УДК 57,033

Подковкин В.Г.[1], Иванов Д.Г.[2]
[1]Самарский государственный университет
[2]Самарский государственный медицинский университет
E-mail: podkovkin@rambler.ru, dg1983@rambler.ru

ВЛИЯНИЕ ФЕНАЗЕПАМА НА МЕТАБОЛИЗМ КОЛЛАГЕНА У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

В работе обсуждается роль центральной нервной системы в регуляции метаболизма коллагена. Показано, что в условиях хронического стресса на фоне повышенной активности гипоталамо-гипофизарной системы увеличивается интенсивность процессов катаболизма и анаболизма коллагена у крыс. Ежедневное введение феназепама per os в дозе 10 мг/кг массы животного полностью предотвращает эффект хронического стресса на метаболизм коллагена.
Ключевые слова: коллаген, стресс, феназепам, крыса.

Введение

Поиск новых методов лечения заболеваний соединительной ткани требует разработки экспериментальных моделей на животных. В настоящее время предложено несколько способов индукции катаболизма соединительной ткани в эксперименте. В их числе особое место занимают модели, основанные на повышении уровня глюкокортикоидов в крови за счет создания условий, вызывающих у животного развитие стресс-реакции. К таким моделям можно отнести иммобилизационную [1], холодовую [2] и термическую [3].

Основываясь на предположении, что ведущую роль в этих моделях играет активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, можно допустить, что введение препаратов, обладающих седативным действием, в частности применение транквилизаторов, предотвратит разрушение коллагена в условиях хронического стресса у крыс.

Целью данной работы было проанализировать роль структур центральной нервной системы в регуляции метаболизма коллагена и возможность применения феназепама для предотвращения деградации соединительной ткани у крыс при хроническом стрессе.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 34 белых беспородных крысах-самцах. Все процедуры над животными проводились в соответствии с международными правилами работы с лабораторными животными [4].

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 крыс определяли по суммарному числу дефекаций и уринаций за три минуты нахождения животного в открытом поле. Тест «Открытое поле» проводили за 7 суток до введения животных в эксперимент.

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

У животных второй группы моделировали ситуацию хронического стресса. Для этого животных ежедневно в течение 9 суток на пять с половиной часов помещали в пластмассовые цилиндрические камеры с отверстиями для доступа воздуха. Размер камер, как в длину, так и в диаметре превышал размеры животного на 0,5–1 см, что позволяло животному переворачиваться внутри камеры и свободно изменять свою позу. То есть данный способ воздействия не являлся иммобилизацией.

В третью группу входили животные, подвергавшиеся хроническому стрессу вышеописанным способом, которым вводили феназепам. Препарат вводили per os, в дозе 10 мг/кг массы, 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 истечении сроков воздействия животных выводили из эксперимента путем декапитации.

У декапитированных крыс для анализа на содержание 11-оксикортикостероидов, свобод-

ного и белковосвязанного оксипролина собирали плазму крови с 5% раствором ЭДТА. Уровень 11-оксикортикостероидов определяли по методу Ю.А. Панкова, И.Я. Усватовой, в модификации В.Г. Подковкина [5]. Концентрацию свободного и белковосвязанного оксипролина определяли по реакции с *n*-диметиламинобензальдегидом [6].

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

Для анализа содержания L-аскорбиновой кислоты и ее метаболитов дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот в надпочечниках готовили гомогенат правого надпочечника в 10% ТХУ. Уровень аскорбиновой кислоты и ее дериватов в гомогенатах определяли по методу [7] и пересчитывали на массу железы.

Проверку результатов на нормальное распределение проводили с помощью критерия Шапиро - Уилкинса. Средние результаты в группах сравнивались с помощью стандартного t-критерия Стьюдента [8].

Результаты

В результате ежедневного помещения животных в камеры на пять часов у крыс повышалась активность коры надпочечников, выражающаяся в увеличении массы надпочечников и уровня 11-оксикортикостероидов в крови относительно этих показателей у контрольных животных (табл. 2). У крыс, которым вводили феназепам, реакции со стороны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы не наблюдалось.

