

УДК 612.33

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО УМЕРЕННОГО СТРЕССА НА СОСТОЯНИЕ КИШЕЧНОЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС**Громова Л.В., Дмитриева Ю.В., Алексеева А.С., Полозов А.С., Груздков А.А.***ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург,
e-mail: lvgromova@pavlov.infran.ru*

Трехчасовая ежедневная иммобилизация крыс в течение 16 дней приводила к повышению (по сравнению с контролем – при отсутствии иммобилизации) активности глюкоамилазы (ключевой фермент при гидролизе углеводов) и к увеличению всасывания глюкозы в тонкой кишке после 3-х дней применения стресса. При более длительных сроках проведения опытов (10 и 16 дней) эти показатели не отличались от контроля. Адаптация щелочной фосфатазы и аминопептидазы N (ферменты, которые выполняют, помимо участия в гидролизе жиров и белков, важные защитные функции) к вышеуказанному стресс-фактору происходила в течение более длительного времени (16 дней). Полученные результаты демонстрируют особенности адаптации различных функциональных параметров тонкой кишки крыс к хроническому умеренному стрессу.

Ключевые слова: тонкая кишка, стресс, всасывание глюкозы, пищеварительные ферменты**THE EFFECT OF CHRONIC MODERATE STRESS ON THE STATE OF THE INTESTINAL DIGESTIVE SYSTEM IN RATS****Gromova L.V., Dmitrieva Yu.V., Alekseeva A.S., Polozov A.S., Gruzdkov A.A.***I.P. Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, e-mail: lvgromova@pavlov.infran.ru*

The three-hour everyday immobilization of rats for 16 days resulted in an increase (in comparison with the control – in absence of the immobilization) of activity of glucoamylase (the key enzyme in carbohydrates hydrolysis) and in an increase of glucose absorption in the small intestine after 3 days of the stress applying. At more long terms (10 and 16 days), these indicators did not differ from the control. Adaptation of alkaline phosphatase and aminopeptidase N (the enzymes that perform, in addition to participation in hydrolysis of fats and proteins, important protective functions) to the above stress-factor occurred for longer time (16 days). The results obtained demonstrate the features of adaptation of different functional parameters of the rat small intestine to chronic moderate stress.

Keywords: small intestine, stress, glucose absorption, digestive enzymes

Хронический стресс многими исследователями рассматривается в качестве одной из причин, способствующих развитию таких широко распространённых в мире патологий, как метаболический синдром, диабет 2-го типа, воспалительное заболевание кишечника [1, 2]. В связи с этим большой теоретический и практический интерес представляют исследования, которые направлены на выявление метаболических нарушений, вызванных хроническим стрессом.

В последние годы эффекты хронического стресса в отношении пищеварительной системы, обеспечивающей начальные этапы метаболизма пищевых веществ, широко изучались как на клиническом уровне, так и в модельных опытах на животных. Показано, что для хронического стресса характерно образование язв в желудке и двенадцатиперстной кишке [3], раннее появление признаков воспаления в кишечнике [2] и изменение ряда его функциональных параметров (моторика, кровоток, пассивная проницаемость эпителия) [2]. Вместе с тем до сих пор остаётся недостаточно изученным вопрос о возможном действии хронического стресса на мембранное пищеварение, обеспечивающее заключительные стадии

гидролиза пищевых веществ, а также на систему всасывания глюкозы.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы в опытах на крысах, как экспериментальной модели, оценить влияние хронического умеренного стресса, вызванного ежедневной 3-часовой иммобилизацией животных на протяжении 3–16 дней, на активность ряда мембранных пищеварительных ферментов (глюкоамилаза, щелочная фосфатаза, аминопептидаза N) и на всасывание глюкозы в тонкой кишке.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводились на 48 взрослых крысах (Вистар, самцы, масса тела 180 – 220 г) в полном соответствии с Директивой Европейского Совета (The European Council Directive (86/609/EEC)) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными и одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Перед опытами и в ходе их проведения (за исключением периодов с 3-часовой иммобилизацией крыс опытных групп) животные содержались в нормальных условиях в отношении температуры и освещения, а также имели свободный доступ к стандартному лабораторному корму и воде.

Уровень всасывания глюкозы в тонкой кишке оценивался с использованием разработанной нами ранее методики [4], основанной на существовании высокой степени корреляции между скоростью свободного потребления животными, предварительно голодавшими 18–20 ч, концентрированных растворов глюкозы и способностью тонкой кишки к ее всасыванию.

