

МЕТАБОЛИЗМ КОЛЛАГЕНА И ПОКАЗАТЕЛИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА У КРЫС ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНОМ СТРЕССЕ

Д. Г. Иванов¹, В. Г. Подковкин²

¹ *Институт экспериментальной медицины и биотехнологий
Самарского государственного медицинского университета*

² *Самарский государственный университет*

Поступила в редакцию 24.04.2009 г.

Аннотация. Было исследовано влияние хронического стресса на обмен коллагена и показатели минерального обмена крыс. Обнаружено снижение уровня свободного оксипролина — маркера катаболизма коллагена в крови крыс, подвергавшихся стрессу, и сдвиги в обмене кальция и магния. Введение феназепама на фоне действия стрессора предотвращало активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и предупреждало влияние стресса на минеральный обмен, но не на метаболизм коллагена. Обсуждается участие костной ткани в реакции организма на стресс.

Ключевые слова: хронический стресс, феназепам, коллаген, минеральный обмен

Abstract. It was investigated the chronic stress effect on collagen and markers of mineral metabolism in rats. The decreasing of free oxyproline blood level (marker of collagen metabolism) and changes in calcium and magnesium metabolism in rats under stress were showed. The phenazepam injection in stress condition was averted hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation and prevented stressor's effect on mineral metabolism, but had not effect on collagen metabolism. The role of bone tissue in stress-reaction was discussed.

Keywords: chronic stress, phenazepam, collagen, mineral metabolism.

ВВЕДЕНИЕ

По данным медицинской статистики около 90 % всех заболеваний связано со стрессом [1]. При этом механизмы развития многих патологий до конца не изучены, а давление стресса на организм возрастает [2]. Исследования психосоматических эффектов стресса должны помочь профилактике стресс-индуцированных заболеваний и расширить число методов коррекции стресса.

Ранее нами было показано, что острый стресс, вызванный помещением животных в тесные контейнеры, приводит к изменению уровня метаболитов коллагена в крови [3], большая часть которых относится к белку костной ткани [4]. При этом обмен коллагена в условиях острого стресса зависит от индивидуально-типологических особенностей животных. Тем не менее, метаболизм коллагена при хроническом стрессе у крыс в данных условиях исследован не был. Кроме того, оставалось неясно изменяется ли активность катаболизма, анаболизма коллагена исключительно в результате развития стресса или имеют место какие-либо другие факторы, связанные с особенностями экспериментального воздействия.

Учитывая это, целью настоящей работы было исследовать обмен коллагена и показатели обмена фосфора, кальция, магния у крыс при хроническом семисуточном стрессе на фоне введения феназепама.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Работа выполнена на белых беспородных крысах. Все процедуры над животными проводились в соответствии с международными нормами [5].

Согласно целям эксперимента крыс делили на три группы. Рандомизацию экспериментальных групп проводили методом парных аналогов по массе и эмоциональному статусу в тесте «Открытое поле» (табл. 1). Эмоциональный статус животных определяли по суммарному числу дефекаций и уринаций за три минуты нахождения крысы в «Открытом поле». Тестирование проводили за 7 суток до введения животных в эксперимент.

Первая группа состояла из интактных крыс, которых выводили из эксперимента одновременно с животными двух других групп, и являлась контрольной.

На крысах второй группы моделировали ситуацию хронического стресса. Для этого животных ежедневно в течение 7 суток на пять с половиной

Таблица 1

Средние показатели массы и эмоциональный статус животных в группах после рандомизации

Группа	Контроль	Хронический стресс	Хронический стресс на фоне введения феназепама
Число животных в группе	14	12	12
Масса, г	118,6±8,3	115,7±10,2	116,7±4,3
Эмоциональный статус, число дефекаций и уринаций	4,29±0,94	4,29±1,34	5,00±1,69

часов помещали в пластмассовые цилиндрические камеры с отверстиями для доступа воздуха. Размер камер, как в длину, так и в диаметре превышал размеры крысы на 0,5—1 см, что позволяло ей переворачиваться внутри камеры и изменять свою позу.

В третью группу входили животные, подвергавшиеся хроническому стрессу вышеописанным способом, которым вводили феназепам. Препарат вводили *per os*, в дозе 10 мг/кг массы, в виде суспензии продажного препарата в воде. Введение феназепама начинали за 24 часа до первого сеанса помещения животного в камеру, затем препарат вводили в течение 30 минут после окончания каждого сеанса стрессирующего воздействия. Крысам первой и второй групп по аналогичной схеме спаивали эквивалентные объемы воды.

По истечению сроков воздействия животных выводили из эксперимента путем декапитации.

