Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 18 (57). 2005 г. № 1 С. 65-71.

УДК 612.829.3:599.32:615.849.11

ИЗМЕНЕНИЕ ИНФРАДИАННОЙ РИТМИКИ АКТИВНОСТИ СТРЕСС-РЕАЛИЗУЮЩИХ СИСТЕМ ПРИ ГИПОКИНЕТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Шишко Е.Ю., Малыгина В.И.

Для современного общества с его высоким темпом жизни характерно изобилие факторов риска, являющихся стрессовыми для организма [1, 2, 3, 4, 5]. Центральное место в развитии общего адаптационного синдрома занимают симпатоадреналовая (САС) и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС). Роль САС, а также ГГНС при стрессе достаточно подробно изучена. Однако не изученными остаются изменения временной организации активности этих систем при адаптации к действию стресс-факторов. В настоящее время структура ритмов рассматривается в качестве меры адаптации и прогностического критерия.

В связи с этим, задачей настоящего исследования явилось изучение инфрадианной ритмики активности САС и ГГНС у животных с экспериментально вызванной стресс-реакцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 60 беспородных белых крысах-самцах массой 150-200 г. С помощью теста «открытое поле» отбирали животных со средним уровнем двигательной активности и низкой эмоциональностью. Животные со средним уровнем двигательной активности преобладают в популяции и однотипно реагируют на действие различных факторов [6]. Стресс-реакция была индуцирована ограничением подвижности животных. В повторных опытах всех животных распределяли на 2 равноценные группы. К первой группе относились животные, содержащиеся в обычных условиях вивария (биологический контроль). Вторую группу составили животные, содержащиеся в условиях ГК. ГК создавалась помещением крыс в специальные пеналы из оргстекла, которые обеспечивали существенное ограничение их подвижности по всем направлениям. В пеналах крысы находились 23 часа в сутки. В течение одного часа осуществлялось кормление, уход за животными и забор крови.

Для исследования экскреции А, НА и 11-ОКС интактных крыс помещали в стеклянные обменные клетки с решетчатым полом из органического стекла со сборником мочи [7]. У крыс с ограниченной подвижностью мочу собирали в мочеприемники, вмонтированные в дно клетки.

Об активности САС судили по экскреции адреналина (А) и норадреналина (НА) с мочой, а о состоянии ГГНС – -по экскреции 11-оксикортикостероиов (11-ОКС). Определение концентрации КА в моче крыс осуществлялось триоксииндоловым методом по В.О. Осинской (1953) [8] в модификации А.М. Бару (1962) [9]. Для этого из суточного объема мочи на флюориметрический анализ брали не более 9 мл. Экскрецию

This document was created using SOLID CONVERTER PDF To remove this message, purchase the product at www.SolidDocuments.com

11-ОКС с мочой выявляли по методу Silber, Porter (1957) в модификации Н.А. Юдаева и М.А. Креховой. (1960) [10].

Для измерения флюоресценции использовали флюориметрическую приставку к спектрофотометру «Спекол-10». Интенсивность свечения определяли на длине волны 510 нм. Возбуждение люминесценции осуществлялось на длине волны 405 нм. Для увеличения чувствительности флюориметра в качестве регистратора светового потока применяли ФЭУ-79, отобранного по минимуму шумов. Предельная чувствительность метода, примененного в настоящем исследовании, составило 10,0 нмоль/л, что вполне соответствует решению поставленных задач.

Статистическая обработка материала проводилась вычислением среднего значения исследуемых величин, среднего квадратичного отклонения, средней ошибки. Оценку достоверности наблюдаемых изменений проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Продолжительность периодов и амлитудно-фазовые характеристики исследуемых процессов были рассчитаны с помощью косинор-анализа. Анализ волны и ее динамики, произведенный методом косинор-анализа, обеспечивает сопоставимость с другими методами и дает полное представление о структуре физиологических ритмов [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследования показал, что временная динамика экскреции А с мочой у интактных животных на протяжении эксперимента имела сходный характер с динамикой выделения НА.

Экспоненциальная модель данных позволила выявить тенденцию к увеличению в экскреции НА с мочой (от 4,2 до 5,3 нмоль/сутки) на протяжении эксперимента. В экскреции А с мочой таковых изменений не было отмечено.

