

Действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда на функциональное состояние надпочечников и щитовидной железы при остром стрессе

Л.И. Надольник*, О.М. Балаева-Тихомирова**, С.С. Чумаченко*,
С.И. Денисова**, А.А. Чиркин**

**Государственное учреждение «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»*

*** Учреждение образования «Витебский государственный
университет им. П.М. Машерова»*

В гемолимфе куколок дубового шелкопряда, находящихся в диапаузе 7–8 месяцев, содержатся вещества, необходимые для формирования эукариотического организма – бабочки, а также вещества, обеспечивающие антиоксидантное и другое защитное действие, что препятствует повреждению молекул, из которых формируется новый организм бабочки. Показано, что экстракты из гемолимфы куколок дубового шелкопряда обладают низкой токсичностью, антиоксидантной, бактериостатической и иммуномодулирующей активностями [1–2]. Экстракт куколок дубового шелкопряда содержит жиро- и водорастворимые витамины, набор аминокислот, макро- и микроэлементы, что обеспечивает широкий спектр биостимулирующих и противоопухолевых эффектов [3–4]. Однако до настоящего времени не изучено действие гидрофильных компонентов гемолимфы куколок дубового шелкопряда на эндокринную систему млекопитающих. В связи с этим целью работы было изучение влияния водного экстракта куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ) на функциональное состояние коркового вещества надпочечников и щитовидной железы крыс при остром стрессе.

Материал и методы. В работе изучалось действие гидрофильных компонентов экстракта из куколок дубового шелкопряда, полученного по методу В.А. Трокоз [5]. В работе были проанализированы результаты двух серий экспериментов с использованием самок крыс Вистар массой 220–250 г.

Животные первой серии были разделены на 6 групп. ЭКДШ (разведение 1:20 с содержанием 35 мкг/мл суммы свободных аминокислот) вводили в трех дозах (100, 500 и 1000 мкл) внутривентрально за 1 час до стрессорного воздействия. В группе 2 ЭКДШ

вводили за 1 час 40 минут до декапитации. Стрессорное воздействие проводилось в специально оборудованных клетках и включало одновременное импульсное раздражающее действие звукового зуммера, света и электрического тока, которое длилось на протяжении 40 минут. Животные были декапитированы. Для исследования были взяты сыворотка крови и надпочечники.

Животным второй серии экспериментов ЭКДШ вводили за 24 часа до начала стрессорного воздействия. Длительность воспроизведения стресса была сокращена до 20 минут. Животные были разделены на 10 групп. ЭКДШ вводили в четырех дозах (10, 100, 500 и 1000 мкл).

Уровень кортикостерона (КС) в сыворотке крыс и надпочечниках (НП) измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе «Милихром» (Россия): колонка 2×64 мм КАХ-1-64-3, заполненная нормально-фазным сорбентом «Silasorb-600 LC» (диаметр частиц 5 мкм, Lachema, Чехия). В качестве подвижной фазы использовали гексан:хлороформ:метанол (7:1:1). Детекция производилась на УФ-детекторе при длине волны 246 нм [6]. Для определения концентрации общего йодида, а также его белковосвязанной (БСЙ) и свободной фракций в ткани щитовидной железы был использован церий-арсенитный метод [7]. При исследовании активности тиреопероксидазы (ТПО) оценивали реакцию ферментативного окисления йодида [8]. Концентрацию альдегидных продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-реагирующих субстанций – ТБКРС) в ткани щитовидной железы измеряли по образованию при 100°C ярко окрашенного малинового комплекса с тиобарбитуровой кислотой, поглощающего свет при длине волны 532 нм [9]. Для определения активности каталазы в щитовидной железе крыс применяли метод, основанный на спектрофотометрической регистрации количества окрашенного продукта реакции – H₂O₂ с молибденовокислым аммонием [10]. Содержание белка в гомогенатах щитовидной железы определяли по методу Лоури [11].

Полученные данные статистически обработаны с использованием t-теста Стьюдента и U-теста Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. Как видно из данных, представленных в табл. 1, выраженных антистрессорных свойств ЭКДШ при введении его за 1 час до воспроизведения острого стресса не наблюдалось. Концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс при 40-минутном стрессорном воздействии повысилась на 75,2% по сравнению с контролем.

