсцисс — сроки тестирования: 0 — интактные животные, 1, 2, 3, 4 — недели после начала эксперимента; по оси ординат — % потребления сахарозы от общего объема выпитой за сутки жидкости. Сплошная линия — крысы Вистар, пунктирная линия — крысы Август. * $p < 0,05$ по сравнению со значениями в соответствующих по срокам обследования группах крыс Август (непарный критерий Манна-Уитни); # $p < 0,05$; x $p < 0,08$ по сравнению с интактными и 1 неделей обследования (критерий Вилкоксона после дисперсионного анализа по Фридману)

птоматики в поведении крыс) у крыс Вистар как контрольной, так и стрессированной группы по сравнению с крысами Август можно говорить о том, что у животных популяции Вистар появлялись признаки депрессивности. На первый взгляд, этот вывод противоречит представлениям о специфическом влиянии ХМС на поведение, однако, важно подчеркнуть, что животные контрольных групп на протяжении всего эксперимента, так же как и стрессированные крысы, находились в условиях трехнедельного одиночного содержания. Хорошо известно, что длительное одиночное содержание оказывает депрессогенное действие [12], что и подтвердили наши данные в отношении крыс Вистар. При этом оказалось, что только в группе крыс Вистар, подвергнутых ХМС, было отмечено статистически значимое снижение предпочтения саха-

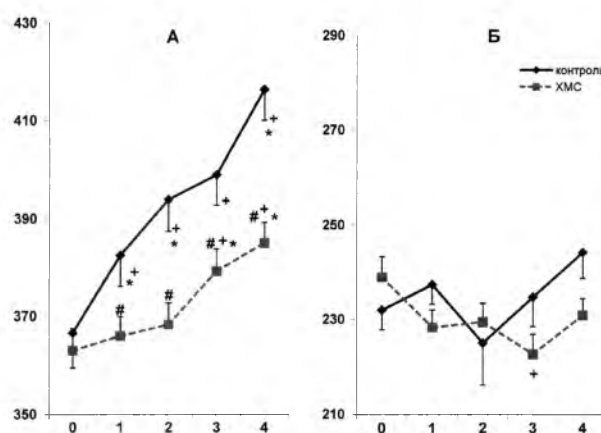


Рис. 4. Динамика изменения массы тела у крыс Вистар (А) и Август (Б) в контроле и под влиянием ХМС: По осям абсцисс — сроки тестирования: 0 — интактные животные; 1, 2, 3, 4 — недели после начала эксперимента; по осям ординат — масса животных, г. Сплошная линия — крысы Вистар, пунктирная линия — крысы Август. * $p < 0,01$ по сравнению с массой животных на предыдущем сроке обследования; + $p < 0,001$ по сравнению с исходной массой крыс; # $p < 0,05$ по сравнению с соответствующими значениями в контрольной группе (post hoc анализ по критерию Ньюмана-Кеулса)

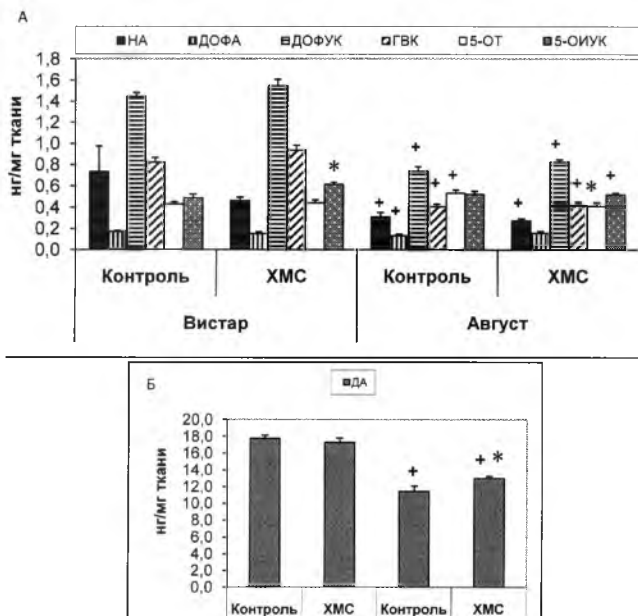


Рис. 5. Содержание моноаминов в стриатуме у крыс Вистар и Август в контроле и под влиянием ХМС:

По осям ординат — уровень моноаминов, их предшественников и метаболитов, нг/мг ткани.

