

16. Rubin R. T., Poland R. E., Sobel J. et al. // Ibid. — 1978. — Vol. 47, N 2. — P. 447–452.
17. Savage M. C., Lowe D. G. // Clin. Endocrinol. — 1990. — Vol. 32, N 4. — P. 519–533.
18. Scully R. E. // Cancer. — 1970. — Vol. 25. — P. 1340–1356.
19. Scully R. // Pediatr. and Adolesc. Endocrinol. — 1981. — Vol. 8. — P. 203–217.

20. Swerdloff R. S., Odell W. D. // The Testis in Normal and Infertile Men / Eds P. Troen, H. R. Nannkin. — New York, 1977. — P. 395.
21. Zarate A., Canales E. S., Soria J., Carballo O. // Am. J. Obstet. Gynecol. — 1974. — Vol. 119. — P. 971–977.
22. Zipf W. B., Payne A. H., Kelch R. P. // Endocrinology. — 1978. — Vol. 103, N 2. — P. 595–600.

Поступила 24.02.2000

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 616.12-008.331.1-02:613.863]-092.9

В. В. Булыгина, Л. Н. Маслова, А. Л. Маркель

ФУНКЦИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ У КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРУЕМОЙ СТРЕССОМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ*

Лаборатория генетических основ нейроэндокринной регуляции (зав. — доктор биол. наук Н. Н. Дыгало)
Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Проведено сравнительное исследование функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) в ходе развития крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) и нормотензивных крыс линии Вистар. Укрыс в возрасте 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 и 18 нед методом конкурентного белкового связывания определяли уровень кортикостерона в плазме периферической крови в состоянии покоя и через 1 ч после ограничения подвижности в сетчатых цилиндрах. Обнаружено, что у крыс гипертензивной линии базальный уровень кортикостерона и реакция ГГАС на стресс в ходе онтогенеза ниже, чем у крыс линии Вистар соответствующего возраста. Исключение составляет возраст 4 нед, когда у крыс НИСАГ начинает формироваться гипертензия и их ГГАС проявляет повышенную по сравнению с крысами линии Вистар чувствительность к эмоциональному стрессу, сопряженную с увеличенной реакцией надпочечников на АКТГ. Пониженная реакция ГГАС на эмоциональный стресс у взрослых крыс НИСАГ не связана с нарушением чувствительности надпочечников к АКТГ.

Functional activity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system (HPAS) was evaluated over time in rats with hereditary stress-induced arterial hypertension (HSIAH) and normotensive Wistar rats. Peripheral blood plasma corticosterone was measured in rats aged 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, and 18 weeks at rest and after 1-h immobilization in perforated cylinders by competitive protein binding. Basal corticosterone level and HPAS reaction to stress were lower in hypertensive rats than in Wistar rats of the same age. The only exclusion was the age of 4 weeks, when hypertension starts to form in HSIAH rats and their HPAS is more sensitive to emotional stress than that of Wistar rats, this sensitivity being associated with increased adrenal reaction to ACTH. Decreased HPAS reaction to emotional stress in adult HSIAH rats was not associated with disorders in adrenal sensitivity to ACTH.

Среди различных форм генетической предрасположенности к высокому артериальному давлению эссенциальная гипертензия возникает, казалось бы, спонтанно, без видимых внешних причин. Для исследования этого явления широко используется линия крыс со спонтанной артериальной гипертензией (SHR). Однако гипертоническая болезнь у человека наиболее часто появляется в результате взаимодействия генетической предрасположенности и специфических условий [8, 20], среди которых стресс рассматривается как фактор риска [4, 22]. Новая линия крыс с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) получена из популяции Вистар селекцией на высокий уровень артериального давления при стрессе и является адекватной моделью стресс-чувствительной артериальной гипертензии у человека [2, 11]. Обязательным компонентом любой стрессовой реакции является активация гипотала-

мо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС), функция которой, как правило, изменена при гипертензии [6, 9]. На основании опытов, проведенных на SHR, и клинических наблюдений возникло предположение о том, что избыток глюкокортикоидов может играть перmissive роль в патогенезе артериальной гипертензии [16, 18, 19]. В отношении крыс НИСАГ известно, что у взрослых животных адренокортикальная реакция на системный стресс не изменена, а на эмоциональный стресс снижена [12, 13]. Однако первые признаки повышенной стрессорной реактивности сердечно-сосудистой системы при измерении артериального давления непрямым методом появляются еще в возрасте 3 нед [13]. В то же время данные о возрастной динамике адренокортикальной функции у крыс линии НИСАГ отсутствуют. Поэтому целью данной работы явилось изучение возрастных закономерностей и особенностей функционирования ГГАС у крыс НИСАГ в ходе развития наследственной стресс-чувствительной артериальной гипертензии.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 99-04-50019.