Таблица 1

Влияние острого стресса на концентрацию кортикостерона в сыворотке крови и массу надпочечников крыс

Описание эксперимента	Контроль	1000 мкл ЭКДШ	500 мкл 0,15М КСl + стресс	100 мкл ЭКДШ + стресс	500 мкл ЭКДШ + стресс	1000 мкл ЭКДШ + стресс
Группа и количество	1–6	2–6	3–6	4–6	5–5	6–6

животных						
Масса НП, мг	50,1±4,05	50,9±2,26	48,4±1,08	45,8±0,98	49,8±2,43	51,9±2,12
Концентрация кортикостерона в НП, пмоль/г	37,5±3,82	54,4±3,63 ¹	56,2±6,30 ¹	62,8±6,38 ¹	54,8±3,89 ¹	48,5±3,45
Концентрация кортикостерона в сыворотке крови, нмоль/л	493±37,7	840±74,2 ¹	864±56,0 ¹	867±81,8 ¹	793±44,8 ¹	879±64,2 ¹

Примечание: ¹ – статистически достоверное различие ($P < 0,05$) между показателями группы «интактный контроль» и экспериментальными группами.

Стрессорное повышение концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс, получивших внутрибрюшинно 100, 500 и 1000 мкл ЭКДШ, составило соответственно 75,8, 60,7 и 78,3% по сравнению с контролем, что практически не отличается от стрессорного эффекта у крыс, не получавших ЭКДШ. Однако, следует обратить внимание на два факта: во-первых, содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс, получивших 500 мкл ЭКДШ и 500 мкл 0,15 М KCl за час до стрессорного воздействия, различалось на 14,4% (хотя эти различия не достоверны); во-вторых, представляет интерес стимулирующее действие ЭКДШ – через 1 час и 40 минут после введения 1000 мкл ЭКДШ концентрация кортикостерона в сыворотке крови увеличилась на 70,3% по сравнению с контролем и не отличалась от стрессированных крыс, получивших 1000 мкл ЭКДШ. Интересно также наличие обратной корреляционной зависимости между массой надпочечников и количеством кортикостерона в них при увеличении количества вводимого ЭКДШ (100, 500 и 1000 мкл) и воспроизведении острого стресса.

Таблица 2

Действие экстракта куколок дубового шелкопряда на функциональное состояние коркового вещества надпочечников и щитовидной железы

Описание эксперимента	Контроль	Контроль + стресс	500 мкл ЭКДШ	500 мкл ЭКДШ + стресс	1000 мкл ЭКДШ	1000 мкл ЭКДШ + стресс
Группа и количество животных	1–6	2–6	3–5	4–6	5–6	6–6
Исследование функции коркового вещества надпочечников						
Масса НП, мг	53,1±2,65	47,0±2,32 ³	50,4±3,27	41,0±3,43 ^{1,3}	57,2±3,92	50,3±2,98
КС, кровь, нмоль/л	825±120	1040±55	313±103 ¹	1004±52 ²	810±113	1320±73 ^{1,2}
Исследование функции щитовидной железы						
Общий йодид, мкг/г	584±40	692±79	640±27	486±25 ^{1,2}	735±33 ¹	709±169

Свободный йодид, мкг/г	222±22	340±58 ³	311±31 ¹	203±23 ²	381±86 ³	311±31 ¹
БСЙ, мкг/г	346±42	352±34	330±21	284±23	382±14	353±30
ТПО, мкмоль/мин/г ткани	10,8±2,12	6,66±0,65 ³	4,59±0,59 ¹	12,7±0,55 ²	6,79±0,90 ³	9,07±1,50
ТПО, мкмоль/мин/г белка	52,0±8,82	33,9±3,04 ³	22,6±2,81 ¹	66,2±5,57 ²	32,6±4,33 ³	42,8±6,60
ТБКРС, нмоль/г	129±5,9	115±9,6	128±10	102±4,6 ^{1,2}	118±9,0	123±12
Каталаза, мкмоль/мин/г ткани	2,54±0,18	2,06±0,14	2,18±0,15	2,27±0,15	1,97±0,10 ¹	1,78±0,12 ¹
Каталаза, мкмоль/мин/г белка	16,9±1,17	15,4±2,56	14,7±0,24	17,1±1,62	11,2±1,14 ¹	12,2±1,33 ¹

Примечание: ¹ – P<0,05 по сравнению с группой 1; ² – P<0,05 по сравнению с группой 3 или 5; ³ – P=0,1–0,05.