Вместе с тем у животных, подвергавшихся стрессирующему воздействию, происходили биохимические сдвиги в коре надпочечников, связанные с синтезом глюкокортикоидов. Это обнаруживалось в виде снижения уровня окисленных производных аскорбиновой кислоты: дегидроаскорбиновой кислоты и дикетогулоновой кислоты – в коре надпочечников относительно этого показателя у контрольной группы животных (табл. 3).

У животных, подвергавшихся хроническому стрессу на фоне введения феназепама, на-

Таблица 1. Результаты рандомизации экспериментальных групп

Группа	Контроль	Хронический стресс	Хронический стресс на фоне введения феназепама
Число животных в группе	12	12	10
Масса, г	126,47±10,16	126,83±4,49	123,66±7,01
Эмоциональный статус, число дефекаций и уринаций	3,67±1,99	2,83±1,56	2,60±1,66

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
Относительная масса надпочечников, %	0,024±0,002	0,028±0,001*	0,024±0,002#
Содержание 11-ОКС в плазме, мкг/мл	0,379±0,037	0,564±0,048*	0,485±0,050

*– уровень значимости результатов относительно показателей контроля $p<0,05$
– уровень значимости результатов относительно показателей группы, подвергающейся хроническому стрессу, $p<0,05$

Таблица 3. Изменение показателей обмена аскорбиновой кислоты в надпочечниках у крыс при хроническом стрессе на фоне введения феназепама

Показатель	Группа		
	контроль	хронический стресс	хронический стресс на фоне введения феназепама
Концентрация аскорбиновой кислоты, мкг/г	153,2±19,0	173,9±28,1	148,7±26,3
Концентрация дериватов, мкг/г	1313,5±46,8	912,1±19,2*	1501,2±74,2*#

*– уровень значимости результатов относительно показателей контроля $p<0,05$
– уровень значимости результатов относительно показателей группы, подвергающейся хроническому стрессу, $p<0,05$

Таблица 4. 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	0,77±0,02	1,05±0,08*	0,79±0,06#
Уровень белковосвязанного оксипролина в плазме, мкг/мл	9,80±0,38	11,64±0,54*	8,34±0,23*#

*– уровень значимости результатов относительно показателей контроля $p<0,05$
– уровень значимости результатов относительно показателей группы, подвергающейся хроническому стрессу, $p<0,05$

против, наблюдалось повышение уровня окисленных форм аскорбиновой кислоты в надпочечниках, вероятно, связанное со снижением функциональной активности гипоталамуса и гипофиза в результате действия феназепама на уровне структур лимбической системы. Уровень собственно L-аскорбиновой кислоты в надпочечниках крыс в результате экспериментальных воздействий не изменялся.

В крови крыс, подвергавшихся ежедневному помещению в пластиковые камеры, повышался относительно контроля уровень свободного оксипролина – маркера деградации коллагена. Введение феназепама полностью предотвращало этот эффект хронического стресса на метаболизм соединительной ткани (табл. 4).

На процессы синтеза коллагена в условиях хронического стресса введение феназепама действовало иначе. Как видно из данных таблицы 4, действие стрессирующего фактора приводило к увеличению белковосвязанного оксипролина, являющегося маркером активности процессов синтеза коллагена. Введение феназепама на фоне хронического стресса оказывало ингибирующий эффект на анаболизм коллагена. Уровень белковосвязанного оксипролина в крови крыс этой группы снижался ниже значений этого показателя в контроле.

Обсуждение

Изменение активности процессов метаболизма коллагена в условиях хронического стресса наблюдалось нами ранее на термической модели [3]. На основании данных А.М. Герасимова и Л.Н. Фурцевой [9] содержание метаболитов коллагена в виде свободного и белковосвязанного оксипролина в биологических жидкостях отражает в основном метаболизм костного коллагена. Повышенная активность процессов костной резорбции в термической модели хронического стресса была также подтверждена морфометрически и гистологически [10]. Поэтому можно полагать, что хронический стресс в данной работе индуцировал в первую очередь катаболизм коллагена костной ткани. Хотя данные о деградации коллагена соединительной ткани в других органах в результате развития стрессовой реакции и роли структур головного мозга в этих процессах в литературе представлены [1].

При хроническом стрессе активируется функция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, что приводит к выбросу глюкокортикоидов в кровь. Увеличение уровня этих гормонов в крови оказывает ингибирующее влияние на остеобласты и активирует остеокласты, оказывая прямое и косвенное воздействие на эти клетки.