В динамике экскреции А, НА и 11-ОКС с мочой присутствовала ярко выраженная ритмическая составляющая. Косинор-анализ экскреции КА и 11-ОКС с мочой у интактных животных позволил выявить инфрадианную ритмику исследуемых показателей.

В контрольной группе животных в экскреции КА и 11-ОКС были выявлены ритмы продолжительностью: ≈3,^{d}0, ≈5,^{d}0, ≈7^{d},0, ≈12^{d},0, ≈14,^{d}0 и ≈17^{d},0 и ≈21^{d},0 (рис. 1).

Спектры мощности экскреции КА и 11-ОКС с мочой в основном совпадали, но были отмечены и некоторые отличия. Обращало на себя внимание отсутствие в спектрах мощности экскреции А и 11-ОКС с мочой периода ≈9,0 суток. Период продолжительностью ≈17^{d},0 не был зарегистрирован в спектре 11-ОКС, в котором было выявлено шесть периодов. В спектрах мощности А, НА и 11-ОКС были выделены доминирующие периоды: ≈14,^{d}0, ≈3,^{d}0 и≈5,^{d}0 периоды соответственно.

Инфрадианные ритмы изученных показателей характеризовались также и определенными амплитудными характеристиками. Экспоненциальный анализ, проведенный в контрольной группе животных, показал, что имела место тенденция к возрастанию амплитуд выделенных ритмов с увеличением продолжительности периодов в спектрах всех исследованных показателей.

Анализ межфазовых взаимоотношений изученных показателей у интактных животных выявил между А и НА в периодах ≈5^{d},0, ≈14^{d},0 и ≈17^{d},0 разность фаз, которая составляла 124°, 257° и 225,7° соответственно. Между А и 11-ОКС у интактных животных было зафиксировано расхождение фаз в периодах: ≈3^{d},5,

This document was created using SOLID CONVERTER PDF To remove this message, purchase the product at www.SolidDocuments.com

≈11^{d},0 и ≈21^{d},0 на 203°, 122° и на 128°. Исключение составляли периоды: ≈5^{d},0, ≈7^{d},0 и ≈14^{d},0, в которых регистрировалось совпадение фаз. Сближение фаз между НА и 11-ОКС было зарегистрировано в периодах: ≈3^{d},5, ≈5^{d},0 и ≈21^{d},0, а расхождение в ≈7^{d},0, ≈11^{d},0 и в ≈14^{d},0 периодах.

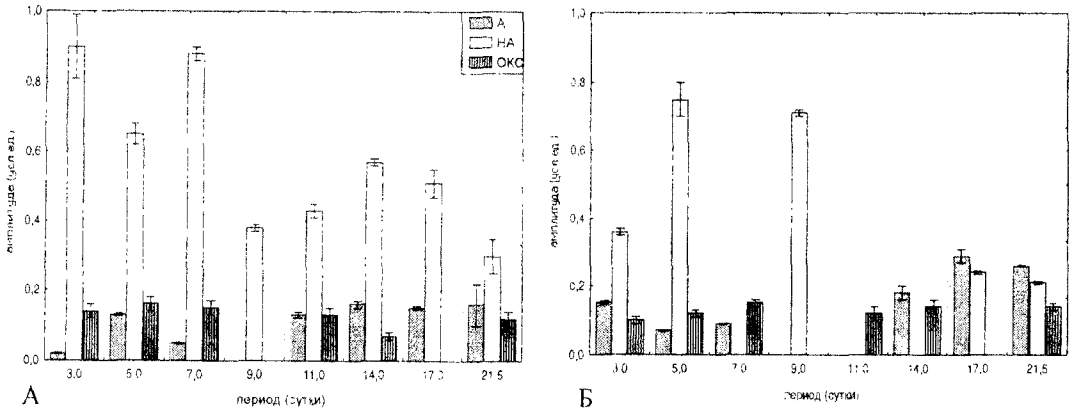

Рис. 1.Спектры мощности экскреции адреналина, норадреналина и 11-оксикортикостероидов с мочой в контрольной группе животных (А) и крыс с ограниченной подвижностью (Б).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что показатели активности стресс-реализующих систем изменялись в инфрадианном диапазоне и имели определенные амплитудно-фазовые характеристики.

