

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2017
УДК 621.1, 616-006.3

Вопросы онкологии, 2017. Том 63, № 4

В.Н. Крылов², Е.П. Лобкаева³, В.Д. Федотов¹ Л.В. Ошевенский², М.А. Шабалин²

Нарушения регуляции вегетативного тонуса у крыс с перевитой опухолью РС-1

¹Нижегородская государственная медицинская академия, г. Нижний Новгород

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород

³Российский федеральный ядерный центр экспериментальной физики, г. Саров

Методом анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР) установлено, что у крыс с перевитой опухолью РС-1 снижались, по сравнению с крысами без опухоли, показатели ВСР: общая мощность спектра (Тр), квадратичное отклонение (SDNN), высокочастотная составляющая (HF), свидетельствующие о выраженной симпатизации вегетативного тонуса. Применение стресс-тестов (ортостатическая проба, кратковременная иммобилизация) приводило к статистически значимым изменениям показателей ВСР, также отличным от контроля. Показано, что у животных-опухоленосителей в ответ на функциональные нагрузки снижались низкочастотные составляющие спектра (LF), свидетельствуя о нарушении регуляции тонуса ВНС — переходе симпатизации в парасимпатизацию — срыве адаптивных реакций.

Ключевые слова: онкология, вариабельность сердечного ритма, вегетативный тонус

Одним из путей повышения эффективности терапии онкологических заболеваний является изучение системных реакций организма на протекающий в нем патологический процесс. Известно, что одним из важнейших модификаторов функционального состояния организма при наличии опухоли является повышенная активность вегетативной нервной системы [16, 17]. Полагают, что перестройка функционирования ВНС в сторону симпатизации организма может быть обусловлена психоэмоциональным стрессом больных [10, 12]. В свою очередь, данная активация создает определенные гормональные сдвиги, изменения в деятельности сердечно-сосудистой и нервной систем. В организме повышается уровень клеточного метаболизма. Указанные процессы направлены на физиологическое обеспечение адаптации организма к новым условиям, каким представляется опухолевый процесс. Несомненно, исследование механизмов такой адаптации может внести определенный вклад в повышение эффективности терапии онкологических больных. Следует отметить, что исследование взаимосвязи

опухолевого процесса и стрессового статуса организма показано, в основном, только для человека с акцентом на его психоэмоциональный статус. Поэтому исследование названных процессов у животных позволит дифференцировать общую вегетативную реакцию организма от психической составляющей стресса. Вместе с тем необходимо указать, что при проведении на животных многодневного эксперимента может возникать объективная ошибка, связанная с изменением биоритмов и других внешних условий (время года, освещенность, температура, и т.п.). Поэтому показатели, регистрируемые у контрольных и опытных животных в состоянии относительного покоя, могут быть малоразличимы. В связи с указанным, лучшее представление о вегетативном статусе животных-опухоленосителей может быть получено в условиях реагирования организма на функциональные нагрузочные тесты.

В последнее время для исследования вегетативного статуса у человека и животных используют неинвазивный метод анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР) [2, 7]. Имеются многочисленные данные, свидетельствующие, что анализ ВСР может служить интегральным методом оценки механизмов регуляции физиологических функций, в частности, соотношения между симпатическим и парасимпатическим отделами ВНС [7], в том числе и у онкологических больных [13]. Продемонстрирована высокая информативность метода для оценки у экспериментальных животных изменений физиологической регуляции тонуса при физических и эмоциональных нагрузках [3, 14].

Целью работы было изучение вегетативного тонуса у крыс с привитой опухолью РС-1 и его изменения при ортостатической пробе и кратковременной иммобилизации.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись нелинейные белые крысы массой 180 — 200 грамм в количестве 40 животных. Крысы содержались на общем рационе вивария. Исследования на животных проводили в соответствии с требовани-

ями Женевской конвенции. В ходе эксперимента животным прививали опухоль PC-1 (альвеолярный рак печени, штамм опухоли получен из опухолевого банка НИИ ЭДИТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). У крысы-носителя опухоли PC-1 брали 20 г опухоли в месте, которое было не затронуто некротическими процессами. Опухоль помещали в раствор питательной среды, измельчали в пресс — резаке, перемешивали. Фильтровали через сито (диаметр ячейки 0,5 мм). Перевивку опухоли (1 мл 30% взвеси опухолевых клеток в питательной среде) осуществляли подкожно в паховую область справа [4]. По истечении 10 дней (латентный период роста опухоли) было отобрано 12 животных, имевших опухоль размерами 0,5×0,5 см. По истечении 18 дней животные наркотизировались диэтиловым эфиром и выводились из эксперимента путем декапитации, после чего проводили морфометрическое исследование опухоли [8].

