

Патогенетичні особливості гормонального профілю у щурів, що зазнали restraint-стресу різної тривалості

К. Б. Романова^{B,C,D}, О. В. Ганчева^{A,E}, Ю. М. Колесник^{A,E,F}

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:

інсулін, кортикостерон, адренокортикотропний гормон, артеріальний тиск, стрес, щури.

Key words:

insulin, corticosterone, adrenocorticotrophic hormone, blood pressure, stress, rats.

Надійшла до редакції /
Received: 27.04.2023

Після доопрацювання /
Revised: 11.05.2023

Схвалено до друку /
Accepted: 19.05.2023

Конфлікт інтересів:
відсутній.

Conflicts of interest:
authors have no conflict
of interest to declare.

*E-mail:
gancheva_olga@i.ua

Мета роботи – встановити характер змін гормонального профілю (концентрацій кортикостерону, інсуліну та адренокортикотропного гормону) на тлі метаболічних змін і підвищення артеріального тиску, що формуються у щурів при restraint-стресі на 6, 15 та 21 тижні обмеження життєвого простору.

Матеріали та методи. Було використано 55 нормотензивних щурів-самців лінії Wistar віком 6–10 місяців, що розподілені на 4 експериментальні групи: 1 – інтактний контроль (10 щурів); 2, 3 і 4 – по 15 тварин, які перебували в умовах обмеження життєвого простору. У всіх тварин вимірювали артеріальний тиск (АТ), дворазово визначали рівень глікемії та масу тіла: на етапі формування груп та на 6, 15 та 21 тижнях. Концентрації гормонів інсуліну, кортикостерону та адренокортикотропного гормону (АКТГ) визначали імуноферментним методом у плазмі крові щурів, використовуючи комерційні набори фірми Monobind, USA.

Результати. Після 6 тижнів обмеження життєвого простору маса тіла тварин достовірно знизилась на 20,72 %; на 15 тижень – відновилась до вихідних показників; на 21 тижні стала перевищувати контрольні значення на 26,1 %. Показники АТ мали зростаючий тренд, визначили динамічне підвищення систолічного тиску на 7 %, 17 % та 26 % відповідно; діастолічного тиску – на 21,4 % на 15 тижні до 37,0 % на 21 тижні. Концентрація глюкози відповідає еуглікемічному діапазону. Зміни гормонального профілю засвідчили зростання концентрації АКТГ більше ніж на 50 % та зниження інсуліну на 34 % на 6 тижні з подальшим зменшенням його рівня вдвічі (на 15 тижні) та наступним (більше як двократним) зростанням АКТГ до 21 тижня. Щодо змін концентрації кортикостерону, то встановили пікове її зростання у 3,77 раза на 15 тижні з наступним зниженням і відновленням до нормативних значень на 21 тижні.

Висновки. Навіть незначні та невиразні стресорні впливи, які діють постійно та не можуть бути подолані, стають важливими тригерами формування порушення гормонального профілю та вуглеводного обміну, стійкого підвищення артеріального тиску, що виявляються спочатку гіпоінсулінемією, збільшенням рівня АКТГ та сталістю концентрації кортикостерону. Тривалі стресорні впливи спричиняють короточасне «пікове» підвищення рівня кортикостерону, достовірне збільшення рівня інсуліну та стійке підвищення АКТГ. Різностямовані коливання рівнів досліджуваних гормонів відбуваються на тлі поступового збільшення АТ і стабільного підвищення рівня глікемії.

Сучасні медичні технології. 2023. № 2(57). С. 12-15

Pathogenetic characteristics of the hormonal profile in rats subjected to restraint stress of different duration

K. B. Romanova, O. V. Hancheva, Yu. M. Kolesnyk

The aim of the work is to ascertain the character of changes in the hormonal profile (concentrations of corticosterone, insulin, and adrenocorticotrophic hormone) in conjunction with metabolic alterations and elevated blood pressure, which are induced in rats by restraint stress at 6th, 15th and 21st weeks of environmental space restriction.

