

СОСТОЯНИЕ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ И ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ОКСИПРОЛИНА У КРЫС ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2006 В.Г.Подковкин, Д.Г.Иванов¹

В работе исследовано изменение состояния надпочечников и содержания свободного и белковосвязанного оксипролина в плазме крови крыс в результате ежедневного температурного воздействия. Для характеристики состояния надпочечников определяли массу железы, содержание адреналина, норадреналина в надпочечниках и 11-оксикортикостероидов в надпочечниках плазме крови и печени. Показана волнообразная динамика изменения этих показателей и корреляция между изменением уровня 11-оксикортикостероидов в надпочечниках и белковосвязанного оксипролина в плазме.

Введение

В экспериментальной практике часто возникает необходимость в отработке методов создания модельных ситуаций тех или иных патологических процессов для возможности их дальнейшего исследования. В целях испытания лекарственных препаратов, предотвращающих различного рода остеопении, и биокерамики, используемой в ортопедической практике, становится актуальной разработка экспериментальных моделей развития различного рода остеопений у лабораторных животных.

В настоящее время предложено несколько способов индукции резорбции костной ткани в эксперименте: овариоэктомия и гастрэктомия, введение глюкокортикоидов и гепарина, иммобилизация и др. [11–14]. В их числе предложен способ температурного воздействия на животных.

Влияние температурного стресса у крыс на обмен костной ткани было показано ранее [7]. Однако в этой работе были использованы двухнедельные сроки температурного воздействия на крыс и не показана динамика развития остеопоротических изменений в кости. В целях лабораторного моделирования остеопороза и исследования механизма развития остеопении на ранних этапах температурного воздействия представляется интересным исследовать динамику развития резорбции костной ткани крыс в более короткие сроки температурного воздействия.

Кроме того, в работе [7] показано стрессовое воздействие температуры на лабораторных животных и сделано предположение в пользу того, что остеопения развивается в результате температурного воздействия за счет повышения содержания глюкокортикоидов в организме животного. Поэтому параллельно с маркерами резорбции костной ткани необходимо диагностировать состояние надпочечников.

¹Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler.ru), Иванов Дмитрий Геннадьевич (dg1983@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Целью нашей работы было исследовать состояние надпочечников и концентрацию оксипролина в крови лабораторных животных в результате температурного воздействия.

1. Материалы и методы

Исследования проведены на лабораторных беспородных крысах-самцах массой 80–110 г.

В эксперименте исследовали две группы животных. Животные первой группы помещались в камеру с температурой воздуха 70 °С ежедневно в течение 9 суток. Продолжительность воздействия составляла 9 мин, а затем увеличивалась на 15 секунд ежедневно.

Животные второй группы служили контролем. Контрольных животных содержали в аналогичных условиях в клетках, находившихся в том же помещении. Все животные получали одинаковое питание.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации на третьи, пятые, седьмые и девятые сутки. Одновременно с животными опытной группы забивали одно или два животных контрольной группы. Забитых животных взвешивали и определяли среднюю массу в группах. Масса забитых в различные сроки животных опытной группы не отличалась значимо между собой и от средней массы животных контрольной группы.

У декапитированных животных отбирали на анализ печень, надпочечники и плазму.

Надпочечники взвешивали, и гомогенизировали. Содержание 11-оксикортикостероидов определяли в левом надпочечнике, плазме крови и печени по методу Ю.А. Панкова, И.Я. Усватовой, в модификации В.Г. Подковкина [5]. Концентрацию адреналина и норадреналина определяли в правом надпочечнике по методу Э.Ш. Матлиной и соавт., в модификации В.Г. Подковкина [6]. Свободный и белковосвязанный оксипролин определяли в плазме крови по реакции с п-диметил-аминобензальдегидом [8].

Полученные результаты были обработаны с помощью стандартного *t*-критерия Стьюдента и с помощью корреляционного анализа [10].

2. Результаты

В эксперименте масса надпочечников значимо возрастала относительно контроля у крыс забитых на пятые и седьмые сутки эксперимента. На девятые сутки этот показатель снижался и не отличался значимо от контроля. На третьи сутки нагрева масса надпочечников животных опытной группы была ниже массы надпочечников животных контрольной группы.

