

Биохимические критерии острого и хронического стресса при иммобилизации крыс

А.И. Гурская*, Е.А. Отвалко*, Н.М. Яцковская**, А.А. Чиркин*

*Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

**Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Адаптация организма к стрессовым факторам характеризуется активацией специфических и неспецифических реакций и процессов. Количественными характеристиками протекающих изменений принято считать динамику биохимических показателей. Последние, в свою очередь, позволяют выявить существенные различия в развитии острого и хронического стресса.

Цель исследования – анализ биохимических показателей обмена веществ в сыворотке крови крыс при моделировании острого и хронического стресса.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 29 беспородных белых крыс-самцов со средней массой тела 220 г. Животные были разделены на три группы: контроль, острый стресс и хронический стресс. В сыворотке крови определяли содержание глюкозы, мочевины, мочевой кислоты, холестерина, общего белка, билирубина, активность аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, креатинфосфокиназы и щелочной фосфатазы.

Результаты и их обсуждение. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы и уменьшается концентрация триглицеридов. Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при обоих вариантах стрессового воздействия, но содержание мочевины увеличивается при остром стрессе. Острый стресс приводит к достоверному уменьшению уровня общего белка в сыворотке крови при одновременном увеличении содержания холестерина липопротеинов низкой плотности и величины отношения холестерин липопротеинов низкой плотности/холестерин липопротеинов высокой плотности. Выявлено статистически достоверное увеличение активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы и креатинфосфокиназы в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса.

Заключение. Обоснованы биохимические критерии острого и хронического иммобилизационного стресса у крыс.

Ключевые слова: стресс, иммобилизация, крысы, сыворотка крови, биохимические показатели.

Biochemical Criteria of Acute and Chronic Stress of Immobilized Rats

A.I. Gurskaya*, E.A. Otvalko*, N.M. Yatskovskaya**, A.A. Chirkin*

*Educational Establishment «Vitebsk State P.M. Masherov University»

**Educational Establishment «Vitebsk State Medical University»

Adaptation of the organism to stress factors is characterized by the activation of specific and non-specific reactions and processes. Dynamics of biochemical indicators is considered to be quantitative characteristics of ongoing changes. These indicators, in their turn, make it possible to identify significant differences in the development of acute and chronic stress.

The aim of the study was to analyze the biochemical parameters of metabolism in the blood serum of rats during the modeling of acute and chronic stress.

Material and methods. 29 white male rats with an average body weight of 220 g were observed. The animals were divided into three groups: the test, the acute stress and the chronic stress. Glucose, urea, uric acid, cholesterol, total protein, bilirubin, activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatine phosphokinase and alkaline phosphatase were determined in serum.

Findings and their discussion. It was found out that with acute stress in comparison with chronic stress in blood serum the concentration of glucose significantly increases and the concentration of triglycerides decreases. The content of bilirubin, uric acid and total cholesterol in the blood serum does not change with both variants of stress, but the urea content increases with acute stress. Acute stress leads to a significant decrease in the level of total protein in the blood serum with simultaneous increase in the cholesterol content of low density lipoproteins and the ratio of cholesterol of low-density lipoprotein/cholesterol of high density lipoprotein. A statistically significant increase in the activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatine

phosphokinase in the blood serum of animals subjected to both acute and chronic stress was revealed. The activity of alkaline phosphatase does not change with both immobilization stresses.