Во второй серии экспериментов показано, что через 24 часа после введения ЭКДШ в дозах 10 мкл, 100 мкл, 500 мкл и 1000 мкл концентрация кортикостерона в сыворотке крови соответственно составила 90,5%, 91,6%, 38,0% и 98,2% от уровня, характерного для контрольных животных. У контрольных животных при стрессе концентрация кортикостерона повысилась на 26%. В условиях предварительного введения ЭКДШ в дозах 10 мкл, 100 мкл, 500 мкл и 1000 мкл концентрация кортикостерона в сыворотке крови при стрессе соответственно повысилась на 95%, 48%, 221% и 63%. Масса надпочечников при стрессе имела тенденцию к уменьшению у крыс контрольной группы, а также у крыс после введения 500 мкл ЭКДШ (табл. 2). Следовательно, можно предположить, что введение ЭКДШ за 24 часа до действия стрессора существенно стимулирует выработку кортикостерона в корковом веществе надпочечников.

Переходя к обсуждению результатов по влиянию ЭКДШ на функциональное состояние щитовидной железы, следует отметить, что концентрация йодида в нативной гемолимфе куколок составила 52,5±0,57 мкг/л, а в экстракте куколок – 87,5±0,60 мкг/л. На рис. 1 представлено распределение йодида в гидрофильных компонентах гемолимфы.

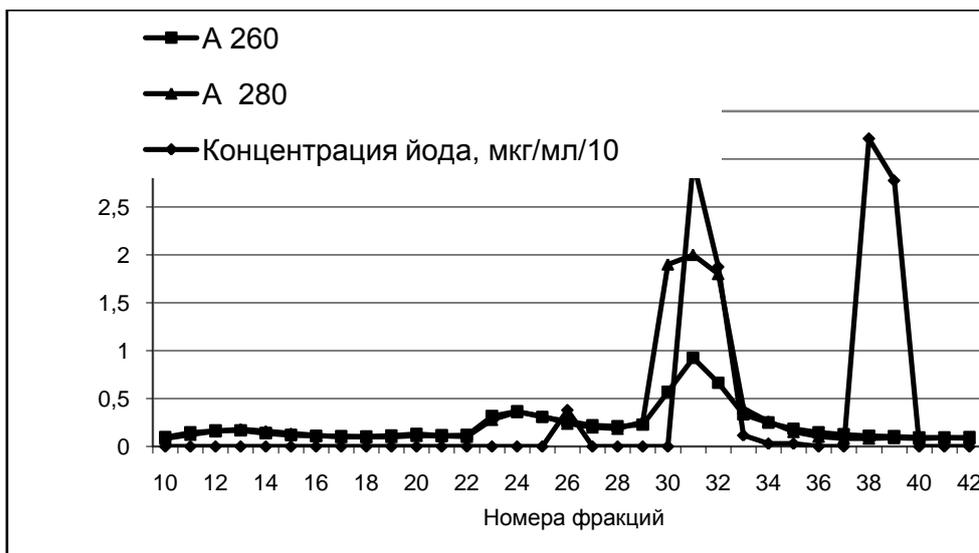


Рис. 1. Гель-фильтрация гемолимфы на TSK-GEL TOYOPEARL HW-55F.

Из анализа рис. 1 следует, что йодид сконцентрирован в трех пиках, вероятно, в области преальбуминов, белков и пептидов.

Установлено, что при действии стрессора у контрольных животных найдена тенденция к повышению концентрации свободного йодида и снижению активности тиреопероксидазы. После введения ЭКДШ в дозе 1000 мкл в щитовидной железе крыс повысилось содержание общего йодида, а после введения ЭКДШ в дозах 500 мкл и 1000 мкл в щитовидной железе животных увеличилось также содержание свободного йодида. Гидрофильные компоненты куколок дубового шелкопряда не оказали влияния на содержание связанного с белками йода в щитовидной железе (табл. 2).

Введение ЭКДШ в дозах 500 мкл и 1000 мкл привело к снижению активности тиреопероксидазы. Возможно, этот эффект связан с повышением концентрации свободного йодида. Кроме того, ЭКДШ в дозе 1000 мкл вызвал также уменьшение активности каталазы в щитовидной железе.