Вегетативный статус у животных-опухоленосителей исследовали на 18 сутки после прививки. Контролем служила группа крыс без опухоли (n=12). Реакции вегетативной нервной системы исследовали с применением компьютерной программы для анализа ВСР, созданную нами на базе пакета LAB View 8,0, по записям ЭКГ (стандартное отведение, интервалы R-R). Электроды для регистрации ЭКГ размещали на спине подкожно, по линии позвоночника, с применением местной анестезии (введение 0,5% лидокаина в количестве 0,2-0,3 мл в месте установки электрода). Для анализа использовали показатели временного анализа (частоту ритма сердца HR, стандартное отклонение нормальных кардиоинтервалов SDNN, коэффициент вариации CV, квадратный корень разности величины последовательностей пар кардиоинтервалов RMSSD); геометрического анализа (вариационный размах Dx, мода Mo, амплитуда моды AMo, стресс-индекс SI) и спектрального анализа: TP(Total)мс² (суммарная мощность спектра variability сердечного ритма), HFмс² (мощность спектра высокочастотного компонента variability), LFмс² (мощность спектра низкочастотного компонента variability. LF/HF усл.е. (отношение значений низкочастотного и высокочастотного компонента variability сердечного ритма), относительное значение мощности спектра высокочастотного (HF%) и низкочастотного (LF%) компонентов variability. Спектральный анализ ряда R—R-интервалов проводился на основе алгоритма быстрого преобразования Фурье с использованием всех точек без сглаживания. При этом учитывали периодические составляющие спектра: высокочастотные (HL) и низкочастотные (FL, имеющие периодичность в диапазоне (0,9-3,5 Гц) и (0,32-0,9 Гц), соответственно, полагая, что высокочастотные колебания отражают преимущественно активацию парасимпатической системы, а низкочастотные колебания связаны с активностью постганглионарных симпатических волокон и отражают модуляцию сердечного ритма симпатической нервной системой [7].

Реакции вегетативных регуляторных систем оценивали по ортостатической неустойчивости организма (ортостатическая проба) и по реакции организма на кратковременную иммобилизацию животных, фиксированных на спине 15-20 минут [5]. Для оценки ортостатической неустойчивости у крыс использовали позу, приводящую к повышению притока крови к сердцу. Для этого крыс фиксировали на столе, спиной вверх, угол наклона туловища (поза Тренделенбурга) составлял — 30 градусов. При проведении активной ортостатической пробы угол наклона тела животного изменяли поворотом стола, при этом поворот составлял 90 градусов от горизонта.

Исследование проводили по следующей схеме: после 15-ти минутной адаптации у крысы регистрировали ЭКГ в течение 3 мин. Затем стол поворачивали так, что животное принимало вертикальное положение головой вверх (ортостатическая проба). Регистрировали ЭКГ в течение 3

мин. При тесте краткосрочной иммобилизации животные фиксировались на столе животом вверх, в таком положении крысы удерживались 20 минут. По истечении этого времени у животных вновь регистрировали ЭКГ. В качестве контроля анализировали ВСР у крыс без опухоли (контрольная группа). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием T-критерия Стьюдента, вычисляя $M \pm m$. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

В результате исследований установлено, что перевивка 1 мл 20% суспензии раковых клеток крысам приводит к развитию опухоли PC-1. Морфометрический анализ показал, что через 18 дней после прививки размер опухоли в опытной группе (n=12) составил $18839 \pm 5191 \text{ мм}^2$, а масса опухоли составляла $12,05 \pm 2,56$ г. Полученные параметры соответствуют стандартному развитию данной опухоли, привитой лабораторным животным (крысам) [8].

Анализ ВСР животных показал, что у крыс контрольной группы (без опухоли) вегетативный статус соответствовал уровню бодрствующих животных, и соответствовал показателям ВСР крыс по данным литературы [9]. Также стандартно изменялись показатели ВСР в ответ на ортостатическую пробу и кратковременный иммобилизационный стресс (табл.). Как видно из таблицы, в ответ на функциональные нагрузки большинство показателей составляющей спектра ВСР — LF и ее отношения к высокочастотной — LF/HF. Выявленные изменения показателей свидетельствовали об умеренной активации симпатической части ВНС животных в ответ на нагрузочные тесты.