Materials and methods. A total of 55 normotensive male Wistar rats, aged 6–10 months, were assigned into 4 experimental groups (1 – intact control (10 rats); 2, 3 and 4 (15 rats each exposed to restricted space allowance)). All the animals were subjected to blood pressure (BP), blood glucose level and body weight measurements twice: at the stage of forming groups and at the 6th, 15th and 21st weeks. Plasma hormone concentrations (insulin, corticosterone, and ACTH) were examined by the immunoenzymatic method using commercial kits (Monobind, USA).

Results. The body weight of the animals was significantly reduced by 20.72 % after 6 weeks of space allowance restriction, it was restored to baselines by the 15th week and exceeded control values by 26.1 % at the 21st week. BP levels showed an increasing trend, a dynamic increase in systolic pressure by 7 %, 17 % and 26 % was detected, respectively, as well as diastolic from the 15th week to the 21st week by 21.4 % and 37.0 %, respectively. Glucose concentration was within the euglycemic range. Changes in the hormonal profile showed an increase in the concentration of ACTH by more than 50 % and a decrease in insulin – by 34 % at the 6th week with a

subsequent twofold decrease in the insulin concentration (at week 15) and a further more than twofold increase in ACTH at the 21st week. As for changes in the concentration of corticosterone, a peak increase of 3.77 times was noticed at the 15th week, followed by a decrease and restoration to the normative values by the 21st week.

Conclusions. Even minor and unremarkable continuously acting stressors, which cannot be coped, become important triggers for hormonal profile and carbohydrate metabolism alterations as well as for a persistent increase in blood pressure, which manifest first by hypoinsulinemia, an increase in the level of ACTH, and a constant concentration of corticosterone. Long-term stress exposure contributes to a transient “peak” increase in the corticosterone level, a significant increase in insulin and a sustained increase in ACTH. Multidirectional changes in the levels of the studied hormones occur amidst a gradual increase in blood pressure and a stable increase in the level of glycemia.

Modern medical technology. 2023;(2):12-15

Відомо, що відповідь на стрес-реакцію відбувається завдяки участі багатьох регуляторних систем: ЦНС, автономної нервової системи та систем нейроендокринної регуляції. У рамках останнього механізму важлива роль належить гіпоталамо-гіпофізарно-кортикоїдній осі, особливо коли йдеться про негативні сигнали соціального середовища, що мають тривалу дію [1].

У всіх подібних ситуаціях неможливість реалізувати адаптацію призводить до того, що порушення гомеостазу, які є компонентом стрес-реакції, зберігаються довгий час. Тривалим виявляється збудження та підвищення синтетичної активності адренергічної та гіпофізарно-адреналової систем, які й формують патогенетичні прояви стресу [1].

У результаті незвичайно довгої й інтенсивної дії високих концентрацій катехоламінів і глюкокортикоїдів виникають різні ушкодження, що становлять групу так званих стресорних захворювань, які посідають одне з основних місць у сучасній медицині [2].

Саме через ці особливості вивчення механізмів впливу соціального стресу на здоров'я населення та його ролі в формуванні ключових хвороб людства є актуальним і необхідним. Цьому питанню присвячено чимало праць – і клінічних спостережень, і експериментальних досліджень. Однак, незважаючи на високу зацікавленість проблемою, у ній все ще існують «білі плями». Зазначимо, що більшість досліджень мають фрагментарний характер або зосереджені тільки на спостереженні за хворими зі сформованою патологією. Тобто найчастіше здійснюють ретроспективний аналіз взаємозв'язку хвороби та можливих факторів, що, на думку хворого або лікаря, могли її викликати. Відтак проведення експериментального дослідження з моделюванням патології, вивчення на кожному етапі від початку формування загального адаптаційного синдрому та до його «зриву» з розвитком патології стає важливим і необхідним для розуміння цієї проблеми.

Мета роботи

Встановити характер змін гормонального профілю (концентрацій кортикостерону, інсуліну та адренокортикотропного гормону) на тлі метаболічних змін та підвищення артеріального тиску, що формуються у щурів при restraint-стресі на 6, 15 та 21 тижнях обмеження життєвого простору.