Материалы и методы

В экспериментах использовали крыс линий НИСАГ и Вистар из популяции вивария Института цитологии и генетики СО РАН в возрасте 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 и 18 нед. До 4 нед крысят содержали с матерью и брали в опыт из гнезда. Остальных крыс содержали в группах и за 3—4 дня до опыта рассаживали в индивидуальные клетки. В каждой точке онтогенеза использовали отдельные группы животных и определяли уровень кортикостерона в плазме периферической крови в покое и при эмоциональном стрессе, вызванном 60-минутным ограничением подвижности в проволочных цилиндрах. Крыс забивали мгновенной декапитацией в 9—11 ч, плазму крови хранили при -40°C до определения.

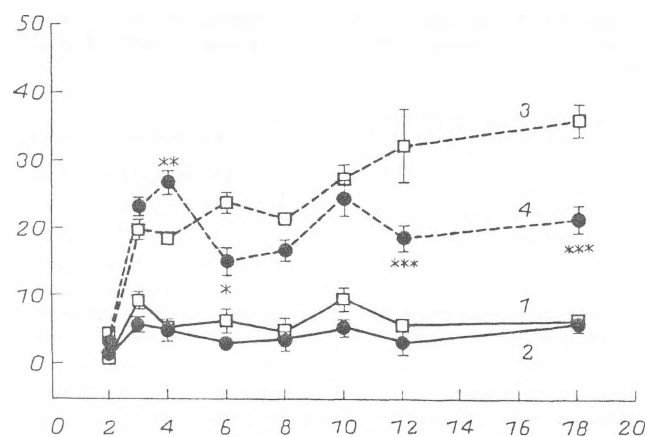
В отдельной серии экспериментов у самцов обеих линий в возрасте 4, 6 и 18 нед исследовали *in vivo* реакцию надпочечников на введение адренокортикотропного гормона (АКТГ). С целью блокады выделения эндогенного АКТГ всем животным вводили внутрибрюшинно суспензию дексаметазона ("Serva") в дозе 1 мг/кг массы тела в физиологическом растворе, в который был добавлен твин-80 для улучшения распределения препарата во взвеси. Далее животных делили на 2 группы. Через 3 ч животным 1-й группы вводили внутрибрюшинно раствор АКТГ ("Calbiochem") из расчета 30 мг/кг массы тела. Животные 2-й группы служили контролем и получали соответствующие объемы физиологического раствора. Крыс декапитировали через 20 мин после введения АКТГ.

Концентрацию кортикостерона в плазме периферической крови определяли методом конкурентного белкового связывания [5].

Статистическую обработку результатов при исследовании уровня кортикостерона в онтогенезе проводили с применением многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, STATISTICA 4.5), различия между группами выявляли на основании *post-hoc*-сравнений по Neuman—Keuls. Межлинейные различия в адренокортикальной реакции на АКТГ оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Трехфакторный дисперсионный анализ (2 линии крыс $\times$ 8 возрастных групп $\times$ 2 уровня кортикостерона — базальный и стрессорный) выявил достоверное влияние генотипа ($F_{1,334} = 29,0$; $p < 0,000001$), возраста ($F_{7,334} = 36,4$, $p < 0,000001$) и эмоционального стресса ($F_{1,334} = 750,3$; $p < 0,000001$). Достоверны были и все взаимодействия, что позволило провести последующий двухфакторный анализ отдельно для базального и стрессорного уровней гормона. Оказалось, что в целом по онтогенезу для крыс линии НИСАГ характерен более низкий по сравнению с нормотониками базальный уровень кортикостерона ($F_{1,146} = 8,7$; $p < 0,004$) (см. рисунок). Стрессорный уровень кортикостерона у крыс обеих линий минимален в возрасте 2 нед и существенно возрастает к 3 нед, что соответствует нормальной возрастной динамике стрессорной реактивности у крыс [17]. Дисперсионный анализ подтвердил влияние гено-



Возрастная динамика базального и стрессорного уровня кортикостерона в плазме крови у крыс линий Вистар и НИСАГ.

