

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННАЯ КОСТНАЯ РЕЗОРБЦИЯ У КРЫС В ОТКРЫТОМ ПОЛЕ

Иванов Д.Г.

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научный центр «Сигнал», г. Москва, Российская Федерация

Контактная информация:

Иванов Дмитрий Геннадьевич
ФГУП «НЦ «Сигнал»
ул. Большая Оленья, д. 8,
Москва, Россия, 107014
E-mail: dg1983@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 27.11.2017
и принята к печати 05.02.2018.

Резюме

Актуальность. Остеопороз и остеомалация протекают скрытно, поэтому при их диагностике, профилактике и лечении важен учет факторов риска. Хотя депрессия считается фактором риска остеопороза, эмоциональный стресс до сих пор не относят к факторам риска системных заболеваний костной ткани. Патогенез остеопороза при депрессиях исследован недостаточно. **Цель** — проанализировать стресс-индуцированную костную резорбцию у крыс в открытом поле. **Материалы и методы.** Исследование проводили на белых крысах обоих полов. Животных помещали в открытое поле на 3, 30 и 60 минут, регистрировали поведение. Исследовали массовые характеристики бедренной кости и стресс-чувствительных органов, биохимические показатели активности стресс-реализующих систем, метаболизма костного матрикса и гистологические срезы тазовой кости. **Результат.** Помещение в открытое поле не влияло на массовые характеристики бедренной кости и стресс-чувствительных органов животных. Через 3 минуты у крыс в открытом поле повышалась активность стресс-реализующих систем, увеличивались уровни кальция и свободного оксипролина в крови, морфологических изменений костной ткани не обнаруживалось. Через 30 и 60 минут в открытом поле уровень свободного оксипролина в крови нормализовался, уровень кальция в сыворотке оставался повышенным, на срезах кости наблюдались признаки остеоцитарного остеолизиса. Стресс-индуцированная резорбция костной ткани была ассоциирована с увеличением груминга. **Вывод.** Костная резорбция развивается в течение 3 минут эмоционального стресса и, как минимум, в течение 1 часа протекает по механизму остеоцитарного остеолизиса.

Ключевые слова: остеопороз, эмоциональный стресс, крысы, открытое поле.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (6): 73–82.

THE STRESS-INDUCED BONE RESORPTION IN RAT IN OPEN FIELD

Ivanov D.G.

Scientific Centre "Signal"

Corresponding author:

Dmitry G. Ivanov
Scientific Centre "Signal"
Bolshaya Olenya str. 8, Moscow,
Russia, 107014
E-mail: dg1983@rambler.ru

Received 27 November 2017;
accepted 05 February 2017.

Abstract

Background. Osteoporosis and osteomalacia are insensibly diseases, therefore assessment of risk factors is significant for their diagnosis, prophylaxis and treatment. Now the depression is considered as factor of osteoporosis, but emotional stress is not related to risk factors of system bone diseases. Pathogenesis of osteoporosis during depression isn't full studied. **Objective** — investigate the stress-induced bone resorption in rat in open field. **Design and methods.** The study was realized on both male and female white outbred rats. Rats were placed in open field for 3, 30 and 60 minutes. Rat behavior, functional activity of stress-releasing systems, bone metabolism and weight related parameters stress-sensitivity organs and femur was measured. **Results.** Placement in open field had no effect on weight related parameters stress-sensitivity organs and femur. The function activity of stress systems, calcium and free hydroxyproline blood levels in rats were increased during 3 minutes in open field. At this time histological changes on pelvic bone slice were not observed. Over 30 and 60 minutes in open field hydroxyproline blood level was normalized, but calcium blood level was elevated and the osteocytic osteolysis traces were observed on pelvic bone slice. Stress-induced bone resorption was associated with higher grooming in rat behavior. **Conclusion.** Bone resorption develop during first 3 minutes of emotional stress and provided by osteocytic osteolysis mechanism during at the least one hour.

Key words: osteoporosis, emotional stress, rat, open field.

For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (6): 73–82.

Список сокращений:

ГННС — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система,
ЛН — левый надпочечник,
МДА — малоновый диальдегид,
11-ОКС — 11-оксикортикостероиды,
САС — симпатoadреналовая система

Введение

Системные заболевания костной ткани, как правило, протекают скрытно. Остеопороз часто выявляется клинически только после переломов костей [1, 2], поэтому при диагностике, организации профилактики и определении тактики лечения остеопороза особое значение приобретает учёт факторов риска [3]. Снижение костной массы наблюдается у больных депрессией, и депрессивные расстройства рассматриваются как фактор риска

остеопороза [4, 5]. В то же время, эмоциональный стресс, являющийся ведущим фактором развития депрессии [6], в настоящее время не относят к факторам риска системных заболеваний костной ткани.