При гипокинетическом стрессе у животных произошли изменения динамики и временной организации показателей активности САС и ГГНС, которые носили фазный характер и зависели от сроков эксперимента. Так, первая фаза – реакция тревоги (две недели) характеризовалась активацией САС и ГГНС. В первые 2 дня ГК выделение А возросло по отношению к контрольным значениям на 231% ($p<0,001$), а НА и 11-ОКС с мочой – на 14%, и 28% соответственно. На 8-10 сутки экскреция А и НА с мочой составила 222%, ($p<0,001$) и 181,3% ($p<0,001$) и 11-ОКС соответственно. С третьих суток эксперимента 11-ОКС незначительно снижался на 7% ($p<0,02$) относительно значений контрольной группы.

Таким образом, в первые две недели ГК нами было обнаружено увеличение экскреции А и НА с мочой. Активация экскреции 11-ОКС с мочой происходила в первые сутки ГК.

Вторая фаза гипокинетического стресса (стадия резистентности 13-32 сутки) характеризовалась незначительным снижением активности САС и ГГНС относительно первых двух недель опыта. Так выделение А и НА с мочой в эти сроки составляла в среднем 130% ($p<0,001$) и 105% соответственно, а начиная с 22-х суток эксперимента, выделение 11-ОКС с мочой приближалось к контрольным значениям.

Третья фаза ГК стресса (стадия истощения 33-43 сутки) характеризовалась снижением функциональной активности стресс-реализующих систем.

Таким образом, ограничение подвижности привело к увеличению экскреции А и НА с мочой. Полученные результаты согласуются с результатами литературных

This document was created using SOLID CONVERTER PDF To remove this message, purchase the product at www.SolidDocuments.com

данных. Так, ГК вызывала активацию САС и ГГНС, сопровождающаяся повышенной секрецией КА и глюкокортикоидов в первые сутки развития стресс-реакции [3]. В экспериментах С.Г. Шихевич с соавторами (2002) [13] и В.Г. Шаляпина с соавторами (2000, 2001) [14, 15] при ограничении подвижности было выявлено повышение содержания кортикостерона в крови у крыс.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что инфрадианная ритмика экскреции НА и А и 11-ОКС с мочой крыс, а также степень синхронизации изученных параметров также существенно менялась при ГК.

В экспериментальной группе животных косинор-анализом были выделены такие же периоды исследуемых показателей, как в контрольной группе (рис. 1), но были зарегистрированы и отличия. Так, в спектрах экскреции А, НА с мочой у крыс с ограниченной подвижностью исчез $\approx 11^{d},0$ период, а в ритме экскреции НА – $\approx 14^{d},0$ период. В ритме 11-ОКС изменений в количестве выявленных периодов не было выявлено. Различия заключались также и в смене доминирующего ритма. В спектрах А в экспериментальной группе животных доминировал $\approx 17,^{d}0$ период, в спектре НА – $\approx 5,^{d}0$, 11-ОКС – $\approx 14,^{d}0$. Таким образом, ГК изменяла не только структуру периодов, но и доминирующий ритм.

Изменение спектральной мощности выявленных ритмов проявлялось в соответствующих перестройках их амплитудных характеристик. Экспоненциальный анализ данных показал тенденцию к возрастанию амплитуд выделенных ритмов в спектрах экскреции А, 11-ОКС и незначительное снижение амплитуд в спектре мощности НА.

В спектре экскреции А с мочой был зарегистрирован разнонаправленный сдвиг амплитуд, а именно: амплитуда ритмов данного показателя достоверно уменьшалась в периоде $\approx 5^{d},0$ в 1,36 раза ($p<0,05$), а в ритме $\approx 3^{d},5$ повышалась в 2,14 раза ($p<0,01$) относительно значений в контрольной группе животных. Максимальное снижение амплитуд в спектре мощности экскреции А с мочой было зарегистрировано в периоде $\approx 20^{d},5$ в 4,68 раза ($p<0,001$), а повышение в $\approx 14^{d},0$ в 1,18 раза ($p<0,01$) соответственно. Для ритмов экскреции НА было характерно понижение амплитуд в 1,2-1,6 раза ($p<0,02$ – $p<0,001$) во всех выделенных периодах относительно значений контрольной группы. Причем, максимальное снижение амплитуд исследуемых показателей было зафиксировано в $\approx 17^{d},0$ периоде в 2,08 раза ($p<0,001$) по сравнению с показателями в интактной группе животных. Для ритмов 11-ОКС, как и для ритмов экскреции НА было свойственно понижение амплитуд в 1,1-1,4 раза ($p<0,001$) относительно контроля, а в $\approx 14^{d},0$ периоде, также как и в ритме экскреции А было отмечено достоверное повышение амплитуды в 2 раза ($p<0,001$). Изменение исходной периодичности при стрессе характеризовалось не только нарушением структуры периода, но и изменением амплитудных характеристик колебательного процесса и акрофазы, что является само по себе неблагоприятным признаком [16].

