

ВЛИЯНИЕ ИНЪЕКЦИЙ ГИДРОКОРТИЗОНА НА МЕТАБОЛИЗМ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У КРЫС

© 2004 О.В.Грибкова, В.Г.Подковкин¹

Была опробована модель экспериментального остеопороза у крыс. Выявлены изменения уровня 11-оксикортикостероидов в надпочечниках животных, которые свидетельствуют о развитии стрессовой реакции. Обнаружено снижение активности щелочной фосфатазы, являющееся одним из показателей скорости синтеза коллагена. Установлено отсутствие нарушений фосфорно-кальциевого обмена у крыс после эксперимента.

Введение

С возрастом в организме происходит огромное количество изменений как на тканевом уровне, так и на клеточном. Многие из этих изменений затрагивают метаболизм соединительной ткани, приводя к серьезным нарушениям и заболеваниям. Одним из негативных последствий является развитие остеопороза [1, 2].

Ученые занимаются моделированием процессов, вызывающих отрицательные изменения в организме. Перед ними встает задача разработки способов воспроизведения различных патологических процессов в организме в эксперименте. В качестве воздействий, приводящих к развитию остеопороза, используют инъекции гормонов различных концентраций. В подобных экспериментах, как правило, изучают реакцию организма, уделяя большее внимание морфологическим аспектам изменений костной ткани, чем биохимическим [3, 4]. Поэтому наши исследования посвящены изучению ряда биохимических показателей, связанных с функционированием соединительной ткани, таких, как содержание кальция и неорганического фосфора в крови, свободного и белковосвязанного оксипролина в плазме, 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в надпочечниках крыс, активность щелочной фосфатазы (ЩФ).

¹Грибкова Ольга Витальевна (hont317@newmail.ru), Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

1. Материалы и методы исследований

Эксперименты по исследованию реакции метаболизма костной ткани на введение гидрокортизона проведены на 38 крысах-самцах.

Животным делали ежедневные внутримышечные инъекции растворов гидрокортизона с концентрацией 1, 2, 5 и 10 мкг/кг в течение 2 недель. Контрольным животным ежедневно вводили физиологический раствор.

Экспериментальные животные содержались вместе с контрольными в аналогичных условиях. Через две недели животных выводили из эксперимента путем декапитации. Собирали кровь, извлекали надпочечники. В плазме определяли свободный и белковосвязанный оксипролин [5], в надпочечниках — 11-ОКС [6], в сыворотке определяли кальций [7], неорганический фосфор и активность щелочной фосфатазы [8]. Дополнительно измеряли массу надпочечников и тела и вычисляли относительную массу надпочечников.

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием стандартного критерия t Стьюдента [9].

2. Результаты исследований

Для отражения изменений обмена костной ткани у крыс были выбраны наиболее важные показатели — это показатели, отражающие состояние органического и минерального компонентов костной ткани, и показатели, характеризующие работу гормональных систем.

При изучении органической составляющей не наблюдалось существенных изменений содержания свободного оксипролина во всех группах экспериментальных животных по сравнению с контролем (см. таблицу).

Следует отметить, что содержание белковосвязанного оксипролина повысилось только в группе крыс, которым делали инъекции гидрокортизона концентрацией 5 мкг/кг. Тогда как в других группах животных не наблюдалось изменений концентрации белковосвязанной формы этой аминокислоты.

При исследовании активности ЩФ выявлены волнообразные изменения данного показателя: снижение активности фермента произошло в группах животных, которым вводили раствор гормона с концентрацией 1 и 2 мкг/кг, а повышение — при концентрации 10 мкг/кг.

При изучении влияния инъекций гидрокортизона на минеральный обмен определяли уровни кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови. Было выяснено, что практически во всех группах данные показатели в сыворотке не отличаются от таковых в контрольной группе. Так, не отмечено изменений содержания кальция у подвергшихся действию гидрокортизона животных по сравнению с контролем. Повышение уровня неорганического фосфора в пределах нормы наблюдается в группах крыс, которым делали инъекции гормона с концентрацией 5 и 10 мкг/кг.