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, препятствующую развитию потенциала действия [11]. Наибольшая плотность ГАМК-рецепторов, способных связывать бензодиазепины, была выявлена в коре мозга и гипокампе [11].

Введение феназепама крысам предотвращает физиологическое повышение активности ГГНС в условиях стресса на уровне структур центральной нервной системы. В результате этого выброса глюкокортикоидов в кровь не происходит и уровень катаболизма коллагена не изменяется.

Повышение активности анаболизма коллагена в условиях хронического стресса, вероятно, связано с системами, сопрягающими активность остеобластов и остеокластов в костной

ткани. В частности, на эту роль подходит недавно изученная система RANK/RANKL [12].

Заключение

Таким образом, помещение животных в пластиковые камеры приводило к развитию хронического стресса, характеризующегося увеличением массы надпочечников, повышением уровня 11-ОКС и снижением уровня окисленных производных аскорбиновой кислоты в надпочечниках. На фоне хронического стресса повышался уровень свободного и белковосвязанного оксипролина – показателей активности процессов катаболизма и анаболизма коллагена. Эти эффекты стресса полностью снимались оральным введением феназепама, что доказывает участие структур центральной нервной системы в регуляции метаболизма коллагена.

Список использованной литературы:

1. Васильева, Н. Н. Изменение обмена коллагена при сочетании иммобилизационного стресса с электрической стимуляцией стресс-лимитирующих структур / Н.Н. Васильева, Е. В. Елисеева, Л. С. Исакова, А. Ю. Овечкин // Вестник новых медецинских технологий. 2002. №1. С. 27.
2. Киреев, А.А. Регенерация костной ткани при холодовой травме в условиях лечения изотиорбамином: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.А. Киреев. Якутск, 2006. 24 с.
3. 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.
4. Guide for the care and use of laboratory animals Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. – 128 p.
5. Микромодификация метода определения 11-оксикортикостероидов / В.Г. Подковкин. Деп. в ВИНИТИ 4.7.1988 №5348-В 88
6. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. 392 с.
7. 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.
8. Фролов, Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование / Ю.П. Фролов. Самара: Изд-во СамГУ, 1997. 265 с.
9. Герасимов А.М., Фурцева Л.Н. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии / А.М. Герасимов, Л.Н. Фурцева. М.: Медицина, 1986. 240 с.
10. Подковкин, В.Г., Адекватность комплексного биометрического показателя кости гистологическому анализу при термическом воздействии / В.Г. Подковкин, Д.Г. Иванов // Наука. Творчество: Коняевские чтения. Т. 2. Самара, 2007. С. 369.
11. Губский, Ю.И. Лекарственные средства в психофармакологии / Ю.И. Губский, В.А. Шаповалова, И.И. Кутько, В.В. Шаповалов. Киев: Здоров'я, Харьков: Торсинг, 1997. 288 с.
12. Беневоленская, Л.И. Патогенез остеопороза / Л.И. Беневоленская, Е.Л. Насонов // Руководство по остеопорозу. – М.: Бином. Лаборатория знаний. 2003. – С. 77-104.

Podkovkin V.G., Ivanov D.G.
PHENAZEPAM INFLUENCE OF COLLAGEN METABOLISM OF RATS AT CHRONIC STRESS

This article discusses the role of the central nervous system in the regulation of collagen metabolism. It is shown that in conditions of chronic stress on the background of increased activity of the hypothalamic-pituitary system, the intensity of the catabolism processes and anabolism of collagen of rats increases. Daily introduction of phenazepam per os in a dose of 10 mg / kg of the animal mass completely prevents the effect of chronic stress on the metabolism of collagen.

Key words: collogen, stress, fenasepam, rat

Сведения об авторах:

Подковкин Владимир Георгиевич профессор кафедрs биохимии
Самарского государственного университета, доктор биологических наук
Тел. 8 (846) 3371787, e-mail: podkovkin@rambler.ru

Иванов Дмитрий Геннадьевич сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории
Самарского государственного медицинского университета, кандидат биологических наук
Тел. 8(84635) 21531, e-mail: dg1983@rambler.ru