Наиболее благоприятные сдвиги в изучаемых биохимических параметрах при действии стрессора были получены у животных, которым предварительно вводили 500 мкл ЭКДШ. Было найдено достоверное уменьшение концентрации свободного йода до уровня интактного контроля, что демонстрирует оптимизацию условий его перехода в белковосвязанную форму. Этот процесс сопряжен с нормализацией активности тиреопероксидазы на фоне уменьшения концентрации ТБКРС (т.е. уменьшения перекисного окисления липидов в ткани щитовидной железы). Более высокая доза ЭКДШ (1000 мкл) не обеспечила снижения концентрации свободного йода (таблица 2).

Заключение. Известно, что специфический метаболизм тироцитов характеризуется постоянной наработкой высоких концентраций пероксида водорода, необходимого для окисления и органификации йодида. Вероятно, этап синтеза пероксида водорода является лимитирующим в системе реакций биосинтеза тиреоидных гормонов. В связи с этим активность антиоксидантных систем может иметь решающее значение в функционировании тироцитов. Необходимо отметить, что активность каталазы в

щитовидной железе ниже, чем в печени и почках, в 5,54 и 6,59 раза соответственно. Это кажется интересным в связи с тем, что тироциты постоянно продуцируют пероксид водорода в ответ на физиологическое стимулирующее действие тиреотропина. Известны обратные корреляционные зависимости между концентрациями общего, белковосвязанного, свободного йодида, активностью тиреопероксидазы и концентрацией продуктов перекисного окисления липидов, активностью ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы). Поэтому снижение активности каталазы после введения высокой дозы ЭКДШ может иметь приспособительное значение при стрессе [12].

Таким образом, гидрофильные компоненты куколок дубового шелкопряда способны поддерживать функциональное состояние коркового вещества надпочечников и щитовидной железы, обеспечивающее оптимизацию гормональных и биохимических изменений при остром стрессе.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Чиркин, А.А.** Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, В.М. Шейбак // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6. – С. 247–265.
2. **Концевая, И.И.** Действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда на культивируемые ткани березы и осины / И.И. Концевая, Т.А. Толкачева, А.А. Чиркин // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2010. – № 1(55). – С. 141–145.
3. **Балаева-Тихомирова, О.М.** Показатели липидного обмена при моделировании инсулинорезистентности / Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: матер. VIII Междунар. конф., 2–3 апреля 2010. – Минск: Издательский центр БГУ, 2010. – С. 88–91.
4. **Трокоз, В.А.** Биологически активные продукты из дубового шелкопряда: аспекты использования с лечебно-профилактической целью / В.А. Трокоз, Т.Б. Аретинская, Н.В.Трокоз // 2 Всероссийская конференция по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных: сб. тез. – М., 2006. – С. 21–28.
5. **Трокоз, В.А.** Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз [и др.] // Авторское свидетельство СССР, № 1787439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).
6. **Yamada, Y.** Simple and convenient method for quantitation of corticosterone by high-performance liquid chromatography – ultraviolet detection / Y. Yamada, A. Aizawa // J. Pharmac. Methods. – 1984. – Vol. 11, № 4. – P. 291–297.
7. **Dunn, J.T.** Two simple methods for measuring iodine in urine/ J.T. Dunn [et al.] // Thyroid. – 1993. – Vol. 3, № 2. – P. 119–123.
8. **Alexander, N.M.** Spectrophotometric assay for iodide oxidation by thyroid peroxidase / N.M. Alexander // Analytical Biochem. – 1962. – Vol. 4. – P. 341–345.
9. **Стальная, И.Д.** Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Методы современной биохимии; под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
10. **Королюк, М.А.** Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. **Lowry, O.H.** Protein measurement with folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–270.
12. **Валентюкевич, О.И.** Роль тиреоидных гормонов в регуляции свободнорадикальных процессов в клетках и тканях: монография / О.И. Валентюкевич, Л.И. Надольник. – Гродно: ГГАУ, 2009. – 260 с.

S U M M A R Y

Oak silkworm pupae hydrophilic components cause an increased concentration of serum corticosterone as in acute stress. It was found the inverse correlation between adrenal weight and the amount of corticosterone in them with increasing amount of input oak silkworm pupae hydrophilic components. Oak silkworm pupae hydrophilic components are able to maintain the functional state of adrenal and thyroid glands, providing optimization of hormonal and biochemical changes during acute stress.

Поступила в редакцию 7.04.2010