В ходе эксперимента крыс взвешивали дважды. До введения в эксперимент и после истечения сроков экспериментального воздействия. По результатам взвешивания рассчитывали прирост массы животного, как разность массы до введения крыс в эксперимент и массы тех же животных после воздействия.

Определяли массу надпочечников. Относительную массу этих желез выражали в процентах от массы тела крысы.

Плазму крови декапитированных крыс собирали с 5 % раствором ЭДТА. Уровень 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в плазме определяли по методу [6]. Содержание свободного и белковосвязанного оксипролина в крови анализировали с *n*-диметиламинобензальдегидом [7].

Для анализа содержания L-аскорбиновой кислоты и ее метаболитов дегидроаскорбиновой и дикетоглулоновой кислот в надпочечниках готовили гомогенат правого надпочечника в 10 % ТХУ. Уровень аскорбиновой кислоты и ее дериватов в гомо-

генатах определяли по методу [8] и пересчитывали на массу железы.

Кальций в сыворотке определяли мурексидным методом [9], концентрацию фосфора в крови исследовали по реакции с молибденовым реактивом [10], магний в сыворотке определяли колориметрическим методом по реакции с калмагитом при помощи набора Biola-test.

Для проверки однородности дисперсий в группах применяли критерии Ливена. Средние результаты в группах сравнивались с помощью стандартного *t*-критерия Стьюдента, с учетом поправки Бонферрони [11]. Все статистические расчеты были выполнены в программе SPSS 13.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ежедневное влияние стрессогенной ситуации в течение семи суток приводило к снижению массы крыс и повышению функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) в виде увеличения массы надпочечников и возрастания уровня 11-ОКС в крови (табл. 2).

Вместе с этим происходили биохимические сдвиги в коре надпочечников, свидетельствующие об активизации процессов синтеза глюкокортикоидов. Это обнаруживалось в снижении уровня дериватов аскорбиновой кислоты в железах. При этом концентрация самой аскорбиновой кислоты не изменялась.

Введение феназепама не предотвращало снижения массы тела крыс, но предупреждало активизацию ГГНС. Относительная масса надпочечников и концентрация дериватов аскорбиновой кислоты в них у крыс, которым вводили феназепам, не отличалась от значений этих показателей в контрольной группе. Кроме того, введение феназепама снижало уровень 11-ОКС в крови.

В результате развития хронического стресса у крыс изменялась активность процессов катаболиз-

Таблица 2

Изменение показателей, характеризующих развитие стрессовой реакции у крыс при хроническом стрессе на фоне введения феназепама

Показатель	Группа		
	Контроль	Хронический стресс	Хронический стресс на фоне введения феназепама
Прирост массы животных, г	11,1±1,3	-3,5±1,0*	-2,2±1,3*
Относительная масса надпочечников, %	0,023±0,001	0,033±0,001*	0,027±0,001 [#]
11-ОКС в плазме мкг/мл	1,44±0,13	1,88±0,13*	0,93±0,08* [#]
Концентрация аскорбиновой кислоты, мкг/г	198,51±15,10	177,62±21,65	177,65±10,28
Концентрация дериватов, мкг/г	503,16±46,62	339,95±22,79*	549,42±49,52 [#]

* — уровень значимости результатов относительно показателей контроля $p < 0,05$; [#] — уровень значимости результатов относительно показателей группы, подвергающихся хроническому стрессу $p < 0,05$.

Таблица 3

Изменение показателей обмена коллагена у крыс при хроническом стрессе на фоне введения феназепама

Показатель	Группа		
	Контроль	Хронический стресс	Хронический стресс на фоне введения феназепама
Уровень свободного оксипролина в плазме, мкг/мл	1,36±0,06	1,04±0,07*	0,99±0,06*
Уровень белковосвязанного оксипролина в плазме, мкг/мл	13,06±0,91	14,87±0,96	11,08±0,5 [#]

* — уровень значимости результатов относительно показателей контроля $p < 0,05$; [#] — уровень значимости результатов относительно показателей группы, подвергающихся хроническому стрессу $p < 0,05$.

ма и анаболизма коллагена. Это обнаруживалось по изменению уровня свободного и белковосвязанного оксипролина в крови животных (табл. 3), обнаруживающееся по снижению уровня свободного оксипролина в крови — маркера катаболизма коллагена. Введение крысам феназепама не препятствовало развитию указанных изменений.