Conclusion. *The article substantiates the biochemical criteria of acute and chronic immobilization stress in rats.*

Key words: *stress, immobilization, rats, serum, biochemical parameters.*

Проблема стресса на сегодняшний день сохраняет высокую медико-социальную значимость. Стресс характеризуют как комплекс общих универсальных неспецифических реакций на агенты, угрожающие жизни и благополучию целостного организма, реализуемый при обязательном участии нейроэндокринной системы. Стресс является наиболее важной защитно-приспособительной реакцией, сложившейся в процессе эволюции как средство сохранения жизни в постоянно меняющихся условиях среды обитания. Адаптация организма к действию стресс-факторов наступает либо в результате изменения физиологических констант с сохранением уровня метаболических процессов (физиологическая адаптация), либо за счет нарушения гомеостаза обмена веществ (биохимическая адаптация) [1]. Независимо от природы стресс-индуцирующего воздействия она обладает универсальностью. Животный организм реагирует на стресс стереотипным набором биохимических и физиологических процессов, протекание которых обеспечивает неспецифическую или срочную адаптацию [2–6].

Факторы внешней среды, к которым адаптируется организм, действуя различными путями, в конечном результате приводят к одному и тому же общему комплексу сдвигов – дефициту энергообеспечения, увеличению потенциала фосфорилирования и мобилизации энергетических ресурсов. В результате описанных событий цепь метаболических реакций приводит к экспрессии генов, определяющих чувствительность клеток к действию стрессоров и продолжительность жизни эукариотических организмов [7; 8]. Однако фенотипические проявления экспрессии генов при стрессе в виде изменений показателей метаболизма являются более доступными, что нашло широкое применение при исследовании проблемы взаимосвязи стресса и метаболического синдрома [9–11].

Цель исследования – анализ биохимических показателей обмена веществ в сыворотке крови крыс при моделировании острого и хронического стресса.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 29 беспородных белых крыс-самцов со средней массой тела 220 г. Животные были разделены на три группы. Первую группу «Интактные крысы» составили 10 животных (контроль). Во вторую группу «Острый стресс» вошли 12 крыс, которые фиксировались в положении на спине на протяжении 6 часов. Кровь для исследования забиралась через 40 мин после завершения фиксации животных. Третью группу составили 7 животных, которые ежедневно в течение 90 минут на протяжении 14 суток помещались в пеналы для иммобилизации (группа «Хронический стресс»). Для исследования кровь забиралась через 24 часа после завершающей иммобилизации.

В сыворотке крови экспериментальных животных определяли содержание глюкозы (глюкозооксидазный метод) и общего белка (биуретовый метод), используя наборы фирмы «Ольвекс Диагностикум»; общего билирубина (метод Йендрашика–Грофа), мочевой кислоты (уриказный метод). С помощью лабораторного анализатора Mindray BS-200 (Китай) и наборов фирмы «Sprinreact» устанавливали содержание мочевины (уреазный кинетический метод), общего холестерина (метод CHOD-PAP энзиматический), холестерина липопротеинов высокой плотности – ХС ЛПВП (метод прямой ферментативный), триглицеридов (метод CHOD-PAP энзиматический), холестерина липопротеинов низкой плотности – ХС ЛПНП (метод прямой ферментативный); оценивали активность аспартатаминотрансфераз – АсАТ и аланинаминотрансфераз – АлАТ (IFCC), щелочной фосфатазы – ЩФ (DEA-буфер), активность общей креатинфосфокиназы – КФК (метод DOKS) с помощью наборов фирмы «Анализ МЕД». В процессе лабораторных исследований контроль качества проводился с использованием контрольных сывороток «Мультиконт Витал (РФ): «Нормальный уровень» серия 164234-01 и «Патологический уровень» серия 161770-01.

Полученный цифровой материал вводился в электронные таблицы «Microsoft Office Excel» и после проверки на правильность распределения обрабатывался параметрическим методом вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены данные о зависимости соотношения молекул, транспортирующих энергию в кровеносном русле, от типа стрессового воздействия.