Содержание катехоламинов в надпочечниках крыс на протяжении всего времени нагрева имело волнообразную динамику. Концентрация адреналина в правой железе значимо снижалась относительно контроля на третьи и седьмые сутки температурного воздействия, а на пятые и девятые сутки эксперимента эти показатели не отличались от контроля достоверно. Уровень норадреналина в правом надпочечнике опытных животных на протяжении всего эксперимента не имел значимых отличий от контроля. При этом можно отметить тенденцию к увеличению содержания норадреналина в железе на третьи сутки температурного воздей-

ствия и снижение концентрации этого гормона в последующие дни эксперимента (табл. 1).

Мы наблюдали волнообразную динамику 11-оксикортикостероидов в эксперименте. У животных забитых на третьи, седьмые и девятые сутки содержание 11-оксикортикостероидов в надпочечниках было выше относительно содержания 11-оксикортикостероидов в надпочечниках контрольной группы. При этом у животных забитых на пятые сутки эксперимента этот показатель снижался относительно контрольной группы. Содержание 11-оксикортикостероидов в плазме крови животных экспериментальных групп не отличалось достоверно от уровня 11-оксикортикостероидов в плазме крови животных контрольной группы, кроме животных забитых на девятые сутки эксперимента, у которых этот показатель достоверно снижался относительно контрольных животных. Содержание 11-оксикортикостероидов в печени крыс всех опытных групп было достоверно выше концентрации 11-оксикортикостероидов в печени контрольных животных (табл. 1).

Динамика содержания свободного и белковосвязанного оксипролина представлена в табл. 2. Уровень свободного оксипролина в плазме крови крыс было достоверно выше у животных забитых на пятые и седьмые сутки эксперимента, относительно того же показателя у животных контрольной группы. У животных забитых на третьи сутки эксперимента этот показатель был ниже, относительно контроля, а на седьмые сутки снижался недостоверно. Содержание белковосвязанного оксипролина было на порядок выше, чем содержание свободного оксипролина, и имело обратную динамику изменению содержания свободного оксипролина. Из табл. 2 видно, что содержание белковосвязанного оксипролина в плазме крови крыс забитых на третьи и седьмые сутки было достоверно выше, содержания белковосвязанного оксипролина в плазме крови животных контрольной группы. При этом у животных забитых на пятые и девятые сутки эксперимента нами было отмечено снижение этого показателя относительно контрольных животных.

Коэффициент корреляции между уровня свободного оксипролина в плазме и содержанием 11-ОКС в надпочечниках был равен $-0,62$, а белковосвязанного оксипролина в плазме и содержанием 11-ОКС в надпочечниках был равен $0,70$.

3. Обсуждение

Наблюдаемое нами в эксперименте увеличение массы надпочечников крыс на пятые и седьмые сутки температурного воздействия может косвенно отражать развитие стрессовой реакции у животных, т.к. средняя масса животных опытной группы, забитых в различные экспериментальные сроки, и в контроле не отличалась. Вероятно, увеличение массы желез обусловлено гипертрофией коры надпочечников вследствие повышения активности процессов синтеза глюкокортикоидов [1]. Характерно повышение содержания глюкокортикоидов в левом надпочечнике животных в этот период. Снижение массы надпочечников на девятые сутки эксперимента, по-видимому, можно объяснить истощением желез.

В эксперименте мы не обнаружили значимых отличий в содержании норадреналина в правом надпочечнике крыс подвергнутых различному по продолжительности тепловому воздействию. С другой стороны концентрация адреналина в железе имела волнообразную динамику. В целом можно отметить тенденцию к снижению содержания адреналина в надпочечниках у крыс опытной группы, относительно контроля.

Необходимо отметить, что повышение концентрации адреналина в железе, до

Таблица 1

Показатели, характеризующие состояние надпочечников и содержание 11-оксипролина в плазме крови крыс в эксперименте

Анализируемый образец	Группа животных				
	Контроль	3 сутки	5 сутки	7 сутки	9 сутки
Масса надпочечников, мг	14,08 ± 0,71	12,98 ± 0,81	16,31 ± 0,62*	16,50 ± 0,71*	14,54 ± 0,85
Содержание адреналина в правом надпочечнике, нмоль/мг	1642,87 ± 150,71	980,81 ± 185,69*	1250,97 ± 120,90	765,26 ± 65,54*	1766,45 ± 344,99
Содержание норадреналина в правом надпочечнике, нмоль/мг	72,72 ± 21,81	73,42 ± 19,76	32,79 ± 9,02	47,00 ± 23,18	44,16 ± 16,40
Содержание 11-ОКС в левом надпочечнике, мкг/мг	0,15 ± 0,01	0,24 ± 0,02*	0,11 ± 0,01*	0,27 ± 0,02*	0,23 ± 0,01*
Содержание 11-ОКС в плазме крови, мкг/мл	0,91 ± 0,07	0,71 ± 0,13	0,74 ± 0,12	0,91 ± 0,14	0,57 ± 0,08*
Содержание 11-ОКС печени, мг/г	0,0073 ± 0,0004	0,0109 ± 0,0009*	0,0136 ± 0,0014*	0,0119 ± 0,0009*	0,0126 ± 0,0008*