В предварительных опытах в течение 5–6 ч у всех крыс регистрировалась временная динамика свободного потребления ими раствора глюкозы (200 г/л). Для этого каждое животное после предварительного голодания в течение 18–20 ч помещали в индивидуальную клетку размером 14x21x11 см с двумя мерными поилками, в одной из которых содержался раствор глюкозы в концентрации 200 г/л, а в другой – обычная вода. Однако следует отметить, что на протяжении всего опыта крысы пили только раствор глюкозы. По данным проведенных измерений методом линейной регрессии с использованием программного ресурса «ORIGIN 7» (OriginLab Corporation, USA) для каждого из животных определялось среднее значение объемной скорости (мл/мин) потребления этого раствора во временном интервале от 60 до 300–360 мин, когда, как показали наши предшествующие исследования [4], эта скорость относительно постоянна. На основе результатов, полученных в нескольких предварительных опытах, было сформировано шесть групп крыс (три – опыт и три – контроль) с близкими средними значениями скоростей потребления раствора.

Животных из опытных групп ежедневно подвергали трёхчасовой иммобилизации в отдельных специальных клетках, частично ограничивающих их подвижность, а у контрольных – на 3 часа отбирали корм. Этот вид стрессорного воздействия является моделью умеренного психологического и физического стресса [1]. Опыты с иммобилизацией проводили в дневное время с 10:00 до 13:00.

Уровень всасывания глюкозы в тонкой кишке у всех животных (опытных и контрольных) оценивали через 3, 10 и 16 дней от начала опытов со стрессом в интервале 10:00 и 15:00 ч (в период неактивной фазы питания у крыс). В эти же сроки (по окончании опыта с регистрацией потребления глюкозы) у части опытных и контрольных животных после их декапитации отбирались пробы слизистой оболочки из различных отделов тонкой кишки для определения в них активности пищеварительных ферментов: глюкоамилазы (НФ 3.2.1.3), щелочной фосфатазы (НФ 3.1.3.1) и аминопептидазы N (НФ 3.4.11.2) с использованием общепринятых биохимических методов [5]. При этом для каждого фермента рассчитывались значения как удельной (мкмоль/мин на г ткани), так и интегральной активности с учётом массы слизистой оболочки (мкмоль/мин на участок тонкой кишки или мкмоль/мин на всю кишку). Поскольку при разных вариантах расчётов наблюдались близкие закономерности в изменении ферментативных активностей, в статье приведены лишь данные в отношении интегральной активности (мкмоль/мин на всю кишку).

Кроме того, у некоторых животных из опытных и контрольных групп (n = 6) в 1-й, 4-й, 10-й и 16-й дни опытов через 30 мин после начала стрессорного воздействия из хвостовой вены отбирались пробы крови для определения в них концентрации кортикостерона. Определение проводилось путем иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «Кор-

тикостерон крыса/мышь-ИФА» фирмы ХЕМА в соответствии с инструкцией, приложенной к набору.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. За достоверные принимались различия при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе опытов у крыс, подвергавшихся ежедневной иммобилизации, в первые три дня отмечалось небольшое, статистически недостоверное, снижение прироста массы тела по сравнению с контролем (лишение корма без стресса). Однако в дальнейшем прирост массы тела был близким у крыс опытных и контрольных групп. Снижение массы тела у взрослых или набора массы тела у растущих животных под влиянием иммобилизационного стресса наблюдали также другие исследователи [6–8]. В частности, было установлено, что такое снижение массы тела при хроническом иммобилизационном стрессе обусловлено проявлением анорексии [7, 8].

В первый день опытов иммобилизация животных вызывала значительное, статистически достоверное ($P < 0,003$) повышение уровня кортикостерона в плазме крови по сравнению с контролем ($35,06 \pm 3,79$ мкг/дл против $17,52 \pm 2,32$ мкг/дл). Однако в дальнейшем наблюдалось существенное снижение этого показателя. Так, на 4-й день уровень кортикостерона в опытной группе крыс составлял $21,39 \pm 2,06$ мкг/дл, а в контрольной – $8,47 \pm 2,06$. На 10-й день он был $12,75 \pm 1,64$ и $10,5 \pm 1,52$ мкг/дл в опыте и контроле соответственно, а на 16-й день – $10,55 \pm 1,63$ и $7,1 \pm 1,30$ мкг/дл в опыте и контроле соответственно. Снижение уровня кортикостерона в крови при хронической иммобилизации крыс наблюдали также другие исследователи [7–9]. Этот феномен свидетельствует о проявлении у животных привыкания к многократно повторяющемуся стрессору. Такой ответ глюкокортикоидов считается адаптивным, поскольку он направлен на снижение действия хронического стресса на энергетический баланс [7–9].