Из анализа данных табл. 1 следует, что при остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы в 1,29 раза и уменьшается концентрация триглицеридов в 2,05 раза. Такие изменения обеспечивают статистически достоверное увеличение коэффициента глюкоза/триглицериды в 2,65 раза. Следовательно, шестичасовая фиксация животных в нефизиологическом положении приводит к мобилизации углеводных ресурсов клеток, что усиливает транспорт глюкозы, на фоне частичного истощения содержания триглицеридов в кровеносном русле. По всей видимости, это рациональная форма перераспределения соотношения транспортных форм энергии, поскольку для центральной нервной системы глюкоза является наиболее быстро мобилизуемым и предпочтительным источником обеспечения клеток энергией. При хроническом стрессе отмечаются признаки адаптации, поскольку концентрация глюкозы

статистически достоверно повышена только в 1,13 раза, а уровень циркулирующих триглицеридов находится в пределах контрольных значений. В итоге значения коэффициента глюкоза/триглицериды практически не отличаются от контрольных значений.

Таблица 1

Транспортные формы энергии при остром и хроническом стрессе

Группа крыс	Глюкоза, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л	Глюкоза/триглицериды
Контроль	6,98±0,23	1,17±0,10	5,96±0,55
Острый стресс	9,02±0,55 ¹	0,57±0,02 ¹	15,8±0,87 ¹
Хронический стресс	7,87±0,25 ¹	1,25±0,14	6,30±0,52

Примечание: ¹ – P<0,05 по сравнению с группой крыс «Контроль».

В табл. 2 представлены данные о содержании некоторых конечных продуктов обмена веществ от характера стрессового воздействия.

Таблица 2

Конечные продукты метаболизма при остром и хроническом стрессе

Группа крыс	Мочевина, ммоль/л	Билирубин, ммоль/л	Мочевая кислота, моль/л	Холестерол, ммоль/л
Контроль	5,41±0,19	3,97±0,09	0,10±0,01	1,60±0,09
Острый стресс	6,77±0,35 ¹	4,27±0,20	0,11±0,01	1,70±0,12
Хронический стресс	5,46±0,11	3,73±0,19	0,10±0,01	1,63±0,11

Примечание: ¹ – P<0,05 по сравнению с группой крыс «Контроль».

Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при обоих вариантах стрессового воздействия, но содержание мочевины увеличивается при остром стрессе. Причинами роста концентрации сывороточной мочевины в результате шестичасовой иммобилизации могут быть два процесса: либо это усиление синтеза мочевины при повышенном катаболизме гликогена в печени, либо уменьшение фильтрационной функции почек за счет спазма сосудов при остром стрессе. Следовательно, можно сделать заключение, что при испытанных моделях стрессового воздействия не нарушаются превращения гемоглобина в билирубин, пуриновых азотистых оснований нуклеотидов и нуклеиновых кислот до мочевой кислоты и пути синтеза холестерина из основного метаболита общего пути катаболизма – ацетил-КоА.

В табл. 3 представлены данные о содержании транспортных форм белков при остром и хроническом стрессе.

Таблица 3

Транспортные формы белков при остром и хроническом стрессе

Группа крыс	Общий белок, г/л	ХС ЛПВП, ммоль/л	ХС ЛПНП, ммоль/л	ХС ЛПНП/ХС ЛПВП
Контроль	83,3±2,06	0,69±0,03	0,91±0,02	1,32±0,07
Острый стресс	68,4±0,83 ¹	0,64±0,04	1,06±0,03 ¹	1,65±0,09 ¹
Хронический стресс	79,0±0,90	0,73±0,04	0,90±0,04	1,23±0,11

Примечание: ¹ – P<0,05 по сравнению с группой крыс «Контроль».

Из анализа данных, приведенных в табл. 3, следует, что острый стресс приводит к достоверному уменьшению общего белка в сыворотке крови при одновременном увеличении содержания холестерина липопротеинов низкой плотности и величины отношения ХС ЛПНП/ХС ЛПВП. Такие результаты возможны при тканевом депонировании крови при остром стрессе, приводящем к уменьшению циркулирующей плазмы крови и кажущемуся накоплению в ней глобулинов, транспортирующих холестерол [6]. Поскольку уровень общего холестерина в сыворотке крови у этих животных не изменялся, можно, вероятно, в увеличении показателей ХС ЛПНП и ХС ЛПНП/ХС ЛПВП видеть признаки проатерогенного действия острого стресса.