В отличие от этого, у крыс-опухоленосителей уже в исходном состоянии прослеживалась повышенная активность симпатического отдела ВНС: по сравнению с интактными животными, у крыс с опухолью был статистически значимо повышен стресс-индекс SI, прослеживалась тенденция к снижению общей мощности спектра Tr, вариационного размаха Dx, квадратичного отклонения SDNN и др. (Табл.). Однако более значимое отличие в состоянии вегетативного тонуса у крыс с опухолью было выявлено при анализе реакций на ортостатическую неустойчивость и кратковременную иммобилизацию. В отличие от контрольной группы, и тот и другой тесты продемонстрировали переход активации симпатического тонуса ВНС в активацию парасимпатической системы. В ответ на тестовое воздействие у крыс-опухоленосителей показатели ВСР характеризовались, в отличие от показателей у крыс без опухоли, противоположной направленностью изменений: уменьшались показатели ВСР (LF, LF/HF и др.). Полученные результаты позволя-

Таблица. Показатели вариабельности сердечного ритма у крыс с перевитой опухолью РС-1 (под чертой) и крыс без опухоли (контроль, над чертой)

Показатели ВСР	Исходный вегетативный статус	Тест, ортостатическая неустойчивость	Тест, краткосрочная иммобилизация (стресс)
ЧСС, уд/мин	432.0±6.04 435.0±1.85	430.0±6.42 444.0±1.34	430.0±9.74 401±2.38
Мо, с.	0.14±0.00 0.14±0.00	0.14±0.00 0.14±0.00	0.14±0.00 0.15±0.00
Амо, %	44.31±5.74 26.99±0.77 #	33.97±3.52 * 25.18±1.27 #	35.22±4.38 28.28±1.51 #
Дх, с.	0.03±0.00 0.02±0.00	0.03±0.00 0.02±0.00	0.03±0.00 0.02±0.00
SI, усл.е.	4537.2±301.4 5689.17±181.6 #	4525.8±517.3 5201.17±226.1	5308.5±829.9 5322.17±325.1
SDNN, с.	3.09±0.23 2.58±0.22	3.53±0.42 2.74±0.26 #	3.08±0.67 2.94±0.42
RMSSD, с.	2.06±0.23 1.35±0.14 #	2.05±0.47 1.35±0.98	2.10±0.29 1.58±0.13#
CV, %	2.23±0.19 1.88±0.06 #	2.56±0.30 2.02±0.08 #	2.69±0.47 1.97±0.11 #
Тр (total), мс2	2.77±0.47 1.73±0.27 #	3.58±0.68 1.36±0.19 #*	3.92±0.98 1.80±0.28 #*
LF, мс2	0.63±0.12 0.57±0.04	1.05±0.24* 0.37±0.03 #*	1.04±0.28* 0.37±0.02 #
HF, мс2	1.58±0.22 0.65±0.04 #	1.69±0.28 0.69±0.04 #	2.24±0.65 1.16±0.08 #
LF/HF, усл.е.	0.40±0.03 0.91±0.04 #	0.60±0.13* 0.55±0.03 *	0.56±0.09 * 0.35±0.01 #*
LF, %	23.04±1.43 31.28±0.79 #	25.97±2.01 25.80±0.73 *	25.92±1.29 21.27±0.82 #*
HF, %	60.20±3.09 39.77±1.84 #	53.83±4.88 52.07±1.69	53.75±4.41 62.43±0.95 #*

Примечание: SDNN — стандартное отклонение нормальных интервалов R-R, CV-коэффициент вариации, RMSSD-квадратный корень из суммы квадратов разности последовательных интервалов R-R, Дх-вариационный размах, Мо- мода, АМо-амплитуда моды, SI-стресс-индекс, Тр(Total) — суммарная мощность спектра, HF — мощность спектра высокочастотного компонента вариабельности, LF — мощность спектра низкочастотного компонента, LF/HF — отношение низкочастотного и высокочастотного компонента, HF — относительное значение мощности спектра высокочастотного, и LF — низкочастотного компонентов вариабельности; статистическая значимость различий показателей (p<0,05): # — по отношению к интактной группе, *- по отношению к исходному вегетативному статусу

ют предположить, что при нагрузочных тестах у крыс-опухоленосителей происходит не только снижение симпатического тонуса, но и активация парасимпатической системы.