* — значимость результатов относительно контроля $p < 0,05$

Таблица 2

Показатели, характеризующие состояние надпочечников и содержание 11-оксипролина в плазме крови крыс в эксперименте

Анализируемый образец	Группа животных				
	Контроль	3 сутки	5 сутки	7 сутки	9 сутки
Содержание свободного оксипролина, мкг/мл	1,24 ± 0,17	0,75 ± 0,14*	2,27 ± 0,28*	1,06 ± 0,12	1,92 ± 0,28*
Содержание белковосвязанного оксипролина, мкг/мл	11,76 ± 0,27	16,22 ± 1,50*	10,49 ± 1,28	15,32 ± 1,38*	10,60 ± 0,39*

* — значимость результатов относительно контроля $p < 0.05$

уровня, не отличающегося значимо от значений содержания адреналина в надпочечнике контрольных животных, следовало через двое суток после повышения концентрации 11-оксикортикостероидов. Такое наблюдение позволяет предположить, что температурное воздействие на крыс в эксперименте влияло на мозговой слой надпочечников опосредовано, через изменение содержания глюкокортикоидов. Из литературы известно, что функциональная связь коркового и мозгового слоя надпочечников состоит в том, что кровь из коркового слоя надпочечников, прежде чем попасть в общий кровоток перфузирует мозговой слой надпочечников, поэтому хромоаффинные клетки оказываются под непосредственным контролем глюкокортикоидов. Последние же, регулируя активность фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы и концентрацию S-аденозилметионина, оказывают влияние на синтез адреналина, но при этом не затрагивают синтез норадреналина [9]. На отсутствие реакции со стороны мозгового слоя надпочечников при температурном воздействии на животных было указано и ранее [3].

Отмеченное нами повышенное содержание глюкокортикоидов в коре надпочечников свидетельствует о том, что у животных в результате нагревания развивалась стрессовая реакция [1]. Отсутствие заметного повышения содержания 11-оксикортикостероидов в плазме крови крыс, вероятно можно объяснить интенсивной утилизацией гормонов в печени животных, т.к. в нашем эксперименте было отмечено достоверное повышение уровня содержания 11-оксикортикостероидов в плазме (табл. 1).

В литературе показано, что глюкокортикоиды синтезируются преимущественно в пучковой зоне коры надпочечников, однако при стрессе в процессе синтеза глюкокортикоидов может включаться и сетчатая зона [1]. Резкое снижение 11-оксикортикостероидов в коре надпочечников крыс на пятые сутки, отмеченное в нашей работе (табл. 1), вероятно можно объяснить истощением клеток пучковой зоны коры. На снижение активности синтеза глюкокортикоидов отчасти указывает и снижение содержания 11-оксикортикостероидов в печени животных забитых на седьмые сутки эксперимента. Таким образом, можно предположить, что на седьмые сутки и в последующие дни эксперимента повышение содержания 11-оксикортикостероидов в надпочечниках крыс вызвано включением компенсаторных механизмов.

Уровень свободного и белковосвязанного оксипролина в крови отражает обмен коллагена в организме. При этом по содержанию свободного оксипролина судят

о процессах синтеза коллагена, а белковосвязанного — о процессах его деградации [2]. Между тем имеются данные, что метаболическая активность коллагена в костной ткани выше, чем в коже и других тканях. В настоящее время установлено, что содержание метаболитов коллагена в виде свободного и белковосвязанного оксипролина в биологических жидкостях отражает в основном метаболизм костного коллагена [11].

В эксперименте нами была отмечена корреляция между содержанием белковосвязанного оксипролина и содержанием 11-оксикортикостероидов в плазме. В целом такая корреляция была ожидаема, так как катаболическое действие глюкокортикоидов на костную ткань хорошо известно [4]. По современным представлениям эффект, оказываемый глюкокортикоидами на кость, достигается через ингибирование активности остеобластов [12].