В табл. 4 представлены данные о ферментах, присутствующих в сыворотке крови крыс при действии стрессового фактора.

Таблица 4

Ферменты плазмы крови при остром и хроническом стрессе

Группа крыс	АлАТ, Ед/л	АсАТ, Ед/л	ЩФ, Ед/л	КФК, Ед/л
Контроль	73,7±4,64	207±15,1	190±18,7	2769±176
Острый стресс	101,8±4,83 ¹	480±26,4 ¹	193±16,1	4561±303 ¹
Хронический стресс	91,4±3,38 ¹	253±14,9 ¹	195±20,5	4087±357 ¹

Примечание: ¹ – P<0,05 по сравнению с группой крыс «Контроль».

Данные табл. 4 свидетельствуют о том, что проницаемость мембран клеток паренхиматозных органов может быть наиболее уязвимым процессом при действии стрессовых факторов. Такое заключение иллюстрирует статистически достоверное увеличение активности АлАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы, являющейся индикатором состояния мембран клеток желчевыводящих путей и костной ткани, не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса.

Зависимость активности ферментов от характера стрессового воздействия наиболее четко проявляется при сравнении некоторых коэффициентов. Например, величины коэффициента АсАТ/АлАТ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе составили 2,81, 4,71 и 2,77, соответственно, что означает: острый стресс вызывает преимущественный выход в плазму крови аспарат-аминотрансферазы, вероятно, из мышечных тканей. Величины коэффициента КФК/ЩФ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе составили 14,57, 23,6 и 20,9, соответственно. Такие изменения подтверждают факт выхода КФК из мышечной ткани при обоих вариантах стресса. И, наконец, сравнение величин коэффициента КФК/АсАТ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе (13,4, 9,5 и 16,2, соответственно) показывает, что при остром стрессе выход в кровь АсАТ выше, чем аналогичный выход КФК. Однако при хроническом стрессе преобладает выход в кровеносное русло креатинфосфокиназы, что свидетельствует о повреждении саркомеров мышечных волокон.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что фенотипические показатели обмена веществ в сыворотке крови позволяют выявить существенные различия в развитии острого и хронического стресса. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы в 1,29 раза и уменьшается концентрация триглицеридов в 2,05 раза. Такие изменения обеспечивают статистически достоверное увеличение коэффициента глюкоза/триглицериды в 2,65 раза. Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при обоих вариантах стрессового воздействия, но содержание мочевины увеличивается при остром стрессе. Острый стресс приводит к достоверному уменьшению уровня общего белка в сыворотке крови при одновременном увеличении содержания холестерина липопротеинов низкой плотности и величины отношения ХС ЛПНП/ХС ЛПВП. Выявлено статистически достоверное увеличение активности АлАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шидловский, В.А. Современные теоретические представления о гомеостазе / В.А. Шидловский // Итоги науки и техники. Сер., Физиология человека и животных. – М., 1982. – Т. 25. – С. 3–18.
2. Дерхо, М.А. Особенности стресс-реакции организма мышей при комбинированном воздействии сульфата кадмия и вибрации / М.А. Дерхо, Т.И. Серёда, О.А. Хижнева // Современные концепции научных исследований. – 2014. – № 6. – Ч. 4. – С. 101–103.
3. Бусловская, Л.К. Адаптация кур к факторам промышленного содержания / Л.К. Бусловская, А.Ю. Ковтуненко, Е.Ю. Беляева // Научные ведомости. – 2010. – № 21(92). – Вып. 13. – С. 96–102.
4. Цветков, И.Л. Биохимические параметры стресс-редуцирующей реакции гидробионтов при интоксикации: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16 / И.Л. Цветков. – Мытищи: МГОУ, 2009. – 46 с.
5. Чиркин, А.А. Биологическая химия: учебник / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – Минск: Вышэйшая школа, 2017. – 411 с.
6. Литвицкий, П.Ф. Патопфизиология: учебник / П.Ф. Литвицкий. – 4-е изд., испр. и доп. – М., 2009. – 496 с.
7. Anderson, R.M. A role for Dicer in aging and stress survival / R.M. Anderson // Cell Metabolism. – 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 285–286.
8. Mori, M.A. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity / M.A. Mori [et al.] // Cell Metabolism. – 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 336–347.
9. Seematter, G. Stress and metabolism / G. Seematter, C. Binnert, L. Tappy // Metab. Syndr. Relat. Disord. – 2005. – Vol. 3(1). – P. 8–13.
10. Rabasa, C. Impact of stress on metabolism and energy balance / C. Rabasa, S.L. Dickson // Currant Opinion in Behavioral Sciences. – 2016. – Vol. 9. – P. 71–77.