Вместе с изменением метаболизма коллагена изменялись и показатели минерального обмена у крыс. В результате хронического стресса у животных увеличивался уровень магния, и снижалась концентрация ионов кальция в крови. Хотя в данном случае введение феназепама предупреждало влияние стресса на минеральный обмен. Уровень, кальция и магния в крови животных, которым вводили феназепама, не отличался от контрольных значений.

Таким образом, ежедневное влияние стрессогенной ситуации в течение 7 суток оказывало стрессовое воздействие на крыс, в результате, которого изменялась активность процессов метаболизма коллагена и показатели обмена фосфора, кальция и магния.

Согласно классической концепции под стрессом понимают неспецифический ответ организма на предъявленные ему требования [12]. Этот ответ всегда сопровождается напряжением гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС) и симпатoadренальной систем (САС), выбросом в кровь кортикостероидов и катехоламинов, и изменениями в организме, характерными для действия этих гормонов. В нашей работе, развитие стресс реакции определялось по увеличению массы надпочечников, возрастанию уровня 11-ОКС в крови, сниже-

Изменение показателей обмена фосфора, кальция, магния у крыс при хроническом стрессе на фоне введения феназепама

Показатель	Группа		
	Контроль	Хронический стресс	Хронический стресс на фоне введения феназепама
Содержание фосфора, мг/л	10,36±0,29	10,89±0,32	10,89±0,63
Содержание кальция, ммоль/л	4,54±0,27	3,24±0,16*	4,56±0,22
Содержание магния, ммоль/л	1,15±0,05	1,33±0,02*	1,21±0,03 [#]

* — уровень значимости результатов относительно показателей контроля $p < 0,05$; # — уровень значимости результатов относительно показателей группы, подвергающихся хроническому стрессу $p < 0,05$.

нию концентрации производных аскорбиновой кислоты, и снижению массы тела крыс.

Тем не менее, активизация функции ГГНС и САС на молекулярном уровне обеспечивается достаточно сложными механизмами, включающими в себя медиаторные системы головного мозга, и интегрируется гипоталамусом [13]. На этом уровне развитие стресс-реакции зависит как от индивидуально-типологических особенностей организма [2], так и от особенностей стрессора [14]. Воздействие при помощи химических веществ на пути синтеза или рецепторы медиаторов позволяет управлять функциональной активностью ГГНС и САС, и, как следствие, стресс-реакцией в целом.

Феназепам относится к группе транквилизаторов бензодиазепинового ряда. Действие препаратов этой группы по современным представлениям реализуется через ГАМК-рецепторы, структурно и функционально сопряженные с хлорным каналом. Связывание лиганда с рецептором стимулирует проникновение ионов хлора внутрь клетки и, как следствие, гиперполяризацию мембраны, препятствующей развитию потенциала действия [15]. Введение феназепама крысам в эксперименте, предотвращало физиологическое повышение активности ГГНС в условиях стресса. Это доказывает, что выбранный способ воздействия на крыс приводил к развитию эмоционального стресса.

Согласно нашим работам [3,16], активизация процессов метаболизма коллагена, наблюдается в условиях острого и хронического стресса, и не зависит от характера стрессирующего фактора. Тем не менее, на динамику уровня метаболитов коллагена в крови при остром стрессе влияли

индивидуально-типологические характеристики крыс [3]. На основании данных А. М. Герасимова и Л. Н. Фурцевой [4] содержание метаболитов коллагена в виде свободного и белковосвязанного оксипролина в биологических жидкостях отражает в основном метаболизм костного коллагена. Поэтому можно полагать, что изменения уровня свободного и белковосвязанного оксипролина в крови крыс при эмоциональном стрессе, обнаружившиеся в данной работе, отражают, в первую очередь, катаболизм коллагена костной ткани.

Косвенно на это указывает и изменение показателей обмена, кальция, магния у крыс. Вероятно, что на ранних этапах костной резорбции костной ткани, вследствие диссоциации гидроксиапатита, концентрация кальция в крови увеличивается, однако, далее за счет системы, регулирующей уровень кальция и фосфора в крови, динамика этих показателей приобретает волнообразный вид. Вследствие того, что магний участвует в процессах образования кристаллов гидроксиапатита кости [17], его уровень в крови также претерпевает изменения.