Таблица

**Влияние инъекций гидрокортизона различных концентраций
на биохимические показатели организма крыс**

Количество гидрокортизона, мкг/кг	Свободный окси-пролин, мкМ/л	Белково-связанный оксипролин мкМ/л	ЩФ Ед/л	11-ОКС в надпочечниках мкг/г	Кальций в сыворотке, мМ/л	Неорганический фосфор в сыворотке мМ/л	Относительная масса надпочечника
10 (6)	22,1± 2,1	531,7± 19,2	331,7± 21,4*	99,2± 16,1	1,28± 0,05	3,93± 0,31*	0,076± 0,012
5 (8)	24,5± 2,9	581,7± 15,7*	257,1± 15,3	114,4± 6,9*	1,38± 0,02	3,74± 0,25*	0,078± 0,009
2 (8)	20,3± 2,9	505,5± 6,2	219,0± 6,6*	149,2± 22,0*	1,38± 0,09	3,39± 0,20	0,053± 0,006*
1 (8)	18,1± 1,4	536,9± 25,9	241,2± 14,3*	105,4± 6,2*	1,31± 0,04	3,34± 0,08	0,066± 0,004
Контроль (8)	19,7± 0,5	512,8± 21,9	279,1± 7,2	90,5± 4,5	1,26± 0,06	3,00± 0,22	0,062± 0,004

*Примечания: отличия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

В скобках указано количество животных.

Повышение концентрации 11-ОКС в надпочечниках отмечалось во всех группах экспериментальных животных, кроме группы с наибольшей концентрацией гидрокортизона. Максимальной величины данный показатель достиг у тех животных, которым делали инъекции гормона с концентрацией 2 мкг/кг.

Было также отмечено, что относительная масса надпочечников не претерпела существенных изменений. Снижение этого показателя наблюдается только в группе крыс, которым вводили раствор гормона с концентрацией 2 мкг/кг.

3. Обсуждение результатов

Для выяснения влияния внутримышечных инъекций гидрокортизона на обмен костной ткани у крыс стоило остановиться на изучении изменений содержания свободного и белковосвязанного оксипролина, показателя метаболизма коллагена, а также на исследовании уровня кальция и неорганического фосфора, участников кальцификации данного вида соединительной ткани. Необходимо изучение изменений активности щелочной фосфатазы, фермента, играющего одну из главных ролей в обмене фосфорилированных соединений в различных тканях. Помимо этого важно исследование картины стрессовых реакций организма экспериментальных животных на гормональное воздействие, приводящее к изменению функционального состояния костной ткани.

Как уже было отмечено, в плазме крови крыс не произошло серьезных изменений содержания свободного оксипролина по сравнению с контролем. Можно лишь указать на тенденцию к увеличению этого показате-

ля в группах крыс, которым вводили растворы гормона с концентрацией 5 и 10 мкг/кг. Это позволяет говорить об отсутствии существенных влияний подобного воздействия на обмен коллагена в течение первых двух недель и появлении небольшой тенденции к усилению катаболизма коллагена.

Наряду с отсутствием изменений содержания свободного оксипролина отмечалось аналогичная картина в отношении уровня белковосвязанной формы этой аминокислоты. Лишь в одной группе животных, которым делали инъекции гидрокортизона с концентрацией 5 мкг/кг, наблюдалось увеличение данного показателя. Подобная реакция уровня белковосвязанного оксипролина может быть обусловлена недостаточно большим сроком воздействия (всего 2 недели).

Как было уже отмечено, что изменения уровня кальция не существенны по сравнению с контролем, а повышение уровня неорганического фосфора в сыворотке крови в пределах нормы. Отсутствие статистически значимых изменений данных показателей после двух недель ежедневных инъекций гидрокортизона может объясняться срабатыванием механизмов поддержания фосфорно-кальциевого гомеостаза. В этих процессах принимает участие гипокальциемический гормон кальцитонин. Кальцитонин оказывает значительный эффект на метаболизм фосфата. Он способствует входу фосфата в клетки костной ткани и периостальную жидкость, снижая при этом выход кальция в плазму крови. Что немаловажно, вход фосфата может сопровождаться и входом кальция [10].

Необходимо указать на то, что происходит повышение активности ЩФ в группе крыс, которым вводили гидрокортизон с наибольшей концентрацией 10 мкг/кг, на фоне увеличения содержания неорганического фосфора в сыворотке крови. Как известно, щелочная фосфатаза принимает участие в регуляции обмена фосфорилированных соединений, а также в поддержании определенного уровня фосфата [11]. Таким образом, повышение активности ЩФ связано с изменением содержания фосфора в крови.

Интересно, что в группах животных, в которых применяли низкие концентрации гормона, происходило снижение активности ЩФ. Возможно, это явление связано с реализацией гормональных эффектов в организме. Многие реакции организма определяются уровнем содержания того или иного гормона: при низком уровне это одни, а при высоких — другие [12].