Обсуждение

В наших опытах было установлено, что у крыс с перевитой опухолью РС-1 изменяется как базовый вегетативный тонус, так и его реакции на функциональные нагрузочные тесты, отличающиеся от таковых у контроля (крысы без опухоли). В условиях относительного покоя животные-опухоленосители характеризуются повышенной активностью симпатического тонуса, то есть, состоянием ВНС, наблюдаемом у онкологических больных [10, 12, 17]. Эти наблюдения позволяют предположить, что психологическая составляющая не играет у раковых больных определяющего фактора в симпатизации тонуса ВНС, которая, по-видимому, является автономным регуляторным процессом, связанным с появлением эндогенного стресс-фактора. В данном случае таким фактором является привитая опухоль. Вместе с тем, продолжающееся, по мере развития опухоли стрессовое состояние может трансформироваться в дистресс со всеми его не-

гативными последствиями для организма. Так, Szpunar et al. [20] представили доказательства стимулирующего влияния симпатической нервной системы на рост опухоли. Авторы отмечают, что стресс фактор индуцирует секрецию норадреналина периферическими симпатическими волокнами, что является важным фактором развития опухоли. Соответственно, ограничение симпатикотонии может приводить к ингибированию опухолевого роста. Изучая активность симпатической нервной системы у крыс с гепатоцеллюлярной карциномой, Huan et al. [18] установили, что ингибирование симпатических влияний на ткань печени приводит к торможению роста опухоли, секреции провоспалительных цитокинов и факторов роста. Имеются данные о цитотоксическом действии предшественника адреналина и норадреналина – дофамина [6], возможно, связанное с его свойством угнетать ангиогенез в опухолевой ткани [19]. Цитотоксическое действие симпатотропных медиаторов было установлено и в более ранних исследованиях. Так, введение предшественника дофамина – L-ДОФА угнетало спонтанный канцерогенез молочных желез у мышей С3Н/Sp [15] и индуцируемый ДМБА канцерогенез молочной железы у крыс [1].

Обсуждая значимость исследований нарушения вегетативного статуса онкологических больных, сошлемся на недавнюю работу Arab et al. [13]. Авторы проанализировали 12 крупных исследований, посвященных вариабельности сердечного ритма у пациенток с раком молочной железы, и сделали заключение, что нарушения автономной регуляции сердца у таких пациентов носят разнонаправленный характер. Тем не менее, по мнению авторов, анализ ВСР позволяет оценить прогноз в плане лечения и выживаемости пациентов. Следует отметить, что во всех упомянутых исследованиях, в том числе выполненных на животных-опухоленосителях, в основном оценивался лишь базовый уровень тонуса ВНС. Между тем, как следует из наших данных, этот уровень может изменяться при проведении функциональных нагрузочных тестов. Полученные нами в опытах на животных данные могут свидетельствовать о срыве адаптации и переходе эрготропного метаболизма (следствие симпатизации) в трофотропный – (следствие парасимпатизации) – из-за истощения энергетических субстратов в ответ на нагрузку [7, 11]. Из рассмотренного материала следует, что применение функциональных тестов может быть важным для оценки резерва адаптации у онкологических больных по анализу ВСР.