11. Чиркин, А.А. Рутинные биохимические исследования при анализе роли стрессового воздействия в патогенезе метаболического синдрома / А.А. Чиркин // Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия: материалы II Междунар. симпозиума, Гродно, 30 сент. – 2 окт. 2015 г. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2015. – С. 175–181.

REFERENCES

1. Shidlovski V.A. *Itogi nauki i tekhniki. Ser. Fiziologiya cheloveka i zhivotnikh* [Findings of Science and Technology. Physiology of Man and Animals], M., 1982, 25, pp. 3–18.
2. Derkho M.A., Sereda T.I., Khizhneva O.A. *Sovremenniy kontseptsii nauchnikh issledovaniy* [Contemporary Concepts of Scientific Research], 2014, 6(4), pp. 101–103.
3. Buslovskaya L.K., Kovtunenkov A.Yu., Belayeva E.Yu. *Nauchniye vedomosti* {Scientific Journal}, 2010, 21(92), 13, pp. 96–102.
4. Tsvetkov I.L. *Biokhimiicheskiye parametri stress-redutsiruyushchei reaktsii gidrobiontov pri intoksikatsii avto-ref. dis. dokt. biol. nauk* [Biochemical Parameters of Stress-Reducing Reaction of Hydrobionts through Intoxication Dr.Sc. (Biology) Dissertation Summary], Mytishchi, MGOU, 2009, 46 p.
5. Cirkin A.A., Danchenko E.O. *Biologicheskaya khimiya: uchebnik* [Biological Chemistry: Textbook], Minsk, Vysheishaya shkola, 2017, 411 p.
6. Litvitski P.F. *Patofiziologiya: uchebnik* [Patophysiology: Textbook], M., 2009, 496 p.
7. Anderson, R.M. A role for Dicer in aging and stress survival / R.M. Anderson // *Cell Metabolism*, 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 285–286.
8. Mori, M.A. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity / M.A. Mori [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2012. – Vol. 16, iss. 3. – P. 336–347.
9. Seematter, G. Stress and metabolism / G. Seematter, C. Binnert, L. Tappy // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* – 2005. – Vol. 3 (1). – P. 8–13.
10. Rabasa, C. Impact of stress on metabolism and energy balance / C. Rabasa, S.L. Dickson // *Currant Opinion in Behavioral Sciences*. – 2016. – Vol. 9. – P. 71–77.
11. Cirkin A.A. *“Metabolicheski sindrom: eksperiment, klinika, terapiya” II Mezhdunarodni symposium, Grodno, Respublika Belarus, 30 sentiabria – 2 oktiabria 2015 g. Sb. statei* [“Metabolic Syndrome: Experiment, Clinic, Therapy” II International symposium, Grodno, Republic of Belarus, September, 30 – October, 2 2015, Collection of Articles], Grodno, GrGU im. Ya. Kupali, 2015, pp. 175–181.

Поступила в редакцию 08.11.2017

Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.