Таким образом, изменения инфрадианной ритмики выражались в грубых нарушениях исходных амплитудных характеристиках исследованных показателей стресс-реализующих систем.При ГК установились новые взаимоотношения между показателями стресс-реализующих систем (рис. 2).

This document was created using SOLID CONVERTER PDF To remove this message, purchase the product at www.SolidDocuments.com

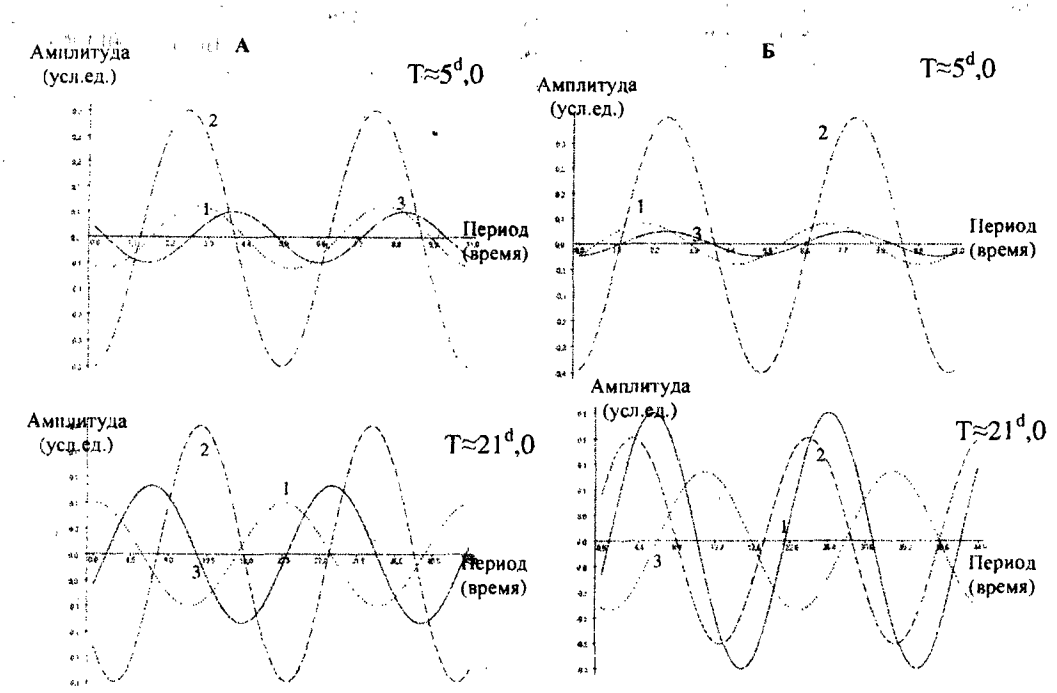

Рис. 2. Фазовые соотношения биоритмов экскреции А (1), НА (2) с мочой и 11-оксикортикостероидов (3) у интактных животных (А) и при ограничении подвижности (Б) в периодах: ≈5^d,0 и ≈21^d,0.

Между ними (А, НА и 11-ОКС) в коротких периодах: ≈3^d,0, ≈5^d,0 и ≈7^d,0 было отмечено уменьшение разности фаз, что свидетельствовало об усилении синхронизации между показателями в экскреции А и НА, А и 11-ОКС и НА и 11-ОКС у животных с ограниченной подвижностью. В длинных периодах: ≈11^d,0 и ≈21^d,0 – наоборот, было зарегистрировано фазовое рассогласование инфрадианной ритмики показателей САС и ГГНС (рис. 2).