Стресс является неспецифической стереотипной генерализованной реакцией организма, возникающей в условиях, угрожающих нарушению гомеостаза и направленной на его поддержание [7]. Физиологические реакции, осуществляющие перестройку гомеостаза при стрессе, обеспечивают симпатoadреналовая (САС) и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГННС) системы. В модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo* на мышцах гормоны САС: адреналин и норадреналин, активируют костную резорбцию через β_2 -адренорецепторы, экспрессируемые остеокластами [8]. Введение β -адреноблокаторов увеличивает плотность костной ткани у мышей [8] и человека [9]. Гормоны

ГГНС — глюкокортикоиды — инициируют дифференцировку остеокластов [10], усиливая паракринную регуляцию остеокластогенеза за счёт увеличения содержания цитокинов в ткани [11], а также подавляют активность остеобластов [12]. Введение экзогенных глюкокортикоидов у человека и животных приводит к развитию остеопороза [3, 11]. Хронический стресс фиксации, сопровождающийся активацией ГГНС и САС, в нашей работе приводил к дистрофии костных органов крыс, стимулируя костную резорбцию [13], аналогичный результат наблюдался на мышах, подвергавшихся хроническому мягкому стрессу [14]. Эти данные однозначно указывают на негативное влияние стресса на костную ткань, однако не дают представление о ранних этапах развития стресс-индуцированной костной резорбции и влиянию слабых стрессоров на кость.

Помещение грызунов в условия открытого поля приводит к развитию у них стрессовой реакции, которая характеризуется активацией ГГНС и САС, увеличением частоты сердечных сокращений, повышением температуры тела [15] и обозначается как стресс новизны. Стресс новизны относят к эмоциональному стрессу, так как он не связан с какими-либо факторами, оказывающими физическое воздействие, и первично ассоциирован с активацией миндалины. Поведенческие и вегетативные реакции у животных аналогичны таковым, наблюдающимся при электростимуляции миндалины, особенно ее центральных ядер [16], а разрушение миндалины, напротив, снижает эмоциональную реакцию животных в незнакомой обстановке [17]. Другой особенностью стресса новизны является более слабая активация ГГНС и САС грызунов, чем при фиксации, электрокожном раздражении, агрессивном контакте или плавании [18]. В этой связи помещение животных в открытое поле может рассматриваться в качестве слабого стресса.

Целью данного исследования было проанализировать стресс-индуцированную костную резорбцию у крыс при помещении в открытое поле.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнена на белых беспородных крысах обоих полов в возрасте 2,5-3,0 месяцев. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали приказу Минздрава РФ от 23.08.2010 №708Н «Об утверждении правил лабораторной практики» и международным правилам работы с лабораторными животными (European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC). Животные содержались при температуре воздуха 20–22 °С, относительной влажности 40–60%, естественном световом режиме, со свободным доступом к воде

и пище. За 12 часов до выведения крыс из эксперимента животным прекращали доступ к корму.

Стрессовую реакцию воспроизводили, помещая животных в открытое поле на 3 минуты (группа «ОП 3 мин», n = 16), 30 минут (группа «ОП 30 мин», n = 13) и 60 минут (группа «ОП 60 мин», n = 13). Группа животных (n = 16), не подвергавшихся помещению в открытое поле, служила контролем.

Открытое поле представляло собой камеру 1 м в длину и 1 м в ширину, с высотой стенок 0,5 м, из белого пластика, дно которой было расчерчено на 25 равных квадратов. Освещение производилось лампой мощностью 100 Вт, подвешенной на высоте 1,5 м от дна камеры. Эксперимент проводили с 8.00 до 15.00. Животных равномерно распределяли в группы по массе, полу, эмоциональности и времени дня, когда их помещали в открытое поле.

Во время пребывания в открытом поле у животных регистрировали число пересечённых квадратов, вертикальных стоек, число груминговых реакций, уриаций и дефекаций. Не позднее, чем через 1 минуту после истечения времени экспозиции в открытом поле, крыс декапитировали.

У декапитированных животных определяли относительную массу стресс-чувствительных органов: левого надпочечника (ЛН) и тимуса, а также относительную массу, абсолютные значения длины и ventro-дорсальный диаметр в середине правой бедренной кости. Измеряли объём бедренных костей [19] и рассчитывали их плотность. Собирали кровь для приготовления плазмы и сыворотки. Плазму получали, смешивая кровь с 5% водным раствором этилендиаминтетраацетата натрия. Для приготовления сыворотки кровь выдерживали 30 минут при комнатной температуре без антикоагулянта. Образцы центрифугировали в течение 15 мин при 2800 об./мин, замораживали и хранили при –20 °С.

В гомогенатах ЛН, печени и в плазме, приготовленных с 30% раствором этанола, определяли содержание 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) флюориметрическим методом Ю.П. Панкова, И.Я. Усватовой в модификации В.Г. Подковкина [20]. В гомогенатах правого надпочечника, приготовленных с 10% раствором трихлоруксусной кислоты, определяли содержание адреналина флюориметрическим методом Э.Ш. Матлиной в модификации В.Г. Подковкина [20]. В гомогенатах головного мозга, приготовленных с 10% раствором трихлоруксусной кислоты, флюориметрически определяли содержание норадреналина по методу Э.Ш. Матлиной в модификации В.Г. Подковкина [20] и серотонина по методу Г.Я. Прошиной в модификации В.Г. Подковкина [20]. В гомогенатах печени, приготовленных с 0,1 М фосфатным буфе-

ром рН 7,2 определяли содержание гликогена по реакции с антроновым реактивом после щелочного гидролиза [21] и малонового диальдегида (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой [22]. Концентрацию свободного и белковосвязанного оксипролина в плазме определяли по реакции с п-диметиламинобензальдегидом [22]. Содержание кальция в сыворотке крови измеряли на пламенном анализаторе жидкости (ПАЖ-2) согласно руководству по эксплуатации. Уровень фосфора в сыворотке анализировали по реакции с молибденовым реактивом [23].