Матеріали і методи дослідження

У дослідженні використано 55 нормотензивних щурів-самців лінії Wistar віком 6–10 місяців, що перебували на стандартному раціоні харчування при вільному доступі до води та їжі. Тварин поділили на 4 експериментальні групи: 1 – інтактний контроль (10 щурів); 2, 3 та 4 – по 15 щурів, які перебували в умовах обмеження життєвого простору.

Restraint-стрес моделювали шляхом обмеження простору клітки (нормальний розмір – 350 см²) на 40 % (210 см²) протягом 6, 15 і 21 тижня (2, 3 та 4 групи відповідно) при одномоментному перебуванні в клітці по 5 тварин. Для гальмування адаптаційних процесів і створення додаткових стресорних негараздів щотижня двох щурів із групи переміщували в іншу клітку в межах групи.

Артеріальний тиск (АТ) і масу тіла тварин вперше вимірювали на етапі формування груп, вдруге – на 6, 15 та 21 тижні. За допомогою системи неінвазивної реєстрації AT Blood Pressure Analysis Systems TM BP-2000 Series II (Visitech Systems, USA) вимірювали систолічний і діастолічний тиск за розробленим протоколом [3,4]. Концентрацію глюкози оцінювали двічі – на етапі формування груп і в день виведення тварин з експерименту. Концентрацію гормонів інсуліну, кортикостерону та адренокортикотропного гормону (АКТГ) визначали в плазмі крові тварин імуноферментним методом на автоматичному імуноферментному аналізаторі Thunderbolt® Analyzer (Gold Standard Diagnostics, США), використовуючи комерційні набори для щурів фірми Monobind, USA.

Усі результати опрацювали, використавши пакет прикладних і статистичних програм Excel 7.0 (Microsoft Corp., США) і програму Statistica 13.0 (ліцензія № JPC804I382130ARCN10-J). Розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії та помилки середньої (m). Для виявлення достовірності відмінностей результатів досліджень в експериментальних і контрольній групі щурів визначали коефіцієнт Стьюдента (t) для вибірки з нормальним законом розподілу даних і визначали критерій Манна-Вітні (U) для вибірки, дані якої не відповідали закону нормального розподілу. Після того визначали ймовірність відмінності вибірок (p). Вірогідними вважали значення, для яких $p_{St} \leq 0,05$.

Результати

Дослідження показало, що обмеження життєвого простору та скупчення тварин з часом формують цілий комплекс метаболічних і гормональних змін, які стають вагомими патогенетичними ланками розвитку хвороб, призводять до змін вагових характеристик і поступового підвищення АТ (табл. 1).

Аналіз вагових характеристик тварин показав: після 6 тижнів обмеження життєвого простору маса тіла щурів достовірно знижувалась на 20,72 %; на 15 тижні – відновила до вихідних показників; на 21 тижні стала перевищувати контрольні значення на 26,1 %. Показники АТ показали зростаючий тренд. Так, через обмеження рухів і соціальні стресори у тварин зафіксовано динамічне підвищення систолічного тиску на 7 %, 17 % та 26 % відповідно порівняно з контролем; діастолічного тиску – на 21,4 % на 15 тижні до 37,0 % на 21 тижні (табл. 1).

Аналізуючи динаміку коливання рівня глюкози в різні терміни спостереження, встановили, що у щурів усіх експериментальних груп вона достовірно відрізнялась від значень контролю, однак не виходила за межі еуглікемічного діапазону. Так, на 6 тижні зафіксовано вірогідне зниження рівня глікемії на 31,4 % з достовірним його збільшенням на 15 та 21 тижнях на 28 % та 17 % відповідно порівняно зі значеннями контролю ($4,61 \pm 0,09$ мМ/л).

Характер змін гормонального профілю показав реалізацію «класичних» механізмів адаптаційного синдрому: зростання концентрації АКТГ більше ніж на 50 % та зниження інсуліну на 34 % на 6 тижні з подальшим зменшенням його рівня у два рази (на 15 тижні) та наступним (більш ніж дворазовим) зростанням АКТГ на 21 тижні. Щодо змін концентрації кортикостерону, то виявили значне її зростання у 3,77 рази на 15 тижні з наступним зниженням та відновленням до нормативних значень на 21 тижні (табл. 1).