По оси ординат — уровень кортикостерона (в мкг/г ткани); по оси абсцисс — возраст крыс (в нед.).
1 — Вистар, покой; 2 — НИСАГ, покой; 3 — Вистар, стресс; 4 — НИСАГ, стресс.
В каждой экспериментальной группе по 9—25 животных. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — достоверные различия уровня гормона при эмоциональном стрессе по сравнению с линией Вистар.

типа на стрессовую реакцию ГГАС. У крыс линии НИСАГ уровень кортикостерона при эмоциональном стрессе в ходе онтогенеза снижен по сравнению с крысами линии Вистар ($F_{1,188} = 23,5$; $p < 0,000003$). Данные о сниженной адренокортикальной реакции на этот вид стресса у взрослых крыс НИСАГ были неоднократно получены в нашей лаборатории [1, 3, 10, 13—15]. Исключение составляет возраст 4 нед, когда стрессовая реакция на ограничение подвижности у крыс НИСАГ не ниже, а достоверно выше, чем у крыс линии Вистар. Следует отметить, что именно в это время у крыс НИСАГ обнаруживаются первые признаки формирования гипертензии [13].

Измененная адренокортикальная реакция на эмоциональный стресс может быть обусловлена функциональными особенностями ГГАС на разных уровнях: от афферентных влияний на гипоталамус до рецепции стероидов. В данной работе была исследована реакция надпочечников *in vivo* на АКТГ в период повышенной стрессорной реактивности ГГАС в возрасте 4 нед и в период ее снижения — у крыс в возрасте 6 и 18 нед. Обнаружено, что введение АКТГ у 4-недельных крысят НИСАГ приводит к большему повышению уровня кортикостерона в крови, чем у крыс-нормотоников (см. таблицу). Сходные результаты были получены и на линии SHR, но в возрасте 3 нед [7]. Та же тенденция прослеживается в 6 нед, и различие достоверно выражено у взрослых крыс. Интересно отметить, что в то время как в возрасте 6 и 18 нед дексаметазон вызывал снижение уровня кортикостерона в крови до неопределяемых количеств у всех крыс обеих линий, у некоторых 4-недельных животных его величина попадала в пределы чувствительности метода, хотя и оставалась очень низкой. Эти данные согласуются с результатами работы [21], в которой было обнаружено, что в возрасте 25 дней, т. е. около 4 нед, у крыс для полной блокады ГГАС нужна большая доза дексаметазона, чем у взрослых животных.

На основании полученных результатов можно полагать, что повышенная у крыс НИСАГ реакция ГГАС на эмоциональный стресс в возрасте 4 нед

Влияние АКТГ на уровень кортикостерона (в мкг/г ткани; $M \pm m$) в плазме крови у крыс разного возраста линий НИСАГ и Вистар

Возраст крыс и серии опытов	Вистар	НИСАГ
4 нед:		
дексаметазон + физиологический раствор	$0,67 \pm 0,14$	$0,29 \pm 0,12$
дексаметазон + АКТГ	$15,9 \pm 1,16$	$21,3 \pm 1,6$
6 нед:		
дексаметазон + физиологический раствор	Неопределяемый уровень	Неопределяемый уровень
дексаметазон + АКТГ	$37,2 \pm 1,98$	$41,2 \pm 1,14^*$
4 мес:		
дексаметазон + физиологический уровень	Неопределяемый уровень	Неопределяемый уровень
дексаметазон + АКТГ	$19,2 \pm 0,93$	$23,6 \pm 0,45^{**}$

Примечание. Звездочки — достоверность различий с линией Вистар: одна — при $p < 0,05$; две — при $p < 0,001$.

может быть частично обусловлена высокой чувствительностью надпочечников к АКТГ, хотя участие центральных механизмов в этом феномене также вероятно. У взрослых крыс гипертензивной линии более высокая адренокортикальная чувствительность к АКТГ тем не менее сочетается со слабым ответом на ограничение подвижности, что может свидетельствовать об ослаблении центральных механизмов, обеспечивающих реакцию ГГАС на этот стрессор. Исходя из данных эксперимента, можно предполагать, что повышенная адренокортикальная реактивность на начальном этапе формирования артериальной гипертензии может вносить вклад в развитие патологии. В то же время не исключено, что увеличенный ответ ГГАС на стресс в возрасте 4 нед только отражает общую усиленную чувствительность к стрессу у молодых крыс-гипертоников, но сам по себе более высокий уровень кортикостерона не играет роли в становлении гипертензивного статуса. Таким образом, вопрос о роли стресса и повышенной стрессорной реактивности ГГАС на начальных стадиях формирования наследственной артериальной гипертензии у крыс линии НИСАГ нуждается в дальнейшем исследовании.