Таким образом, гипокинетический стресс привел к выраженным нарушениям инфрадианной ритмики САС и ГГНС, что проявлялось не только в изменении структуры спектра, но и в амплитудно-фазовых сдвигах. Все это свидетельствует о развитии десинхроноза.

Анализ полученных результатов исследования, а также сопоставление их с имеющимися к настоящему времени литературными данными, позволили представить механизм нарушения инфрадианной ритмики стресс-реализующих систем при гипокинетическом стрессе.

Одной из важнейших систем, первой отвечающей на воздействие стресс-факторов является САС. В наших исследованиях об активации САС при ГК свидетельствовало резкое возрастание экскреции КА с мочой. Такое возрастание экскреции КА связано с выделением НА из гипоталамического депо, а А – из надпочечников. Следствием

This document was created using SOLID CONVERTER PDF
To remove this message, purchase the product at www.SolidDocuments.com

этих изменений является активация периферических отделов САС, о чем свидетельствует возрастание концентрации КА в плазме крови [15].

Для объяснения механизмов развития стресса существенное значение имеют выделение и повышенная утилизация НА при развертывании адаптационных реакций на уровне гипоталамуса и уменьшение обратного захвата НА адренергическими нервными окончаниями [16]. Вышеописанные процессы в различных отделах мозга модулируют чувствительность β-адренорецепторов. При хроническом иммобилизационном стрессе уменьшается плотность β-адренорецепторов в пинеалоцитах, сопровождающихся дисфункцией внутриклеточной серотонин-N-ацетилтрансферазы, и уменьшением N-ацетилсеротонина и М [17], что приводит к изменению секреции основного эпифизарного гормона мелатонина. Эти изменения обусловлены снижением «симпатического входа».

Известно, что при хроническом стрессе не столько изменяется содержание М в эпифизе, сколько происходит смещение акрофазы его секреции [18]. Эпифиз является ведущим пейсмекером в широком диапазоне периодов, участвующим в координации биоритмов. При нарушении, обусловленном гипокинетическим, стрессом изменяется и ритмическая деятельность их систем, в том числе и ГГНС.

Важную роль в регуляции стресса играет и изменение секреции глюкокортикоидов, являющихся ключевым фактором саморегуляции и активности стресс-системы. При стрессе происходит активация оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники, которая вызывает гиперпродукцию глюкокортикоидов, что в свою очередь приводит к иммунодепрессии [18, 19]. М присущи достаточно сложные отношения с ГГНС. На это указывает вызываемое гормоном торможение спонтанной ритмики гипоталамических нейронов, совпадающее с подавлением здесь аденилатциклазной активности и снижением уровня цАМФ, в аденогипофизе [20, 21]. Многочисленные исследования указывают на сдерживающий характер эпифизарного контроля за деятельностью эндокринных желез, в том числе за адренокортикальной активностью [21, 22]. Факт угнетающего влияния М на выработку КС установлен. Показано, что этот эффект является следствием подавления секреции АКТГ в аденогипофизе, а также кортиколиберина в ядрах гипоталамуса [23]. Как свидетельствуют результаты проведенных исследований при стрессе имеет место нарушение ритмической деятельности ГГНС, обусловленных изменением функционального состояния эпифиза.

ВЫВОДЫ

Изменения функциональной активности эпифиза при стрессе, по-видимому, ведут к изменению временной организации стресс-реализующих систем. Следствием этого является и изменение инфрадианной ритмики физиологических систем, в том числе САС и ГГНС, обнаруженного в нашем исследовании.

Список литературы

1. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., Кузнецова Б.А. и др. Развитие адаптации к стрессу в результате курса транскраниальной электростимуляции // Бюл. экспер. биол. – 1994, № 1. – С 16-18.
2. Dean D., Lyte M., Flower N. Sjcial conflict stress, immune responses and resustance to infection // Shock. – 1997, № 7. – P. 104.