Тазовую кость 3–4 животных из каждой группы очищали от мягких тканей и фиксировали в 10% растворе формалина в течение 4 суток. После этого проводили декальцинацию органов в насыщенном растворе этилендиаминтетраацетата натрия. Декальцинированные образцы заливали в парафин и готовили серийные срезы кости в горизонтальной плоскости. Для анализа использовались срезы, полученные из участка кости, расположенного на 70–100 мкм ниже краниального конца кости. Готовые, депарафинированные срезы окрашивались гематоксилином и эозином, заключались в полистирол [24].

Результаты исследования представляли в виде среднего (M) и ошибки среднего (m). Сравнение средних проводили методом дисперсионного анализа ANOVA. При множественных сравнениях использовали post hoc сравнение Бонферрони. В случае анализа поведенческих показателей дисперсии в группах отличались по критерию Ливена, поэтому для множественных сравнений использовали критерий Манна-Уитни с FDR коррекцией [25]. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Масса тела животных в контроле ($143,6 \pm 6,1$ г, $n = 16$) и группах «ОП 3 мин» ($151,7 \pm 7,1$ г, $n = 16$),

«ОП 30 мин» ($142,3 \pm 5,6$ г, $n = 13$), «ОП 60 мин» ($152,2 \pm 7,9$ г, $n = 13$) не отличалась статистически значимо.

В течение 3, 30 и 60 минут экспозиции в открытом поле горизонтальная двигательная активность крыс, оцениваемая по числу пересечённых квадратов, не отличалась статистически значимо от контроля (табл. 1).

Число вертикальных стоек у крыс, пребывавших в открытом поле 3 минуты, было меньше, чем у животных, находившихся в открытом поле 30 минут ($p_{0,016} = 0,002$) и 60 минут ($p_{0,033} = 0,005$).

В группах «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» отличия показателя не обнаружено. Число груминговых реакций у животных группы «ОП 3 мин» было меньше, чем у крыс групп «ОП 30 мин» ($p_{0,016} < 0,001$) и «ОП 60 мин» ($p_{0,033} < 0,001$), в группе «ОП 30 мин» значения показателя были меньше, чем у крыс группы «ОП 60 мин» ($p_{0,050} = 0,010$). Отличий числа дефекаций и числа уринаций в исследуемых группах животных обнаружено не было.

Относительная масса ЛН, тимуса и селезенки у контрольных крыс и животных, подвергавшихся экспозиции в открытом поле в течение 3, 30 и 60 минут, не отличалась (табл. 2).

Уровень 11-ОКС в плазме крыс группы «ОП 3 мин», был больше, чем в контроле на 83,5 % ($p < 0,001$). В группах животных групп «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» уровень 11-ОКС в крови не отличался от контроля и между группами, но был меньше, чем у крыс группы «ОП 3 мин» на 27,6 % ($p = 0,010$) и 31,0 % ($p = 0,021$) соответственно (табл. 3).

Содержание 11-ОКС в ЛН животных группы «ОП 3 мин» не отличалось от контроля. У крыс групп «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» содержание 11-ОКС в ЛН было больше на 42,3 % ($p = 0,015$) и 41,2 % ($p = 0,019$) по сравнению с контролем, а также превышало значения показателя в группе «ОП 3 мин» на 38,4% ($p = 0,027$) и на 37,3% ($p = 0,034$).

Таблица 1. Динамика поведенческих показателей крыс в открытом поле в течение эксперимента

Показатель	«ОП 3 мин» n = 16	«ОП 30 мин» n = 13	«ОП 60 мин» n = 13
Число пересечённых квадратов	6,3 ± 1,4	19,6 ± 5,5	17,2 ± 5,4
Число вертикальных стоек	3,1 ± 0,7	9,0 ± 1,5 ^а	8,1 ± 1,8 ^а
Число груминговых реакций	1,6 ± 0,5	7,7 ± 1,7 ^а	12,7 ± 1,3 ^{а,б}
Число дефекаций	2,8 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,8 ± 0,5
Число уринаций	1,7 ± 0,6	0,9 ± 0,4	2,9 ± 1,0

а — отличие статистически значимо от группы «ОП 3 мин»; б — отличие статистически значимо группы «ОП 30 мин». Данные представлены как (M ± m). Отличия считали значимыми при $p < 0,050$ по критерию Манна-Уитни с FDR коррекцией.

Таблица 2. Показатели функции систем, обеспечивающих адаптацию и морфофункционального состояния костной ткани крыс в открытом поле