Выводы

1. Базальный уровень кортикостерона в плазме крови и реакция ГГАС на эмоциональный стресс в целом по ходу онтогенеза у крыс НИСАГ ниже, чем у нормотензивных крыс линии Вистар. Исключение составляет возраст 4 нед, когда адренокорти-

кальная реакция на ограничение подвижности повышена у крыс гипертензивной линии.

2. На начальном этапе формирования гипертензии у крыс НИСАГ (возраст 4 нед) повышенная по сравнению с крысами линии Вистар чувствительность к эмоциональному стрессу сопряжена с увеличенной реакцией надпочечников на АКТГ. Пониженная реакция ГГАС на эмоциональный стресс у взрослых крыс НИСАГ не связана с нарушением чувствительности надпочечников к АКТГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дыгало Н. Н., Маркель А. Л., Науменко Е. В. // Бюл. экпер. биол. — 1987. — Т. 103, № 3. — С. 287—289.
2. Маркель А. Л. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1985. — Вып. 3, № 5. — С. 466—469.
3. Маркель А. Л., Дыгало Н. Н., Науменко Е. В. // Бюл. экпер. биол. — 1986. — Т. 102, № 6. — С. 678—680.
4. Судаков К. В. // Физиол. журн. — 1993. — Т. 79, № 8. — С. 22—33.
5. Тинников А. А., Бажан Н. М. // Лаб. дело. — 1984. — Т. 12. — С. 709—713.
6. Clark P. M. // Eur. J. Pediatr. — 1998. — Vol. 157. — Suppl. 1. — P. S7—S10.
7. Kenyon C. J., Panarelli M., Holloway C. D. et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1993. — Vol. 45. — P. 7—11.
8. Lifton R. P. // Science. — 1996. — Vol. 272. — P. 676—680.
9. Malee P. M., Wu K. Y. // Am. J. Hypertens. — 1999. — Vol. 12. — P. 511—518.
10. Markel A. L., Naumenko E. V. // Brain Res. — 1991. — Vol. 546. — P. 55—60.
11. Markel A. L. // Genetic Hypertension / Ed. J. Sassard. — London, 1992. — Vol. 218. — P. 405—407.
12. Markel A. L., Maslova L. N., Shishkina G. T. et al. // Handbook of Hypertension, Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies / Eds R. McCarty et al. — Amsterdam, 1999. — Vol. 19. — P. 493—526.
13. Maslova L. N., Shishkina G. T., Bulygina V. V. et al. // Neurosci. Behav. Physiol. — 1998. — Vol. 28. — P. 38—44.
14. Naumenko E. V., Markel A. L., Amstyslavski S. Y., Dygalo N. N. // Stress: Neurochemical and Humoral Mechanisms / Eds G. R. Van Loon et al. — New York, 1989. — Vol. 1. — P. 453—460.
15. Naumenko E. V., Maslova L. N., Shishkina G. T., Markel A. L. // Stress: Neuroendocrine and Molecular Approaches / Eds R. Kvetnansky et al. — New York, 1992. — P. 429—437.
16. Ruch W., Baumann J. B., Hausler A. et al. // Acta Endocrinol. (Kbh.). — 1984. — Vol. 105. — P. 417—424.
17. Sapolsky R. M., Meaney M. J. // Brain Res. Rev. — 1986. — Vol. 11. — P. 65—76.
18. Suzuki H., Zweifach B. W., Schmid-Schonbein G. W. // Int. J. Microcirculat. Clin. Exp. — 1995. — Vol. 15. — P. 309—315.
19. Suzuki H., Zweifach B. W., Schmid-Schonbein G. W. // Hypertension. — 1996. — Vol. 27. — P. 114—118.
20. Swales J. D. // Br. Med. Bull. — 1994. — Vol. 50. — P. 235—245.
21. Vazquez A. // Pediatr. Res. — 1993. — Vol. 34. — P. 646—653.
22. Yamori Y. // Handbook of Hypertension, Experimental and Genetic Model of Hypertension / Eds W. Birkenhager, J. Reid. — Amsterdam, 1984. — Vol. 4. — P. 240—255.

Поступила 19.02.2000