This document was created using SOLID CONVERTER PDF To remove this message, purchase the product at www.SolidDocuments.com

3. Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // Патол. физиол. – 200,1 №2. – С. 26 – 30.
4. Игрунова К.Н. Участие факторов иммунной системы в механизмах адаптации миокарда при иммобилизационном стрессе // // Таврический медико-биологический вестник. КГМУ. – Т. 7. № 1. – 2003. – С. 71-74.
5. Владимирский Б.М., Сидякин В.Г., Темурьянц Н.А., Макеев В.Б., Самохвалов В.П. Космос и биологические ритмы.- Симферополь, 1995
6. Маркель А.Л. // Журнал высшей нервной деятельности. – 1981. №2. – 301с.
7. Бойко Т.П. Изменение уровня катехоламинов в тканях белых крыс в условиях формирования алкогольной мотивации и их фармакологическая регуляция Автореф. дисс.... д-ра биол. наук. – Харьков. 1987. – 16 с.
8. Осинская В.О. Данные об окислении адреналина, норадреналина, адреналина, норадреналина во флюоресцирующие соединения // Биохимия. – 1953. №. 18 – С. 594-595.
9. Бару А.М. Значение норадреналина головного мозга в возникновении гормонально-медиаторной диссоциации как формы изменения симпатоадреналовой активности // Физиология и биохимия биогенных аминов. М.: Наука, 1969. – С. 64-70.
10. Колб В.Г., Камышников Е.С. Клиническая биохимия. – Минск. – 1976. – с. 234.
11. Емельянов И.Н. Структура биологических ритмов человека в процессе адаптации. Статистический анализ и моделирование.– Новосибирск: Наука, 1986. – 184 с.
12. Стригун Л.М. Биоритмы дегидрогеназ и гелиобиологические связи // Циклы природы и общества. – 1996. – № 2. – С. 143-149.
13. Шихевич С.Г., Оськина И.Н., Плюснина И.З. Реакция гипофизарно-надпочечниковой системы на стрессорные и иммунные стимулы у серых крыс, селекционируемых по поведению // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 88. № 6. – С. 781-789.
14. Шаляпина В.Г., Ордян Н.Э. Рецепторы кортикостероидов в мозгу как сигнальные системы стресса и адаптации // Успехи физиологических наук. – 2000. – Т. 31, № 4. – С. 86-101.
15. Шаляпина В.Г., Зайченко И.Н., Батуев А.С., Ордян Н.Э. Изменение нейроэндокринной регуляции приспособительного поведения после стресса в позднем пренатальном онтогенезе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 9. – С. 1192-1201.
16. Еремина С.А., Белякова Е.Н. Фазы первичной реакции симпато-адреналовой системы на стресс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-1987. – Т. 54, № 8. – С. 155-157.
17. Yocca F. D and Friedman E. Parallel but Separate Release of Catecholamines and Acetylchlinesterase from Stimulated Adrenal Chromaffin Cells in Culture // J. of Neuroendocrinology. – 1984. – V. 42. – P1433-1438.
18. Арушанян Э.Б. Участие эпифиза в антистрессовой защите мозга // Успехи физиол. наук. – 1996. – Т. 27, № 3.- С. 31
19. Morrey M.K., McLanchan J. A., Srkin C.D., Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal neurohormone melatonin // J. Immunol. – 1994. – Vol. 153. – P 2671-2680.
20. Nilis L.P., Hashemi F. Picomolar-affinity binding and inhibition of adenylate cyclase activity by melatonin in Syrian hamster hypothalamus // Neurobiology. – 1990. – Vol. 10. – P. 553-558.
21. Karasek, M., Woldanska-Okonska, M., Czernicki, J., Zylinska, K., and Swietoslawski, J. Chronic exposure to 2.9 mT, 40 Hz magnetic field reduces melatonin concentrations in humans // J. Pineal Res. 1998. – Vol. 25. – P. 240–244.
22. Troiani M.E., Reiter R.J., Vaughen M.K. et al. The depression in rat pineal melatonin production after saline injection at night may be elicited by corticosterone // Brain Res. – 1988. – Vol. 450. – P. 18-24.
23. Miguez I. Aldegunde MA. Effect of gamma-aminobutyric acid on corticosterone secretion: involvement of the noradrenergic system. // Life Sci.- 1990. – Vol.46, No. 12. – P. 875-80.

Поступила в редакцию 15.11.2004 г.

This document was created using SOLID CONVERTER PDF To remove this message, purchase the product at www.SolidDocuments.com