Показатель	«Контроль» n = 16	«ОП 3 мин» n = 16	«ОП 30 мин» n = 13	«ОП 60 мин» n = 13
Относительная масса стресс-чувствительных органов				
Левый надпочечник, %	0,019 ± 0,002	0,023 ± 0,001	0,022 ± 0,002	0,020 ± 0,002
Тимус, %	0,192 ± 0,014	0,186 ± 0,010	0,178 ± 0,015	0,196 ± 0,018
Селезёнка, %	0,493 ± 0,030	0,585 ± 0,032	0,500 ± 0,032	0,549 ± 0,038
Показатели функциональной активности ГГНС				
11-ОКС в ЛН, мкг/г	55,88 ± 4,80	57,46 ± 4,99	79,52 ± 4,53 ^{а,б}	78,89 ± 6,53 ^{а,б}
11-ОКС в плазме, мкг/мл	0,671 ± 0,074	1,231 ± 0,097 ^а	0,819 ± 0,076 ^б	0,850 ± 0,098 ^б
11-ОКС в печени, мкг/г	6,25 ± 0,97	10,89 ± 1,26 ^а	8,10 ± 1,49	6,86 ± 0,94
Показатели функциональной активности САС				
Адреналин в правом надпочечнике, мкг/г	1,013 ± 0,080	0,743 ± 0,044 ^а	0,779 ± 0,058	0,639 ± 0,057 ^а
Гликоген в печени, мг/г	40,53 ± 2,88	33,46 ± 2,71	34,75 ± 2,09	22,70 ± 1,99 ^{а,б,в}
МДА в печени, нмоль/г	284,3 ± 15,4	359,5 ± 13,8 ^а	279,9 ± 16,5 ^б	372,9 ± 27,6 ^{а,в}
Содержание норадреналина и серотонина в головном мозге				
Норадреналин, мкмоль/г	0,71 ± 0,07	0,97 ± 0,05 ^а	1,34 ± 0,07 ^{а,б}	1,06 ± 0,06 ^{а,в}
Серотонин, мкг/г	1,27 ± 0,13	1,93 ± 0,14 ^а	2,17 ± 0,16 ^а	2,04 ± 0,23 ^а
Биометрические показатели правой бедренной кости				
Относительная масса, %	0,310 ± 0,008	0,291 ± 0,005	0,303 ± 0,009	0,284 ± 0,008
Длина кости, мм	25,60 ± 0,25	26,35 ± 0,41	26,19 ± 0,37	26,33 ± 0,22
Диаметр диафиза, мм	2,26 ± 0,06	2,28 ± 0,07	2,26 ± 0,07	2,34 ± 0,07
Плотность, г/см ³	1,46 ± 0,05	1,46 ± 0,06	1,34 ± 0,07	1,36 ± 0,05
Показатели обмена органического компонента костного матрикса				
Свободный оксипролин, мг/мл	1,31 ± 0,06	1,64 ± 0,05 ^а	1,41 ± 0,04 ^б	1,43 ± 0,08
Белковосвязанный оксипролин, мг/мл	27,61 ± 0,88	29,12 ± 1,13	25,52 ± 0,73	27,40 ± 1,18
Показатели обмена минерального компонента костного матрикса				
Кальций, ммоль/мл	2,06 ± 0,03	2,25 ± 0,03 ^а	2,25 ± 0,03 ^а	2,26 ± 0,03 ^а
Фосфор, мг/мл	10,29 ± 0,47	8,62 ± 0,30 ^а	7,98 ± 0,41 ^а	9,39 ± 0,48

а — отличие статистически значимо от контроля; б — отличие статистически значимо от группы «ОП 3 мин»; в — отличие статистически значимо от группы «ОП 30 мин». Данные представлены как (M ± m). Отличия считали значимыми при p < 0,050 по результатам ANOVA с post hoc сравнением Бонферрони.

Отличия содержания 11-ОКС в ЛН между группами «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» обнаружено не было.

Содержание 11-ОКС в печени крыс группы «ОП 3 мин» было больше, чем в контроле на 74,2 % ($p = 0,030$), но не отличались от значения показателя у крыс групп «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин». Содержание 11-ОКС в печени животных групп «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» не отличалось от контроля и между группами.

Содержание адреналина в правом надпочечнике крыс групп «ОП 3 мин» и «ОП 60 мин» (табл. 2) было меньше, чем в контроле на 26,7 % ($p = 0,012$) и 36,9 % ($p = 0,001$). В группе крыс «ОП 30 мин» содержание адреналина в надпочечнике не отличалось от контроля. Содержание адреналина в надпочечнике в группах «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» не отличались от значения показателя в группе «ОП 3 мин» и между группами.

У крыс групп «ОП 3 мин» и «ОП 30 мин» содержание гликогена в печени не отличалось от контроля и между группами. У животных группы «ОП 60 мин» содержание гликогена в печени было меньше, чем в контроле ($-44,0$ %, $p < 0,001$), а также у крыс групп «ОП 3 мин» ($-32,2$ %, $p = 0,026$) и «ОП 30 мин» ($-34,7$ %, $p = 0,015$).

Содержание МДА в печени животных группы «ОП 3 мин» (табл. 2) было больше по сравнению с контролем ($+26,5$ %, $p = 0,022$) и группой «ОП 30 мин» ($+28,4$ %, $p = 0,008$). В группе «ОП 60 мин», также зарегистрировано большее содержание МДА в печени по сравнению с контролем ($+31,2$ %, $p = 0,008$) и крысами группы «ОП 30 мин» ($+33,2$ %, $p = 0,008$). Значения показателя в группах «ОП 3 мин» и «ОП 60 мин» не отличались.

Через 3, 30 и 60 минут пребывания в открытом поле содержание серотонина в мозге животных было больше, чем в контроле на 51,9 % ($p = 0,022$), 70,9 % ($p = 0,002$) и 60,6 % ($p = 0,008$), соответственно (табл. 2), но не отличалось между группами.

Содержание норадреналина в мозге крыс групп «ОП 3 мин», «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» было больше, чем в контроле на 36,6 % ($p = 0,020$), 88,7 % ($p < 0,001$) и 49,3 % ($p = 0,001$) соответственно. Вместе с этим, у крыс группы «ОП 30 мин» содержание норадреналина в мозге было больше, чем у крыс групп «ОП 3 мин» ($+38,1$ %, $p = 0,001$) и «ОП 60 мин» ($+26,4$ %, $p = 0,029$). Содержание норадреналина в мозге крыс групп «ОП 3 мин» и «ОП 60 мин» не отличалось.