ЛИТЕРАТУРА

- Анисимов В.Н., Остроумова М.Н., Дильман В.М. Торможение буформином, дифенином, полипептидным экстрактом эпифиза и L-ДОФА бластомагенного эффекта 7,12-диметилбенз(а)антрацена у самок крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1980. – Т. 89. – № 6. – С. 723-725.
- Баевский Р.М., Иванов Г.Г. Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения. – М.: Медицина, 2000. – 295 с.
- Дворников А.В., Мухина И.В., Крылов В.Н. Изменение вариабельности сердечного ритма в условиях эмоционального стресса у крыс на фоне блокатора адренорецепторов // Нижегородский медицинский журнал. – 2003. – № 1. – С. 17-22.
- Дыдыкина В.Н., Зотова Ю.Д., Мочалова А.Е. и др. Влияние наноструктурированной системы хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота на активность свободно-радикальных процессов, адаптацию системы крови и рост новообразования у крыс с перевитой опухолью РС-1 // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 2. – С. 41-48.
- Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Антипенко Е.А. Электрофоретическая подвижность эритроцитов как способ оценки функции коры надпочечников при стрессе и патологических состояниях организма // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2013. – Т. 9. – № 2. – С. 39-42.
- Мошков Д.А., Парнышкова Е.Ю. Средство, обладающее цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам человека в культуре. Патент на изобретение № 2453309. Заявка 2011118520/15 от 11.05.2011.
- Ноздрачев А.Д., Щербатых Ю.В. Современные способы оценки функционального состояния вегетативной нервной системы // Физиология человека. – 2001. – Т. 27. – № 6. – С. 95-101.
- Райхлин Н.Т., Андропова Н.В., Герасимова Г.К. и др. Морфологическая и биохимическая характеристика холангиоцеллюлярного рака РС-1 при подкожной и внутрипеченочной трансплантации // Экспериментальная онкология. – 2001. – № 2. – С. 126-130.
- Сальников Е.В. Вариабельность сердечного ритма у крыс с экспериментальной хронической сердечной недостаточностью, длительно получавших бета-адреноблокаторы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147. – № 2. – С. 139-143.
- Семионкин Е.И. Психовегетативный статус больных колоректальным раком // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2011. – № 3. – С. 64-66.
- Сидоренко Г.И., Комиссарова С.М. Определение адаптационного резерва организма на основе показателей вариабельности сердечного ритма // Международный медицинский журнал. – 2007. – № 2. – С. 45-49.
- Юдаева Ю.А., Иванов К.М., Корнякова А.Р., Юльметова И.Г. Вегетативный статус больных после хирургического лечения рака пищевода // Фтизиатрия и пульмонология. – 2016. – № 1. – С. 74-75.
- Arab C., Dias D., Barbosa R. et al. Heart rate variability measure in breast cancer patients and survivors: A systematic review // Psychoneuroendocrinology. – 2016. – Vol. 68. – P. 57-68.
- Carles S., Gcunier D., Pathak A. et al. Effect of physical and mental stress on HR and HVR before and after exercise training among patients with cardiac diseases // European Journal of Heart Failure. – 2007. – Vol. 6 (1). – P. 179-185.
- Dilman V.M., Anisimov V.N. Effect of treatment with phenformin, diphenylhydantoin or L-DOPA on life span and tumor incidence in C3H/Sn mice // Gerontology. – 1980. – Vol. 26. – № 5. – P. 241-246.
- Guo Y., Koshy S., Hui D. et al. Prognostic value of heart rate variability in patients with cancer. // Journal Clinical Neurophysiology. – 2015. – № 32 (6). – P. 516-520.
- Kim K., Chae J., Lee S. The role of heart rate variability in advanced non-small-cell lung cancer patients // Journal Palliative Care and Medicine. – 2015. – № 31(2). – P. 103-108.
- Huan H.B., Wen X.D., Chen X.J. et al. Sympathetic nervous system promotes hepatocarcinogenesis by modulating inflammation through activation of alpha1-adrenergic receptors of Kupffer cells. // Brain, Behavior and Immunity. – 2016. – Pii: S0889-1591(16)30404-4.
- Sarkar C., Chakroborty D., Dasgupta P., Basu S. Dopamine is safe antiangiogenic drug which can also prevent 5-fluorouracil induced neutropenia // International Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 137. – Is.3. – P. 744-749.
- Szpunar M.J., Belcher E.K., Dawes R.P., Madden K.S. Sympathetic innervation, norepinephrine content, and norepinephrine turnover in orthotopic and spontaneous models of breast cancer // Brain, Behavior and Immunity. – 2016. – Vol. 53. – P. 223-233.

Поступила в редакцию 05.05.2016 г.

*V.N. Krylov², E.P. Lobkaeva³, V.D. Fedotov¹,
L.V. Oshevsky², M.A. Shabalin²*

**Autonomic tonus regulation disorders in rats
with a transplanted tumor PC-1**

¹ Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny
Novgorod

² N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University,
Nizhny Novgorod

³ Federal State Unitary Enterprise Russian Federal
Nuclear Center All-Russian Research Institute of
Experimental Physics, Sarov

By means of analysis of the heart rate variability method (HRV) it was discovered that the HRV rates (total capacity of the Tp spectrum, the squared deviation SDNN, high-frequency component HF) of the rats, which had the implanted tumor PC-1 were decreasing in comparison with the control group (the rats without a tumor), which indicated a significant sympathizing of the vegetal tonus. The use of stress-tests (the orthostatic test, short-term immobilization) led to statistically significant variation of HRV rates, which also differed from the control group. It was demonstrated that the low-frequency components LF of the spectrum of the tumor-bearing animals decreased in response to functional stress, which signified the disorder of tonus regulation in autonomic nervous system, i.e. the changing of sympathizing over to parasympathizing, the breakdown of adaptive response.

Key words: oncology, heart rate variability, autonomic status