А — столбики: черные — НА, вертикальная штриховка — ДОФА, горизонтальная штриховка — ДОФУК, косая штриховка — ГВК, белые — 5-ОТ, светлые точки на темно-сером фоне — 5-ОИУК; Б — темно-серые столбики — ДА.

⁺ $p < 0,01$ по сравнению с соответствующей группой крыс Вистар;

^{*} $p < 0,05$ по сравнению со значениями в контрольной группе данной популяции крыс (непарный критерий Манна—Уитни)

розы через 2 недели стрессирования по сравнению с исходным уровнем, что можно рассматривать как свидетельство специфического влияния ХМС. Выявленный нами эффект ХМС на предпочтение сахарозы был транзиторным. Возможно, его нестойкость связана с непостоянством потребления сахарозы крысами во времени [21].

По результатам оценки поведения крыс в тесте принудительного плавания были получены новые свидетельства большей психомоторной активности крыс Август — длительность активного плавания у крыс контрольной группы была увеличена, а ИД — снижен по сравнению с контрольными крысами Вистар. ХМС изменил структуру плавательного поведения крыс Вистар, снизив длительность и число периодов иммобильности при соответствующем уменьшении ИД. У крыс Август не обнаружено влияния ХМС на плавательное поведение. Таким образом, по результатам обследования животных в данном тесте признаков депрессивности у крыс выявить не удалось. Снижение показателей иммобильности у крыс Вистар можно рассматривать как свидетельство некоторой психомотор-

ной активации (дезадаптации?), вызванной ХМС, что согласуется с данными о превышении двигательной активности стрессированных крыс Вистар в тесте «открытого поля» над контрольным уровнем.

У крыс Август наблюдался более высокий уровень суточного потребления жидкости при меньшей массе тела, чем у крыс Вистар того же возраста. По-видимому, эти различия в массе тела, отмеченные другими исследователями [4], являются следствием разного характера метаболизма у крыс данных популяций. Следует отметить тот факт, что нарастание потребления жидкости в процессе эксперимента было выявлено только у контрольных и стрессированных крыс Вистар. Возможно, что такое увеличение является результатом влияния изоляционного стресса и ХМС, однако для ответа на этот вопрос нужны дополнительные исследования. Нарастание массы тела у крыс Вистар в процессе эксперимента также может быть связано с увеличением суточного потребления жидкости. Тем не менее, масса тела крыс Вистар, подвергнутых ХМС, в процессе эксперимента нарастала медленнее, чем в контрольной группе, что может косвенно свидетельствовать о развитии у стрессированных крыс Вистар признаков снижения пищевой мотивации, что принято рассматривать как показатель развития депрессивности в поведении крыс [24].

По совокупности поведенческих оценок можно заключить, что крысы Вистар оказались более чувствительны к действию ХМС, чем крысы Август (по показателям развития депрессивности в сочетании с некоторой психомоторной активацией в острой аверсивной ситуации).

По данным настоящего исследования, у контрольных крыс Август содержание катехоламинов в стриатуме было меньше, чем у крыс Вистар. Оборота ДА по отношению ДОФУК/ДА у контрольных крыс Август в стриатуме оказался ниже, чем у крыс Вистар. В работах других авторов показано, что базальный уровень ДА в стриатуме у интактных крыс Август выше, а оборота ДА по тому же отношению ДОФУК/ДА — ниже, чем у Вистар [7]. Проводя сравнительный анализ этих данных, следует иметь в виду, что в настоящем исследовании крысы контрольных групп, как указывалось выше, не являлись интактными животными. Это крысы, которые были подвержены хроническому стрессу трехнедельного одиночного содержания. Возможно, такой стресс привел к снижению содержания ДА в стриатуме крыс Август при сохранении скорости оборота ДА.