В целом можно полагать, что в результате хронического стресса, активируется функция коры надпочечников. Это приводит к выбросу глюкокортикоидов в кровь. Увеличение уровня этих гормонов в крови оказывает непосредственное ингибирующее влияние на остеобласты и активирует остеокласты, то есть запускает механизмы костной резорбции. Кроме того, этим процессам способствует подавление эндокринной функции семенников и стимуляцию секреции паратиреоидного гормона, под действием глюкокортикоидов [18]. В целом, это сопровождается изменением уровня

метаболизма коллагена и концентрации кальция, фосфора и магния в крови. Введение феназепама, через активацию ГАМК-рецепторов предотвращает развитие стресс-реакции, и, как следствие, изменения вызванные стрессом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ежедневное помещение животных в пластиковые контейнеры на пять с половиной часов в течение семи суток приводило к характерным для стресса изменениям. В результате экспериментального воздействия снижалась масса животных, увеличивалась относительная масса надпочечников, возрастал уровень 11-ОКС в крови, и снижалась концентрация дериватов аскорбиновой кислоты в железах. Введение феназепама на фоне хронического стресса препятствовало развитию указанных изменений, но не влияло на снижение массы тела животных. Хронический стресс, действующий на протяжении семи суток, приводил к изменениям в метаболизме коллагена и обмене фосфора кальция и магния. Введение феназепама предотвращало изменения минерального обмена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корыстов Ю. Н. Эмоции, стресс, курение, потребление алкоголя и рак корреляционные и причинные связи / Ю. Н. Корыстов // Журнал ВНД им. Павлова. — 1997. — №4. — С. 627—657.
2. Исмаилова Х. Ю. Индивидуальные особенности поведения: (моноаминергические механизмы) / Х. Ю. Исмаилова, Т. М. Агаев, Т. П. Семенова. — Баку: Нурлан, 2007. — 228 с.
3. Подковкин В. Г. Изменение показателей метаболизма коллагена у крыс с различным эмоциональным статусом при остром стрессе / В. Г. Подковкин, Д. Г. Иванов // Успехи современного естествознания. — 2008. — №11. — С. 5—17.
4. Герасимов А. М. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии / А. М. Герасимов, Л. Н. Фурцева. — М.: Медицина, 1986. — 240с.
5. European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/ЕЕС.
6. Подковкин В. Г. Микромодификация метода определения 11-оксикортикостероидов / В. Г. Подковкин. Деп. в ВИНТИ 4.7.1988 №5348-В 88.
7. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 392 с.
8. Соколовский В. В. О методе раздельного определения АК, ДАК, и дикетогулоновой кислот (ДКГК) в биологических тканях / В. В. Соколовский, Л. В. Лебедева, Т. Б. Лиэлуп // Лабораторное дело. — 1974. — №3. — С. 160—162.
9. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Т. 2 / В. С. Камышников. — Минск: Беларусь, 2000. — 495с.
10. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 226с.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Практика, 1998. — 459с.
12. Селье Г. Когда стресс не приносит горя / Г. Селье. — М.: Рэнар, 1992. — 160с.
13. Сапронов Н. С. Фармакология гипоталамо-надпочечниковой системы / Н. С. Сапронов. — СПб.: Специальная литература, 1998. — 336с.
14. Pacak K. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders / K. Pacak, M. Palkovits // Endocrine reviews. — 2001. — V.22, № 4. — P. 502—548.
15. Лекарственные средства в психофармакологии / Ю. И. Губский [и др.] — Киев: Здоров'я, Харьков: Торсинг, 1997. — 288с.
16. Подковкин В. Г. Состояние коры надпочечников и динамика содержания оксипролина у крыс при термическом воздействии / В. Г. Подковкин, Д. Г. Иванов // Вестник Самарского государственного университета. — 2006. — №9. — С. 237—243.
17. Aoba T. Competitive adsorption of magnesium and calcium ions onto synthetic and biological apatites / T. Aoba, E. C. Moreno, S. Shimoda // Calcif. Tiss. Int. — 1992. — V. 51, N 2. — P. 143—150.
18. Дедов И. И. Первичный и вторичный остеопороз: патогенез, диагностика, принципы профилактики и лечения / И. И. Дедов, Л. Я. Рожинская, Е. И. Марова. — М.: Медицина, 2002. — 143с.

Подковкин Владимир Георгиевич — д.б.н., профессор кафедры биохимии Самарского государственного университета; тел.: (846) 2780942, e-mail: podkovkin@rambler.ru

Podkovkin Vladimir G. — Dr of Biology, Prof. of Samara State University, department of biochemistry; tel.: (846) 2780942, e-mail: podkovkin@rambler.ru

Иванов Дмитрий Геннадьевич — научный сотрудник, Самарский государственный медицинский университет, Институт экспериментальной медицины и биотехнологий; тел.: (927) 7021917, e-mail: dg1983@rambler.ru

Ivanov Dmitriy G. — Ph.Dr., science researcher of Experimental Medicine and Biotechnologies Institute of Samara Medicine University; tel.: (927) 7021917, e-mail: dg1983@rambler.ru