В настоящей работе уровень всасывания глюкозы в тонкой кишке оценивался, как указано выше, по скорости свободного потребления животными концентрированного раствора глюкозы. Эта методика позволила впервые исследовать процесс в условиях, максимально близких к естественным.

Через 3 дня стрессорного воздействия у крыс опытной группы наблюдалось хотя и небольшое, но статистически достоверное ($P < 0,05$) повышение по сравнению с контролем всасывания глюкозы в тонкой кишке (рис. 1). Однако в дальнейшем (через

10 и 16 дней) этот показатель возвращался к контрольным значениям. Если принять во внимание полученные нами данные в отношении изменения уровня кортико-стерона в крови на аналогичных сроках, то можно предположить, что именно этот фактор является наиболее существенным в развитии адаптации системы всасывания глюкозы в тонкой кишке к хроническому умеренному стрессу. Такое предположение подкрепляется также другими нашими данными, полученными в предшествующей работе [10], которые свидетельствуют о том, что стимулирующие эффекты кортико-стерона в отношении всасывания глюкозы в тонкой кишке зависят от дозы вводимого гормона.

Наши результаты сложно сравнивать с данными других авторов, которые в своих исследованиях использовали другие модели хронического стресса и другие подходы к определению всасывательной способности тонкой кишки к глюкозе. Тем не менее в отношении характера ответа системы всасывания глюкозы (повышение всасывания) они согласуются с данными, полученными ранее [6], которые демонстрируют повышение экспрессии одного из основных транспортёров глюкозы (SGLT1) в энтероцитах тонкой кишки в ответ на стресс, вызванный ограничением подвижности животных в течение 4 ч ежедневно, в течение 5 дней в неделю на протяжении 8 недель. Кроме того, в литературе имеются данные об увеличении всасывания глюкозы в тон-

кой кишке в условиях *in vitro* и повышении экспрессии двух основных транспортёров глюкозы (SGLT1 и GLUT2) в энтероцитах в ответ на хронический психологический стресс [11].

В настоящем исследовании определялись активности трёх кишечных мембранных ферментов, различающихся по функциональной специализации:

1) глюкоамилазы – ключевой карбо-гидразы, которая участвует в гидролизе α -декстринов, образующихся после расщепления крахмала панкреатической α -амилазой;

2) щелочной фосфатазы, которая выполняет, помимо участия в гидролизе эфиров фосфорной кислоты и в регуляции всасывания липидов [12], также важные защитные функции (участвует в детоксикации бактериального липополисахарида, в снижении воспаления, вызванного этим токсином, а также в ограничении бактериальной транслокации, через эпителий кишечника [13];

3) аминопептидазы N, расщепляющей олигопептиды, и вовлеченной также в транспорт холестерина через кишечный эпителий [14] и в иммунные ответы [15].

Как можно видеть на рис. 2, через три дня стрессорного воздействия активность глюкоамилазы в слизистой оболочке тонкой кишки у крыс опытной группы была повышена на 69% по сравнению с контролем ($P < 0,05$), но на более длительных сроках (через 10 и 16 дней) не отличалась от контрольных значений.