Значения биометрических показателей правой и левой бедренной кости крыс, помещавшихся в открытое поле на 3, 30 и 60 минут, не отличались статистически значимо от контроля (табл. 2).

Уровень свободного оксипролина в крови (табл. 2) крыс группы «ОП 3 мин» был больше, чем в контроле ($+25,2$ %, $p < 0,001$). У животных групп

«ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» уровень свободного оксипролина в крови не отличался от контроля и между группами. В группе животных «ОП 30 мин» уровень свободного оксипролина в крови был ниже на 14,0 % ($p = 0,036$), чем у крыс группы «ОП 3 мин». В группах «ОП 3 мин» и «ОП 60 мин» значения показателя не отличались.

Уровень белковосвязанного оксипролина в крови крыс, пребывавших в открытом поле 3, 30 и 60 минут, не отличался статистически значимо от контроля и между группами.

Уровень кальция в сыворотке крыс групп «ОП 3 мин», «ОП 30 мин» и «ОП 60 мин» был больше, чем в контроле на 9,2 % ($p < 0,001$), 9,2 % ($p = 0,001$) и 9,7 % ($p < 0,001$) соответственно (табл. 2), но не отличался между группами.

Уровень фосфора в крови крыс групп «ОП 3 мин» и «ОП 30 мин» был меньше, чем в контроле на 16,2 % ($p = 0,028$) и на 22,4 % ($p = 0,002$). У животных группы «ОП 60 мин» среднее значение показателя не отличалось от контроля. Отличий уровня фосфора в крови крыс опытных групп не выявлено.

Микроструктура губчатой кости крыс группы «ОП 3 мин» на гистологических препаратах гребня подвздошной кости не имела видимых отличий от контроля. На гистологических препаратах крыс группы «ОП 3 мин» представлено нормальное строение губчатой костной ткани (рис. 1, А). Разломы костных балок немногочисленны. Поверхность костных балок преимущественно ровная, покрытая плотным слоем клеток правильной кубической формы (1), идентифицированных как остеобласты и плоскими клетками с темной цитоплазмой, идентифицированными как выстилающие клетки (2).