Обговорення

Встановили, що тривале обмеження життєвого простору у тварин і соціальні негаразди, як-от скупчення та постійна зміна партнерів, незважаючи на свою невиразність і прихований вплив, формують класичні симптоми

та стадії стрес-реакції, що реалізуються через механізми загального адаптаційного синдрому [5,6].

У досліджуваній моделі необхідно враховувати її характер, зокрема тривалий стрес низької інтенсивності, що не може бути подоланим, з постійною індукцією додатковими підпороговими стресорами, внаслідок чого відбуваються динамічні коливання процесів адаптації та дезадаптації [6] з формуванням типових патогномічних симптомів хвороб адаптації. Зазначимо «розмитість» симптомів і синдромів через низький ступінь виразності стресорного навантаження та його «розтягнутість» у часі. Більше того, класична тріада Г. Сельє не виходить на передній план [7]. Морфологічні зміни в ШКТ, тимусі та корі наднирникових залоз були незначними, а коливання гормонального профілю показали чітку стадійність, що відповідає етапам формування стрес-реакції, адаптації та дезадаптації [7].

Дослідження показало, що на 6 тижні обмеження життєвого простору тварин відбулося значне зменшення їхньої маси тіла на тлі збільшення концентрації АКТГ і зниження інсуліну. На 15 тижні рівень АКТГ залишався високим, що призвело до суттєвого збільшення рівня кортикостерону – основного гормону адаптації в щурів, а рівень інсуліну знизився ще більше. Гормональні коливання спричинили збільшення маси тіла щурів, але з'явився важливий симптом – стійке підвищення систолічного та діастолічного АТ. На 21 тижні надалі спостерігали зростання рівня АКТГ на тлі стабілізації кортикостерону та значне підвищення концентрації інсуліну. На нашу думку, саме ці гормональні зміни стали підґрунтям до формування метаболічних порушень, зриву адаптації та, як наслідок, зростання АТ з імовірним розвитком інсулінорезистентності [8,9].

Для стійкої адаптації зі зміною гомеостазу, що є важливою умовою подолання стресу, необхідне його завершення. Втім, у реальному житті є так звані безвихідні ситуації, коли вимоги середовища не можуть бути реалізовані за допомогою специфічних поведінкових або інших реакцій, при цьому формування адекватної відповіді й системного структурного сліду є неможливим, тому адаптація не відбувається, а постійні гормональні коливання формують стійкі метаболічні порушення [1,10].

Таблиця 1. Динаміка змін показників у щурів із restraint-стресом різної тривалості, $M \pm m$

Показник, одиниці вимірювання	Експериментальні групи			
	1 (контроль, n = 10)	2 (6 тижнів, n = 15)	3 (15 тижнів, n = 15)	4 (21 тиждень, n = 15)
Маса тварин, г	176,4 ± 9,4	152,0 ± 6,5*	183,5 ± 8,3	191,8 ± 6,5*
Артеріальний тиск (Рс/Рд), мм рт. ст.	115,05 ± 1,70 / 68,10 ± 1,20	123,40 ± 2,00* / 69,30 ± 1,90	135,10 ± 1,70* / 82,601 ± 3,20*	144,90 ± 1,90* / 93,20 ± 1,60*
Концентрація інсуліну, uIU/mL	2,660 ± 0,009	1,950 ± 0,007*	1,230 ± 0,005*	3,982 ± 0,015*
Концентрація АКТГ, pg/mL	23,70 ± 0,17	35,70 ± 0,231	34,40 ± 0,22*	48,80 ± 0,28*
Концентрація кортикостерону, mg/mL	89,40 ± 2,49	82,16 ± 2,75	336,60 ± 7,53	106,80 ± 2,37

*: достовірна різниця показників груп зі стресом різної тривалості ($p_{st} < 0,05$) щодо відповідних показників контрольної групи.

За певних обставин стрес-синдром із загальної неспецифічної ланки адаптації організму до різних факторів середовища перетворюється у неспецифічну ланку патогенезу захворювань, однак це не кінець життєвого процесу, а його проміжний етап. Більшість тварин і людей не вмирають від тривалих і повторних стресорних ситуацій, але в них формуються хронічні захворювання, які погіршують якість життя та скорочують його тривалість [1,11,12].