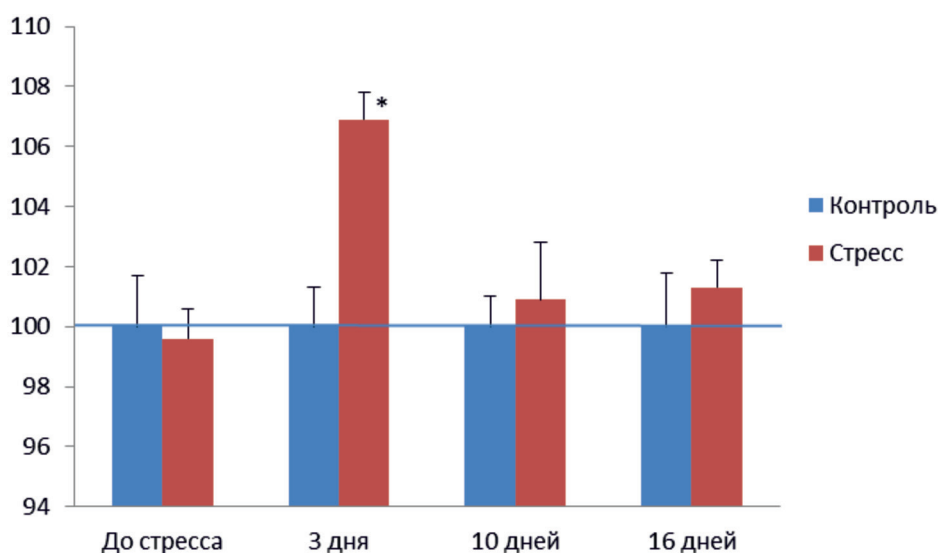


Рис. 1. Скорость свободного потребления концентрированного (200 г/л) раствора глюкозы у контрольных (Контроль) и опытных (Стресс) крыс. По вертикали: скорость потребления глюкозы в % к соответствующему контролю; по горизонтали: время от начала опытов (дни).

* $P < 0,05$ по отношению к контролю

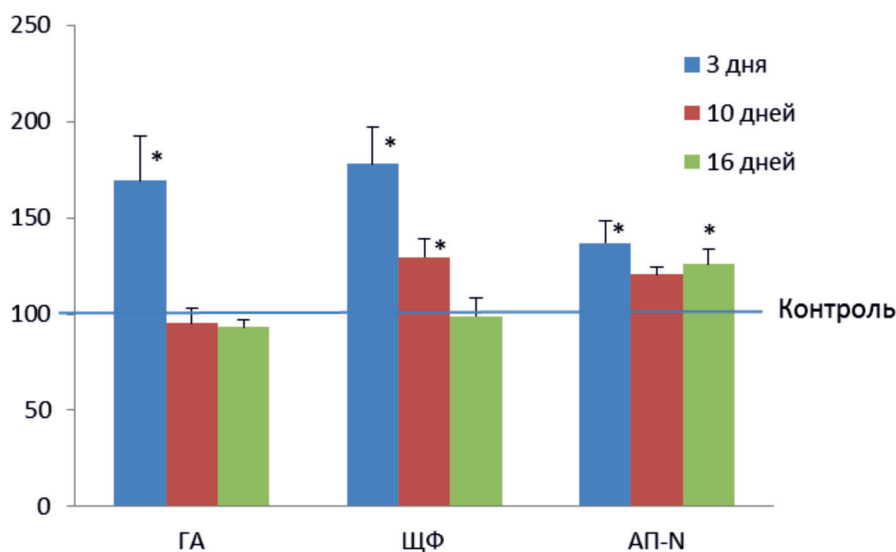


Рис. 2. Активности глюкоамилазы (ГА), щелочной фосфатазы (ЩФ) и аминопептидазы N (АП-N) в различные дни стрессорного воздействия и в контроле. По вертикали: ферментативная активность в % к контролю, принятому за 100; * $P < 0,05$ по отношению к контролю

Поскольку развитие адаптации этой ферментативной активности к хроническому умеренному стрессу происходило примерно так же, как и при всасывании глюкозы, можно предположить, что и в данном случае наиболее существенным фактором в уменьшении реакции со стороны активности фермента являлось снижение концентрации кортикостерона в крови.

Несколько иные особенности развития адаптации наблюдались в отношении двух других ферментов: щелочной фосфатазы и аминопептидазы N (рис. 2). Активность щелочной фосфатазы в тонкой кишке у крыс опытной группы повышалась на 78% по сравнению с контролем ($P < 0,05$) через 3 дня, несколько снижалась через 10 дней (оставаясь выше, чем в контроле) и не отличалась от контроля в конце экспериментального периода (через 16 дней). В то же время активность аминопептидазы N в тонкой кишке у крыс опытной группы, будучи повышенной через 3 дня (на 37% по сравнению с контролем, $P < 0,05$), лишь незначительно снижалась к концу экспериментального периода.