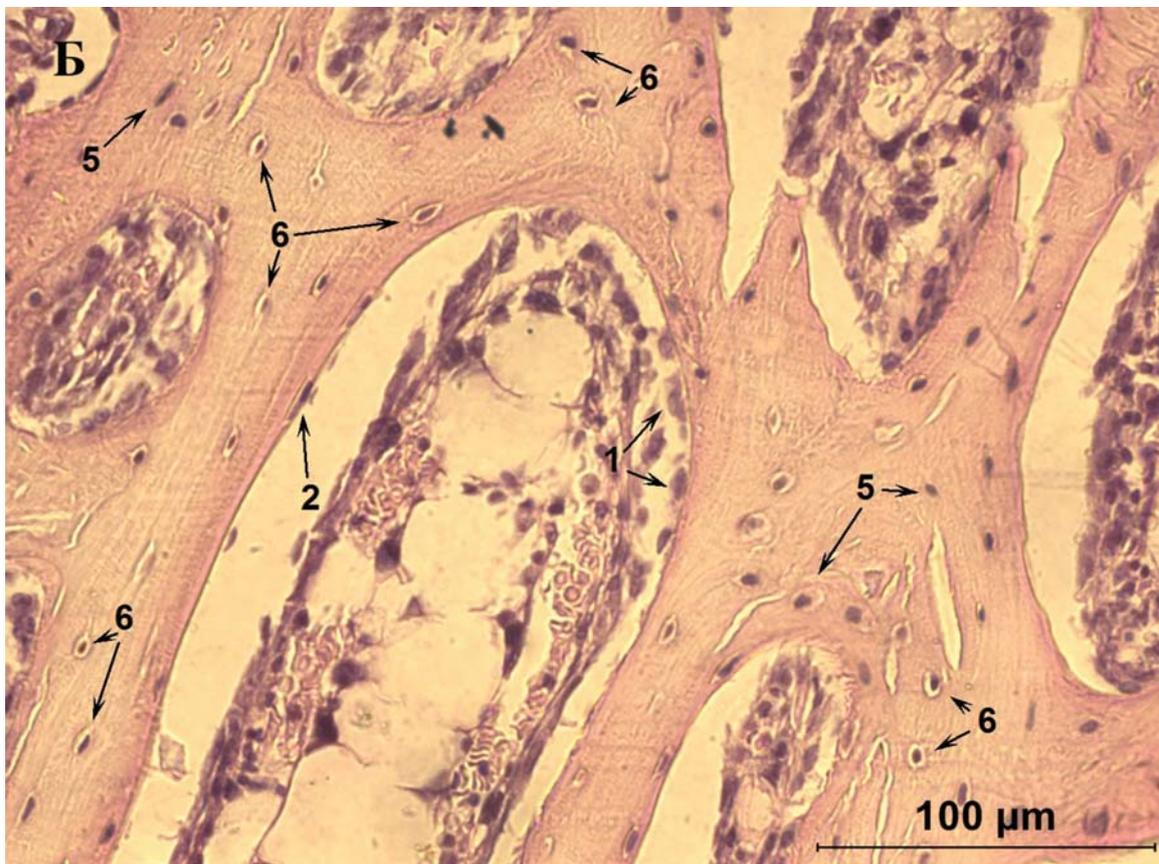
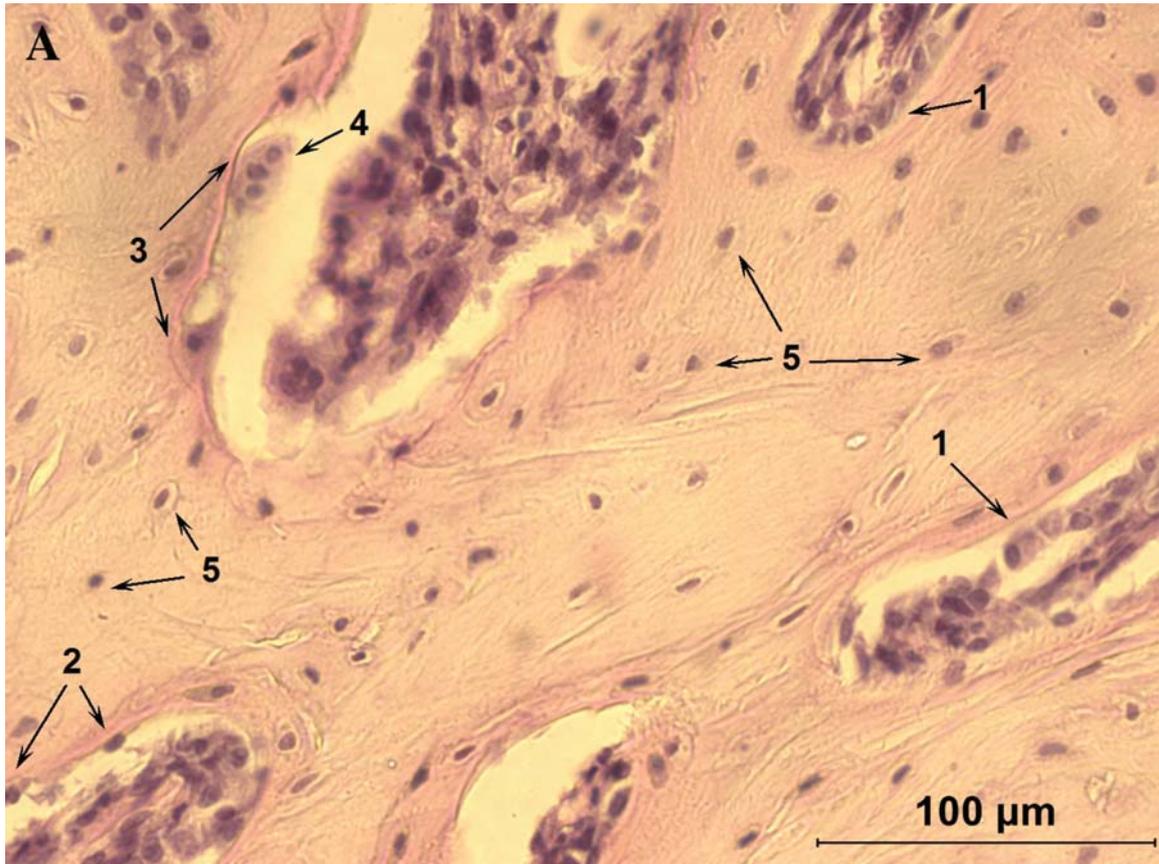
На поверхности отдельных балок встречаются единичные гаушиповы лакуны (3) с крупными многоядерными клетками, идентифицированными как остеокласты (4). В толще костных балок лежат мелкие клетки с темнокрашенной цитоплазмой, идентифицированные как остециты (5).

На препаратах гребня подвздошной кости крыс группы «ОП 60 мин» микроархитектоника костных балок и число клеток, идентифицированных как остеобласты и остеокласты, не отличается от групп «Контроль» и «ОП 3 мин» (рис. 1, А). Вместе с этим, у крыс группы «ОП 60 мин» (рис. 1, Б) отмечается повсеместное увеличение остеоцитарных лакун (6) в трабекулах подвздошной кости и уменьшение ядер остеоцитов, что является признаком остеоцитарного остеолитического процесса.

Обсуждение

Согласно полученным результатам, помещение животных в открытое поле сопровождалось увеличением груминга, что в условиях новизны

Рисунок 1. Строение трабекулярной костной ткани гребня тазовой кости крыс групп «ОП 3 мин» (А) и «ОП 60 мин» (Б).



Увеличение 10×40 . Окраска гематоксилин-эозин. Обозначения в тексте.

рассматривается в качестве смещённой активности у грызунов и соответствует фрустрации у человека [26]. Через 3 минуты тестирования у животных наблюдалось меньшее число вертикальных стоек, чем через 30 и 60 минут, при этом горизонтальная двигательная активность у крыс через 3, 30 и 60 минут не отличалась. По-видимому, это объясняется тем, что двигательная активность у грызунов в открытом поле первые 3 минуты связана с тревожностью, а в последующее время — с исследовательской активностью [27]. Вегетативная активность, оцениваемая по числу дефекаций и уриаций у крыс, находившихся в открытом поле 3, 30 и 60 минут, не отличалась, что может быть следствием усиленной эвакуации каловых масс и мочи в течение первых минут экспозиции крыс в открытом поле.