Висновки

1. Тривалі стресорні впливи низької інтенсивності, які діють постійно та не можуть бути подолані, стають

важливими тригерами формування порушення гормонального профілю та вуглеводного обміну, стійкого підвищення артеріального тиску.

2. Хронічний restraint-стрес зумовлює гормональні зміни, що на початку виявляються гіпоінсулінемією, збільшенням рівня АКТГ і сталістю концентрації кортикостерону. Тривалий стрес спричиняє підвищення АКТГ, збільшення рівнів кортикостерону й інсуліну.

3. Різностямовані коливання рівнів АКТГ, кортикостерону й інсуліну відбуваються на тлі поступового збільшення АТ і підвищення рівня глікемії.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медичного університету: «Роль пептидергічних структур гіпоталамуса та стовбура мозку в патогенезі артеріальної гіпертензії», держреєстрація № 0117U002579 (2017–2019).

Відомості про авторів:

Романова К. Б., асистент, каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0009-0000-1096-5314

Ганчева О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-7339-7078

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, в. о. ректора Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, заслужений діяч науки і техніки України.

ORCID ID: 0000-0002-1556-5085

Information about the authors:

Romanova K. B., MD, Assistant of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Hancheva O. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Acting Rector of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.

References

- [1] Russell G, Lightman S. The human stress response. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15:525-34. doi: 10.1038/s41574-019-0228-0.
- [2] Osborne DM, Pearson-Leary J, McNay EC. The neuroenergetics of stress hormones in the hippocampus and implications for memory. *Front Neurosci.* 2015;164. doi: 10.3389/fnins.2015.00164.
- [3] Kolesnyk YM, Hancheva OV, Abramov AV, Kolesnyk MY, Ivanenko TV, Tishchenko SV, et al. [Modern approaches and new methodological possibilities in the functional state of small laboratory animals assessing]. *Pathologia.* 2017;14(3):364-70. Russian. doi: 10.14739/2310-1237.2017.3.118770.
- [4] Kolesnyk YM, Kolesnyk MY, Hancheva OV, Isachenko MI. Left ventricular remodeling in normotensive Wistar rats exposed to intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia.* 2023;20(1):5-13. doi: 10.14739/2310-1237.2023.1.277406.
- [5] Arakawa H. Restraint stress activates defensive behaviors in male rats depending on age and housing condition. *Physiol Behav.* 2020;224:113073. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.113073.
- [6] Nagaraja AS, Sadaoui NC, Dorniak PL, Lutgendorf SK, Sood AK. SnapShot: Stress and Disease. *Cell Metab.* 2016;23(2):388-8.e1. doi: 10.1016/j.cmet.2016.01.015.
- [7] Szabo S, Yoshida M, Filakovszky J, Juhasz G. "Stress" is 80 Years Old: From Hans Selye Original Paper in 1936 to Recent Advances in GI Ulceration. *Curr Pharm Des.* 2017;23(27):4029-41. doi: 10.2174/1381612823666170622110046.
- [8] Kazakou P, Nicolaidis NC, Chrousos GP. Basic Concepts and Hormonal Regulators of the Stress System. *Horm Res Paediatr.* 2023;96(1):8-16. doi: 10.1159/000523975.
- [9] Grippo AJ, Johnson AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress.* 2009;12(1):1-21. doi: 10.1080/10253890802046281.
- [10] Romeo RD, Sciertino RK. Age-dependent changes in hormonal stress reactivity following repeated restraint stress throughout adolescence in male rats. *Stress.* 2021;24(5):496-503. doi: 10.1080/10253890.2021.1873945.
- [11] Mumtaz F, Khan MI, Zubair M, Dehpour AR. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2018;105:1205-22. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.086.
- [12] Charmandari E, Achermann JC, Carel JC, Soder O, Chrousos GP. Stress response and child health. *Sci Signal.* 2012;5(248):mr1. doi: 10.1126/scisignal.2003595