Заключение

В целом, в проведенном нами эксперименте развитие стрессовой реакции у крыс обусловленной ежедневным температурным воздействием начиналось уже на третьи сутки воздействия и носило волнообразный характер вплоть до девятых суток. Вместе с тем в ранние сроки температурного воздействия увеличивалась концентрация белковосвязанного оксипролина и снижался уровень свободного оксипролина в плазме крови крыс. В дальнейшем изменение концентрации белковосвязанного оксипролина коррелировало с содержанием 11-оксикортикостероидов в надпочечниках.

Литература

- [1] Винаградов, В.В. Стресс: Морфобиология коры надпочечников / В.В. Винаградов. — Минск: Беларуская навука, 1998. — 319 с.
- [2] Герасимов, А.М. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии / А.М. Герасимов, Л.Н. Фурцева. — М.: Медицина, 1986. — 240 с.
- [3] Грибкова, О.В. Влияние аллогенного гидроксипатита и постоянного магнитного поля на показатели метаболизма костной ткани и функциональное состояние коры надпочечников: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О.В. Грибкова. — Самара, 2005. — 19 с.
- [4] Егорова, Л.И. Лечение глюкокортикоидами и АКТГ / Л.И. Егорова. — М.: Медицина, 1965. — 306 с.
- [5] Подковкин, В.Г. Микромодификация метода определения 11-оксикортикостероидов / В.Г. Подковкин // Деп. в ВИНТИ 4.7.1988. №5348-В 88.
- [6] Подковкин, В.Г. Микрометод определения катехоламинов в крови и тканях мелких лабораторных животных / В.Г. Подковкин // Деп. в ВИНТИ 4.7.1988 №5349-В 88
- [7] Подковкин, В.Г. Влияние искаженного геомагнитного поля на метаболизм соединительной ткани у крыс при тепловой нагрузке / В.Г. Подковкин, О.В. Грибкова // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2005. — Т. 45. — №4. — 32 с.
- [8] Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 392 с.
- [9] Теппермен, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы / Дж. Теппермен, Х. Теппермен. — М.: Мир, 1989. — 656 с.

- [10] Фролов, Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование / Ю.П. Фролов. – Самара: Изд-во СамГУ, 1997. – 265 с.
- [11] Биохимия костной и хрящевой ткани / Л.Н. Фурцева // Актуальные проблемы теоретической и клинической ортопедологии / Под ред. Ю.И. Денисов-Никольский, С.П. Миронов, Ю.П. Омеляненко, И.В. Матвейчук. – М.: ОАО "Типография "Новости", 2005. – 336 с.
- [12] Цыган Е.Н., Деев Р.В. Морфофункциональные основы остеопороза / Е.Н. Цыган, Р.В. Деев. – СПб.: ВМедА, 2005. – 116 с.
- [13] Pharmacological treatment of osteopenia induced by gastrectomy or ovariectomy in young female rats / Andersson N., [et al.] // Acta Orthop Scand. – 2004. – V. 75(2). – P. 201–209.
- [14] Bisphosphonate effects in rat unloaded hindlimb bone loss model: three-dimensional microcomputed tomographic, histomorphometric, and densitometric analyses / Barou O., [et al.] // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1999. – Vol. 291. – No. 1. – P. 321–328.
- [15] Prevention and treatment of osteopenia in the ovariectomized rat: effect of combined therapy with estrogens, 1-alpha vitamin D and prednisone / P. Geusens [et. al.] // Calcif. Tissue Int. – 1991. – V. 48. – P. 127–137.
- [16] Mmutoh, S. Characterization of heparin-induced osteopenia in rats / S. Mmutoh, N.I. Takeshita, T. Yoshino // Endocrinology. – 1993. – V. 133. – No. 6. – P. 2743–2748.

Поступила в редакцию 26/VIII/2006;
в окончательном варианте — 26/VIII/2006.

ADRENALS STATE AND OXIPROLINE CONTENT DYNAMICS OF RATS UNDER TEMPERATURE EFFECT

© 2006 V.G. Podkovkin, D.G. Ivanov²

In the paper the adrenals state and both free and proteinbinding oxiprolines content in plasma of rats under daily temperature effect are studied. The weigh of glands and adrenalin, noradrenalin, 11-oxycorticosteroids content in adrenals, liver and plasma for characteristic adrenals status are analyzed. In an experiment the wavy dynamics of these makers and correlation between 11-oxycorticosteroids content in adrenals and proteinbinding oxiprolines content in plasma are observed.

Paper received 26/VIII/2006.
Paper accepted 26/VIII/2006.

²Podkovkin Vladimir Georgievich (podkovkin@rambler.ru), Ivanov Dmitriy Gennadevich (dg1983@rambler.ru), Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.