Пребывание животных в открытом поле 3, 30 и 60 минут увеличивало функциональную активность ГГНС и САС. При этом стрессовая реакция в открытом поле отличалась от классической [28], так как масса ЛН, тимуса и селезёнки у крыс не изменялись. Через 3 минуты пребывания животного в открытом поле процессы синтеза и секреции 11-ОКС в кровь были сбалансированы, так как обнаруживалось увеличение уровня 11-ОКС в крови, но не в надпочечнике. Через 30 и 60 минут пребывания животных в открытом поле, синтез 11-ОКС в надпочечниках протекал активнее, чем секреция гормонов, на что указывает рост содержания 11-ОКС в надпочечниках относительно контроля. Изменение функциональной активности САС в открытом поле происходило фазно. Через 3 минуты экспозиции у крыс наблюдалось снижение адреналина в надпочечниках и увеличение активности ПОЛ, в виде повышения содержания МДА в печени, характерное для быстрой активации САС [29]. Через 60 минут экспозиции в открытом поле наблюдалась устойчивая активация САС, характеризующаяся снижением содержания адреналина в надпочечниках и гликогена в печени [30]. Пребывание животных в открытом поле в течение 3 минут и более, также сопровождалось активацией норадренергической и серотонинергической систем мозга.

В течение 3, 30 и 60 минут экспозиции в открытом поле у крыс наблюдалось увеличение уровня кальция и снижение уровня фосфора в крови, что указывает на резорбцию минерального компонента костного матрикса. Вместе с этим, через 3 минуты пребывания в открытом поле у крыс наблюдалась деградация костного коллагена в виде увеличения уровня свободного оксипролина в крови. Изменение уровня свободного оксипролина в крови было сопряжено с изменением уровня 11-ОКС в крови и содержанием адреналина в надпочечниках крыс.

Активность процессов синтеза костного коллагена у крыс при помещении в открытое поле не изменялась.

Визуальный анализ гистологических срезов гребня тазовой кости у крыс обнаружил разрежение костного матрикса вокруг остеоцитов через 60 минут пребывания в открытом поле, это даёт основание предполагать, что наблюдавшаяся в эксперименте деградация костного матрикса протекала по механизму остеоцитарного остеолитического, который мог быть обусловлен действием глюкокортикоидов на остециты [31].

Помещение животных в открытое поле не влияло на биометрические и массовые характеристики бедренных костей крыс. Поэтому можно считать, что обнаруженная в эксперименте реакция костной ткани на эмоциональный стресс является частью нормальной адаптационной реакции организма.

В совокупности, полученные данные указывают на то, что реакция костной ткани на стресс обнаруживается достаточно быстро, в течение 3 минут. На ранних стадиях и при действии слабых раздражителей эта реакция обусловлена остеоцитарным остеолитическим, тогда как в более поздние сроки стресс-индуцированная костная резорбция протекает за счёт активности остеокластов [13]. Это наблюдение согласуется с представлениями о механизмах и функции остеоцитарного остеолитического [31].

Заключение

Помещение животных в открытое поле не влияло на массу стресс-чувствительных органов и не приводило к снижению массы костных органов. Пребывание в открытом поле в течение 3 минут активировало серотонин- и норадренергическую системы мозга, повышало функциональную активность ГГНС и САС, увеличивало уровень кальция и свободного оксипролина в крови, при этом морфологических изменений на препаратах тазовой кости не обнаруживалось. Через 30 и 60 минут в открытом поле повышенная активность нейромедиаторных систем мозга сохранялась, однако секреторная активность ГГНС и САС снижалась, уровень свободного оксипролина в крови нормализовался, уровень кальция в сыворотке оставался повышенным, на гистологических срезах кости наблюдались признаки остеоцитарного остеолитического. Стресс-индуцированная резорбция костной ткани была ассоциирована с увеличением груминга животных. В целом, полученные результаты позволяют заключить, что костная резорбция активируется в течение 3 минут эмоционального стресса и, как минимум, в течение 1 часа протекает по механизму остеоцитарного остеолитического.