ХМС изменил содержание и обмен моноаминов у изолированно содержавшихся животных обеих популяций. У крыс Август уровень ДА в стриатуме оказался выше, чем в контроле, хотя, по-прежнему, был ниже, чем у крыс Вистар, подвергнутых ХМС (рис. 5А). У этих крыс была

Таблица 4

Показатели оборота дофамина и серотонина в стриатуме крыс, подвергнутых ХМС, и в контроле

Показатели	Вистар		Август	
	Контроль	ХМС	Контроль	ХМС
ДОФУК/ДА	0,081±0,002	0,089±0,002 ⁺	0,068±0,003 [*]	0,063±0,002 [*]
ГВК/ДА	0,045±0,003	0,054±0,003 ⁺	0,038±0,003	0,032±0,004 [*]
5-ОИУК/5-ОТ	1,148±0,131	1,439±0,089 ⁺	1,001±0,052	1,532±0,240 ⁺

Примечание. ⁺ $p < 0,05$ — отличия стрессированных крыс от контрольных крыс той же популяции; ^{*} $p < 0,01$ — отличия крыс Август от соответствующих групп крыс Вистар (по непарному непараметрическому критерию Манна—Уитни)

выявлена тенденция к увеличению содержания ДОФА в стриатуме на фоне ХМС ($p=0,101$). При этом оборот ДА по отношению ДОФУК/ДА и ГВК/ДА в популяции Август не изменился, тогда как при остром стрессе было выявлено его увеличение [5, 7]. По совокупности выявленных изменений можно полагать, что у крыс Август в ответ на ХМС происходит некоторая активация ДА-ергической нигростриатной системы (по косвенным показателям интенсивности ресинтеза).

У крыс Вистар не выявлено статистически значимых изменений в содержании катехоламинов, предшественника и метаболитов ДА в стриатуме на фоне ХМС. Однако следует отметить тенденцию к снижению содержания НА и ДОФА (соответственно $p=0,190$ и $p=0,113$) и тенденцию к росту содержания метаболитов ДА (в обоих случаях $p<0,2$). Следствием этого, по-видимому, явилось статистически значимое увеличение оборота ДА по обоим отношениям — ДОФУК/ДА и ГВК/ДА. По совокупности полученных данных можно полагать, что в ответ на ХМС у крыс Вистар активируется метаболизм ДА на фоне недостаточности его ресинтеза.

В целом, полученные данные принципиально согласуются с данными об активации нигростриатной ДА-ергической системы у крыс Август в ответ на острый стресс (свободное плавание в домашней клетке) [5] и с представлениями о том, что у крыс Август при остром стрессе (иммобилизация с дополнительным электрокожным раздражением) ресинтез катехоламинов в надпочечниках опережает их выброс, а у крыс Вистар, напротив, процессы ресинтеза отсрочены во времени [4].

Ранее показано, что у крыс Август более высокая устойчивость к стрессорному язвобразованию сочетается с более высоким базальным и постстрессорным (после острого стресса) содержанием 5-ОТ в стриатуме, что послужило одним из экспериментальных оснований отнесения серотонинергической системы к числу стресс-лимитирующих систем [5]. Выявленное в настоящей работе повышенное содержание 5-ОТ в стриатуме контрольных крыс Август по сравнению с крысами Вистар свидетельствует в пользу такого заключения. Однако ХМС привел к снижению содержания 5-ОТ в стриатуме крыс Август, но не Вистар, при этом оборот 5-ОТ по показателю 5-ОИУК/5-ОТ возрос у крыс обеих популяций: у Август — за счет снижения содержания 5-ОТ, у Вистар — за счет статистически значимого увеличения содержания метаболита. Можно предположить, что по характеру ресинтеза 5-ОТ на фоне ХМС крысы двух популяций также различаются — в данном случае, реципрочно: ресинтез 5-ОТ у крыс Вистар, по-видимому, опережает его ресинтез у крыс Август.