Увеличение содержания 11-ОКС в надпочечниках может быть результатом развития стрессовой реакции. При этом не отмечено повышения уровня 11-ОКС в группе животных, которым делали инъекции гидрокортизона с концентрацией 10 мкг/кг. Подобная реакция надпочечников может быть объяснена регуляцией уровня 11-ОКС по принципу обратной связи при поступлении дополнительной порции гормона в кровь извне.

Отмеченная ранее тенденция к увеличению содержания свободного оксипролина в плазме крови согласуется с повышением уровня 11-ОКС. Кортикостероиды являются регуляторами белкового обмена и вызывают катаболический эффект в соединительной ткани [13].

Отсутствие корреляции между уровнем 11-ОКС в надпочечниках и значениями относительной массы надпочечников может быть обусловлено недостаточным сроком для развития изменений в железах. Только в одном случае отмечено снижение относительной массы надпочечников, в группе крыс, которым вводили гидрокортизон с концентрацией 2 мкг/мл. В этой же группе наблюдалось максимальное повышение уровня 11-ОКС. Из литературы известно [14], что стресс, которому подверглись животные, вызывает повышение уровня глюкокортикоидов в надпочечниках. Это обеспечивает адаптацию организма к неблагоприятным воздействиям. При этом возможно развитие дистрофии желез внутренней секреции. Полученные нами данные свидетельствуют о сохранении глюкокортикоидной реакции в организме крыс во всех группах животных, за исключением группы с максимальной концентрацией гормона. Длительные изменения уровня кортикостероидов приводят к серьезным изменениям в организме, среди которых отмечаются нарушения строения и функционирования костной ткани. При увеличении содержания 11-ОКС происходит развитие остеопороза.

Литература

- [1] Delmas P.D. Markers of bone turnover for monitoring treatment of osteoporosis with antiresorptive drugs // *Osteoporos. Int.* 2000. V. 11. No.6. P. 66–76.
- [2] Garnero P., Sornay—Rendu E., Chapuy M.C., Delmas P.D. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis // *J. Bone Miner. Res.* 1996. V. 11. P. 827–834.
- [3] Дедов И.И., Рожинская Л.Я., Марова Е.И. Первичный и вторичный остеопороз: патогенез, диагностика, принципы профилактики и лечения: Методич. пособие для врачей, 2-е издание. М.: Медицина, 2002. 143 с.
- [4] Herbert B., Lecouturier A., Masquelier D., Hauser N., Remacle C. Ultrastructure and cytochemical detection of alkaline phosphatase in long-term cultures of osteoblast-like cells from rat calvaria // *Calcif. Tissue Int.* 1997. V. 60. P. 216–223.
- [5] Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. М.: Медицина, 1977. 392 с.
- [6] Биохимические и иммунологические методы оценки регулирующих систем организма / Под ред. М.В.Угловой. Куйбышев, 1989. С. 17–18.
- [7] Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В.Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 366 с.
- [8] Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. 250 с.

- [9] Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум. Самара: Изд-во СамГУ, 1997. 265 с.
- [10] Биохимия человека: В 2 т. М.: Мир, 1998. Т. 1. 360 с.
- [11] Торбенко В.П., Касавина Б.С. Функциональная биохимия костной ткани. М.: Медицина, 1977. 272 с.
- [12] Виноградов В.В. Стресс: Морфология коры надпочечников. Минск: Белорусская наука, 1998. 319 с.
- [13] Мазуров В.И. Биохимия коллагеновых белков. М.: Медицина, 1974. 248 с.
- [14] Александров В.Н. Гуморальный иммунный ответ после травмы различной тяжести // Патол. Физиология и эксперим. Терапия. 1983. №4. С. 70–73.

Поступила в редакцию 1/IX/2004;
в окончательном варианте — 1/IX/2004.

EFFECT OF HYDROCORTISONE INJECTION ON RAT'S CONJUNCTIVE TISSUE METABOLISM

© 2004 O.V.Gribkova, V.G.Podkovkin²

In this paper a model of the experimental osteoporosis in rat's is tested. The increase of corticosteroid rate that causes the development of osteoporosis is detected. It is shown that activity of alkaline phosphates have the undulating character. The tendency of the free hydroxyproline concentration towards decrease is observed. The changes of the inorganic phosphorus rate within the limits of physiological norm are found. Serious alterations of the calcium concentration are not found out. These results demonstrate the partial development of osteoporosis.

Paper received 1/IX/2004.

Paper accepted 1/IX/2004.

²Gribkova Olga Vitalievna (hont317@newmail.ru), Podkovkin Vladimir Georgievich (podkovkin@rambler.ru), Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.