Учитывая то, что эти ферменты, помимо участия в пищеварении, выполняют также важные защитные функции, можно думать, что активация данных функций может влиять на скорость адаптации указанных ферментов к хроническому умеренному стрессу. Принимая во внимание это обстоятельство, можно также предположить, что длительное поддержание на повышен-

ном уровне активности аминопептидазы N в слизистой оболочке тонкой кишки может быть одним из факторов, вносящих вклад в формирование таких неблагоприятных для организма последствий, как повышение уровня холестерина в крови и развитие воспалительного процесса в кишечнике, обусловленного повышенным проникновением через кишечный эпителий некоторых вирусов и патогенных бактерий [15].

В современной литературе можно найти лишь ограниченное число работ, касающихся исследования реакции мембранных пищеварительных ферментов в тонкой кишке на хронический умеренный стресс. В частности, как сообщается в недавней работе [11], авторы не обнаружили изменений активности мальтазы и сахаразы, но наблюдали повышение активности лактазы в слизистой оболочке тонкой кишки в ответ на хронический психологический стресс. Полученные в настоящей работе результаты частично восполняют пробел в данной области исследований, показывая особенности адаптации к хроническому умеренному стрессу таких мембранных пищеварительных ферментов, как глюкоамилаза, щелочная фосфатаза и аминопептидаза N.

Заключение

Таким образом, в ходе нашего исследования показано, что адаптация к хроническому умеренному стрессу, вызванному иммобилизацией животных, по-разному проявляется в отношении различных функ-

циональных показателей тонкой кишки. Способность тонкой кишки к всасыванию глюкозы и активность глюкоамилазы (ключевой фермент при гидролизе углеводов) изменяются лишь в начальный период (через 3 дня) хронического умеренного стресса, а в дальнейшем не отличаются от контроля, тогда как адаптация щелочной фосфатазы и аминопептидазы N (ферменты, которые выполняют, помимо участия в гидролизе жиров и белков, важные защитные функции) к вышеуказанному стресс-фактору происходит в течение более длительного времени.

Список литературы

1. Patterson Z.R., Abizaid A. Stress induced obesity: lessons from rodent models of stress // *Frontiers in Neuroscience / Neuroendocrine Science*. – 2013. – Vol. 7. – Article 130.
2. Konturek P.C., Brzozowski T., Konturek S.J. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 62, № 6. – P. 591–599.
3. Филаретова Л.П. Гастропротективная роль глюкокортикоидных гормонов при действии нестероидных противовоспалительных препаратов // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2009. – Т. 95, № 3. – С. 250–261.
4. Груздков А.А. и др. Скорость свободного потребления крысами раствора глюкозы как критерий оценки ее всасывания в тонкой кишке (Экспериментальное исследование и математическое моделирование) // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2015. – Т. 101, № 6. – С. 708–720.
5. Мембранный гидролиз и транспорт: Новые данные и гипотезы / под ред. акад. А.М. Уголева. – Ленинград: Издательство «Наука», 1986. – 240 с.
6. Lee C.Y. Chronic restraint stress induces intestinal inflammation and alters the expression of hexose and lipid transporters // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2013. – Vol. 40, № 6. – P. 385–391.
7. Jeong J.Y., Lee D.H., Kang S.S. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice // *Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 28, № 4. – P. 288–296.
8. Zhang W. et al. Greater physiological and behavioral effects of interrupted stress pattern compared to daily restraint stress in rats // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 7. – P. 1–9.
9. Chagra S.L. et al. Acute and repeated restraint differentially activate orexigenic pathways in the rat hypothalamus // *Regul. Pept.* – 2011. – Vol. 167, № 1. – P. 70–78.
10. Громова Л.В. и др. Эффект хронического введения повышенных доз кортикостерона на всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2016. – № 9-2. – С. 248–251.
11. Toyoda A., Iio W., Matsukawa N., Tsukahara T. Influence of chronic social defeat stress on digestive system functioning in rats // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. – 2015. – Vol. 61, № 3. – P. 280–284.
12. Estaki M., DeCoffe D., Gibson D.L. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20, № 42. – P. 15650–15656.
13. Lalles J.P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects // *Nutr. Rev.* – 2014. – Vol. 72, № 2. – P. 82–94.
14. Kramer W. et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 2. – P. 1306–1320.
15. Melkebeek V. et al. Targeting aminopeptidase N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response // *Mucosal Immunol.* – 2012. – Vol. 5, № 6. – P. 635–645.