Полученные результаты, в целом, подтверждая большую устойчивость к стрессу крыс Август по сравнению с Вистар, свидетельствуют о различии патофизиологических механизмов, обеспечивающих такую устойчивость при остром и хроническом стрессе.

Список литературы

1. Герштейн Л.М., Сергутина А.В., Худоерков Р.М. Морфохимическая характеристика мозга крыс, генетически предрасположенных (Август) и устойчивых (Вистар) к эмоциональному стрессу // *Нейрохимия*. — 2000. — Т. 17, №2. — С. 135–139.
2. Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В. Тест открытого поля как прогностический критерий устойчивости к эмоциональному стрессу у крыс линии Вистар // *Журн. высш. нервн. деят.* — 1995. — Т. 45, №4. — С. 775–781.
3. Крупина Н.А., Орлова И.Н., Крыжановский Г.Н. Метод интегральной оценки выраженности депрессии поведения у крыс // *Журн. высш. нервн. деят.* — 1999. — Т. 49. — Вып. 5. — С. 865–876.
4. Перцов С.С., Коплик Е.В., Краузер В.И. и др. Катехоламины надпочечников крыс Август и Вистар при остром эмоциональном стрессе // *Бюл. exper. биол и мед.* — 1997. — Т. 123, №6. — С. 645–648.
5. Пшенникова М.Г. Роль генетических особенностей организма в устойчивости к повреждающим воздействиям и в защитных эффектах адаптации // *Патол. физиология и exper. терапия*. — 2011. — №4. — С. 7–16.
6. Пшенникова М.Г., Бондаренко Н.А., Шимкович М.В. и др. Различия в поведении и устойчивости к язвенному поражению желудка при стрессе у крыс линии Август и Вистар, адаптированных и не адаптированных к гипоксии // *Бюл. exper. биол и мед.* — 1999. — Т. 128, №12. — С. 638–641.
7. Пшенникова М.Г., Попкова Е.В., Бондаренко Н.А. и др. Катехоламины, оксид азота и устойчивость к стрессорным повреждениям: влияние адаптации к гипоксии // *Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. — 2002. — Т. 88, №4. — С. 485–495.
8. Родина В.И., Крупина Н.А., Крыжановский Г.Н., Окнина Н.Б. Многопараметровый метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс // *Журн. высш. нервн. деят.* — 1993. — Т. 43, №5. — С. 1006–1017.
9. Abercrombie E.D., Keefe K.A., DiFrischia D.S., Zigmond M.J. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex // *J. Neurochem.* — 1989. — Vol. 52, №5. — P. 1655–1658.
10. Bale T.L. Stress sensitivity and the development of affective disorders // *Horm. Behav.* — 2006. — Vol. 50, №4. — P. 529–533.
11. Cirullia F., Francia N., Berry A. et al. Early life stress as a risk factor for mental health: Role of neurotrophins from rodents to non-human primates // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2009. — Vol. 33, №4. — P. 573–585.
12. Filipovic D., Zlatkovic J., Pavicevic I. et al. Chronic isolation stress compromises JNK/c-Jun signaling in rat brain // *J. Neural. Transm.* — 2012. — Feb. 23. [Epub ahead of print].
13. Grippo A.J., Johnson A.K. Stress, depression, and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models // *Stress*. — 2009. — Vol. 12, №1. — P. 1–21.
14. Hasler G., Drevets W.C., Manji H.K., Charney D.S. Discovering endophenotypes for major depression // *Neuropsychopharmacology*. — 2004. — Vol. 29. — P. 1765–1781.
15. Konkle A.T., Baker S.L., Kentner A.C. et al. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared // *Brain Res.* — 2003. — Vol. 992, №2. — P. 227–238.
16. Mastorakos G., Pavlatou M., Diamanti-Kandarakis E., Chrousos G.P. Exercise and the Stress System // *Hormones*. — 2005. — Vol. 4, №2. — P. 73–89.
17. Mather M., Lighthall N.R. Both risk and reward are processed differently in decisions made under stress // *Curr. Dir. Psychol. Sci.* — 2012. — Vol. 21, №2. — P. 36–41.
18. McEwen B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain // *Dialog. Clinical Neurosci.* — 2006. — Vol. 8, №4. — P. 367–381.
19. Mora F., Segovia G., Del Arco A. et al. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration // *Brain Res.* — 2012. — Jan 3. [Epub ahead of print].
20. Nassar N.N., Schaal M.F., Zaki H.F., Abdallah D.M. Octreotide ameliorates gastric lesions in chronically mild stressed rats // *World J. Gastroenterol.* — 2011. — Vol. 17, №9. — P. 1135–1142.
21. Nielsen C.K., Arnt J., Sanchez C. Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences // *Behav. Brain Res.* — 2000. — Vol. 107, №(1–2). — P. 21–33.
22. Pani L., Porcella A., Gessa G.L. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system // *Mol. Psychiatry*. — 2000. — Vol. 5, №1. — P. 14–21.
23. Suridjan I., Boileau I., Bagby M. et al. Dopamine response to psychosocial stress in humans and its relationship to individual differences in personality traits // *J. Psychiatr. Res.* — 2012. — Apr. 3. [Epub ahead of print].

24. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation // *Psychopharmacology (Berl.)*. — 1997. — Vol. 134, №4. — P. 319–329.

25. Wu H.H., Wang S. Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression // *Behav. Brain. Res.* — 2010. — Vol. 213, №1. — P. 94–102.

Effects of chronic mild stress in Wistar and August rats: behavior and monoamine content in the striatum

Krupina N.A.¹, Khlebnikova N.N.¹, Orlova I.N.¹, Popkova E.V.², Rodina V.I.¹, Kryzhanovsky G.N.¹

¹ — Federal State Budgetary Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology» under the Russian Academy of Medical Sciences,
Fax: +7(499) 151-12-61; e-mail: niipharm@mail.ru

² — Moscow State University of Medicine and Dentistry, Fax: +7(495) 681-65-13; e-mail: msmsu@msmsu.ru

Behavioral deficits in rats subjected to chronic mild stress (CMS) have revealed more resistance in August as compared to Wistar rats. CMS caused lower preference for the sucrose over water, retardation in weight increase under stress, light psychomotor activation in open field and forced swimming tests in Wistar rats without of significant increase in anxiety. Taken as a whole, data testified to the development of depression symptoms and dysadaptation in Wistar rats. In August rats as compared to Wistar anxiety was lower over the time of the experiment; the only response to CMS was moderate decrease of locomotion and exploratory activity with the increase of locomotor reactivity to novelty in addition. Monoamine content was assessed in the striatum. In August rats the level of dopamine (DA) was increased but DA turnover did not change under CMS. In Wistar rats the catecholamine content, the level of DA precursor and DA metabolites did not change under CMS but DA turnover was increased. CMS caused the decrease in the serotonin (5-HT) level in August rats and the increase in the level of 5-HT metabolite 5-HIAA in Wistar rats while 5-HT turnover according to the 5-HIAA/5-HT ratio was increased in both rat populations. Our data suggest that resistance to acute and chronic mild stress in August rats is founded on different pathophysiologic mechanisms provided by the difference in the reactivity of genetically deterministic neurotransmitter systems.

Key words: *Wistar and August rats, chronic mild stress, behavior, monoamines, striatum*