Финансирование / Funding**Конфликт интересов / Conflict of interest**

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Benevolenskaya LI. The problem of osteoporosis in today medicine. Scientific practical rheumatology. 2005; 1: 4-7. In Russian [Беневоленская Л.И. Проблема остеопороза в современной медицине. Научно-практическая ревматология. 2005; 1: 4-7].
2. Gorobets LN, Polyakovskaya TP, Litvinov AV, et al. The problem of osteoporosis in mental patients receiving neuroleptics. Part 1. Social and clinical psychiatry. 2012; 22(3): 107-112. In Russian [Горобец Л.Н., Поляковская Т.П., Литвинов А.В. и др. Проблема остеопороза у больных с психическими расстройствами при нейролептической терапии. Часть 1. Социальная и клиническая психиатрия. 2012; 22(3): 107-112].
3. Osteoporosis. By ed. Lesniak OM, Benevolenskaya LI. Moscow: GEOTAR-Media, 2006. p. 272. In Russian [Остеопороз. Под ред. Лесняк О.М., Беневоленской Л.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. с. 272].
4. Cizza G, Csako G. Depression as a risk factor for osteoporosis. Trends endocrinol. metab. 2009; 20: 367-373.
5. Vyas UK. Risk of Development of Osteoporosis due to Depression in the Elderly Individuals: Review Article. BJMP. 2013; 6(2): a612 — a616.
6. Minutko VL. Depression. Moscow: GEOTAR-Media, 2006. p. 320. In Russian [Минутко В.Л. Депрессия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. с. 320].
7. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. Nat. Rev. Endocrinol. 2009; 5: 374-381.
8. Togari A, Arai M. Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption. J. Pharmacol. Sci. 2008; 106: 542 — 546.
9. Song HJ, Lee J, Kim YJ et al. β 1 selectivity of β -blockers and reduced risk of fractures in elderly hypertension patients. Bone. 2012; 51: 1008-1015.
10. Migliaccio S, Brama M, Malavolta N. Management of glucocorticoids-induced osteoporosis: role of teriparatide. Therapeutics and Clinical Risk Management. 2009; 5: 305-310.
11. Frenkel B, White W, Tuckermann J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Glucocorticoid signaling, advances in experimental medicine and biology 872. New York: Springer Science+Business Media, 2015: 179-215.
12. Kim HJ, Zhao H, Kitaura H. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. J. clin. invest. 2006; 116: 2152-2160.
13. Ivanov DG, Podkovkin VG. The morpho-physiology status of rat bone tissue under acute and subchronic emotional stress. Aviacosmic and ecological medicine. 2012; 46(2): 50-55. In Russian [Иванов Д.Г., Подковкин В.Г. Морфофункциональная характеристика костной ткани крыс при остром и субхроническом эмоциональном стрессе. Авиакосмическая и экологическая медицина. 2012; 46(2): 50-55].
14. Valente FL, Ferreira AP, Costa LD et al. Effects of chronic mild stress on parameters of bone assessment in adult male and female rats. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2016; 36(1): 106-112.
15. Walsh RN, Cummins RA. The open field test: a critical review. Psychological bulletin. 1976; 83: 482-504.
16. Kalueff AV, Makarchuc NE, Deriagina MA et al. Urination and behavior. Kiev: KCF, 2000. p. 147. In Russian [Калуев А.В., Макарьчук Н.Е., Дерягина М.А. и др. Урирование и поведение. Киев: КСФ, 2000. с. 147].
17. Lukaszewska I, Korczyrski R, Markowska A et al. Emotionality and exploratory behavior following cortico-basomedial amygdala lesion in rat. Acta neurobiol. exp. 1980; 40: 911-932.
18. Koolhaas JM, de Boer SF, de Ruiter AJH et al. Social stress in rats and mice. Acta Physiol. Scand. 1997; 161: 69-72.
19. Avtandilov GG. The basis of quantitative pathological anatomy. Moscow: Medicine, 2002. p. 238. In Russian [Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. М.: Медицина, 2002. с. 238].
20. Uglova MV, Podkovkin VG, Suzdalceva TV et al. Biochemical and immunological methods of regulation systems assessment. Kuybishev, 1989. p. 32. [Углова М.В., Подковкин В.Г., Суздальцева Т.В. и др. Биохимические и иммунологические методы оценки регулирующих систем организма. Куйбышев, 1989. с. 32].
21. Soloviova GA, Zaiceva NN, Telepneva VI. Carbohydrates and Lipids: Biochemical practice. Moscow: Moscow State University publishing house, 1989: 5-78. In Russian [Соловьева Г.А., Зайцева Н.Н., Телепнёва В.И. Углеводы и липиды: Практикум по биохимии. М.: Издательство Московского Университета, 1989: 5-78].
22. Modern method in biochemistry. Ed. by Orechovich VN. Moscow: Medicine, 1977. p. 393. In Russian [Современные методы в биохимии. Под ред. Ореховича В.Н. М.: Медицина, 1977. с. 392].
23. The laboratory method of clinical investigation. Guide. Moscow, 1987. p. 226. In Russian [Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Под ред. Меньшикова В.В. М., 1987. с. 226].
24. The microscopic technique. Guide. Eds. by Sarcisov DS, Perov Yu.L. Moscow: Medicine, 1996. p. 544. In Russian [Микроскопическая техника: Руководство. Под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. М.: Медицина, 1996. с. 544].
25. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Statist. Soc. B. 1995; 57(1): 289-300.
26. Kalueff AV, Stewart AM, Song C et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. Nature reviews: neuroscience. 2016; 17: 45-59.
27. Markel' AL, Galaktionov YuK, Efimov VM. Factor analysis of rat behavior in an open field test. Zhurnal VND. 1988; 38(5): 855-863. In Russian [Маркель А.Л., Галактионов Ю.К., Ефимов В.М. Факторный анализ поведения

ния крыс в тесте «Открытое поле». Журнал ВНД. 1988; 38(5): 855-863].

28. Selye HA syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature. 1936; 138: 32.

29. Baraboi VA. Bioantioxidants. Kiev: Kniga plus, 2006. p. 461. In Russian [Барабой ВА. Биоантиоксиданты. Киев: Книга плюс, 2006. с. 461].

30. Kassil GN, Matlina ESh. Catecholamine exchange under stress and pathways of it purposeful regulation. Central and peripheral mechanisms of vegetative nervous system. 1975: 163-173. In Russian [Кассиль Г.Н., Матлина Э.Ш. Обмен катехоламинов при стрессе и пути его целенаправленного регулирования. Центральные и периферические механизмы вегетативной нервной системы. 1975: 163-173].

31. Avrunin AS. Osteocytic remodeling: question history, modern representations and possibilities of the clinical estimation. Russian traumatology and orthopaedy. 2012; 1(63): 128-134. In Russian [Аврунин А.С. Остеоцитарное ремоделирование: история вопроса, современные представления и возможности клинической оценки. Травматология и ортопедия России. 2012; 1(63): 128-134].

Информация об авторах:

Иванов Дмитрий Геннадьевич, к.б.н., заведующий лабораторией, ФГУП «НЦ «Сигнал»;

Author information:

Dmitry G. Ivanov, PhD, head of laboratory, Scientific center "Signal".