УДК 591.147.6:537.311.6:577.121

ВОЗРАСТНАЯ ИНВЕРСИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИМПЕДАНСА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЯХ МЕТАБОЛИЗМА

Торнуев Ю.В., Колдышева Е.В., Балахнин С.М., Глухов Б.М., Жук А.Г., Исаенко В.И., Сенчукова С.Р.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт региональной патологии и патоморфологии» Сибирского отделения РАМН, Новосибирск, e-mail: pathol@soramn.ru

Проведено электрофизиологическое и морфометрическое исследование надпочечников крыс линий Вистар и OXYS в возрасте 5, 14, 26 мес. Целью исследования было выявление сопряженности электрофизиологических параметров и морфологических изменений, связанных с возрастной реорганизацией железы. Показано, что наибольшие изменения коэффициента поляризации, а также сопротивления на высокой и низкой частотах выявлялись в позднем онтогенезе (26 мес.), что соответствовало изменениям соотношений линейных размеров зон и ширины коры в целом. Полученные данные свидетельствуют о схожести структурной реорганизации надпочечников при естественном и преждевременном старении (линия OXYS) с изменениями у животных, подвергнутых длительному стрессогенному воздействию. Изменение электрофизиологических показателей, в частности значительный рост сопротивления ткани надпочечника токам высокой и низкой частот, сопряжен с изменениями линейных размеров зон коры надпочечника и связывается нами со снижением количества проводящей жидкости в ткани и изменением градиента потенциала на клеточных мембранах.

Ключевые слова: инверсия электрического импеданса, надпочечник, возрастная реорганизация, крысы Вистар и OXYS, морфометрия

INVERSION OF INDICATORS OF THE ELECTRIC IMPEDANCE ADRENAL GLANDS OF RATS WITH GENETICALLY DETERMINED METABOLISM DISORDERS

Tornuyev Y.V., Koldysheva E.V., Balakhnin S.M., Glukhov B.M., Zhuk A.G., Isaenko V.I., Senchukova S.R.

Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS, Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru

The results of electrophysiological and morphometric study of adrenal glands of Wistar and OXYS rats at age of 5, 14, and 26 months are presented. The aim of this study was to identify the complementarity of the electrophysiological parameters and morphological changes, connected with the age reorganization of adrenal gland. It is shown, that the most considerable changes of the polarization coefficient, as well as resistance to high and low frequencies was revealed in late ontogenesis (26 months) and corresponded with changes in the ratios of the linear sizes of the cortex zones. The data obtained indicate the similarity of the structural reorganization of the adrenal glands when the natural and premature ageing occurred and such changes are observed in animals subjected to long-term stress impact. Changes of electrophysiological indicators, in particular the significant growth of adrenal cortex resistance at high and low frequencies, were correlated with the changes of linear sizes of the adrenal cortex zones. We connect these changes with the reduction of the conductive fluid in the tissues, and a change in the gradient of potential on cell membranes.

Keywords: inversion of electric impedance, adrenal glands, age reorganization, Wistar and OXYS rats, morphometry

Патофизиологическая картина процесса старения разнообразна и подразумевает развитие различного рода дисфункций, затрагивающих все системы организма. Удовлетворительное решение проблемы «благополучного старения» требует осуществления системного подхода к изучению согласованности физиологических процессов в организме [5] и привлечения дополнительных количественных методов исследования. В этом аспекте представляет интерес анализ сопряженности электрофизиологических параметров и морфофункциональных изменений в надпочечниках, обеспечивающих необходимое взаимодействие систем организма в процессе старения, при эндо- и экзогенных воздействиях [3].

Результаты проведенных ранее исследований свидетельствуют о возможности по показателям электропроводности тела человека оценивать его композиционные характеристики, такие как процентное содержание воды в тканях, жировой и клеточной масс и т.д. [4, 11, 12]. Однако оригинальные работы, использующие методы электроимпедансометрии для диагностики морфофункциональных изменений на органном и тканевом уровне, крайне немногочисленны, а данные об электрофизиологических свойствах надпочечника отсутствуют полностью. Согласно нашим результатам [8], изменения электропроводности надпочечника зачастую опережают таковые для других органов. Необходимо проведение

дальнейшего анализа формирования электрического импеданса железы, его частотной дисперсии и сопоставления с количественной характеристикой их возрастной реорганизации.

Цель исследования – сравнительный анализ электропроводящих свойств и количественных данных реорганизации коры надпочечников крыс в онтогенезе.

Материал и методы исследования

В экспериментах использованы крысы-самцы линии OXYS ($n = 19$) в возрасте 5, 14 и 26 мес., характеризующиеся значительным снижением продолжительности жизни и ранним развитием болезней «пожилого возраста», связанных с окислительным стрессом. Линия OXYS (первоначально W/SSM) была получена в Институте цитологии и генетики СО РАН путем отбора и инбридинга крыс линии Вистар, чувствительных к галактоземическому действию галактозы [1–3]. Контролем служили одновозрастные крысы-самцы линии Вистар ($n = 12$). Все животные содержались на стандартном рационе при свободном доступе к воде. Эксперименты были проведены в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986) и одобрены биоэтическим комитетом ФГБУ «Научно-исследовательский институт региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН. Животных выводили из эксперимента путем декапитации в утренние часы.

Оценку электрических параметров проводили с помощью стандартного электроимпедансометра «Тонус-2» [6, 7]. Активный измерительный электрод был выполнен в виде иглы, диаметром 60 мкм, индифферентный – диск, площадью 100 мм^2. Такое соотношение параметров электродов позволило оценить электрическое сопротивление участка ткани, непосредственно прилежащего к активному электроду (т.е. коры надпочечника), и исключить влияние пассивного температурного дрейфа показателей [6, 8]. Электрическое сопротивление (Ом) фиксированного надпочечника измеряли на низкой (Rнч, 10 кГц) и высокой (Rвч, 1 мГц) частотах. По результатам измерений рассчитывали коэффициент поляризации Кп = Rнч/Rвч.

Для светооптического исследования надпочечники фиксировали в 4%-м растворе парформальдегида с постфиксацией в 1%-м растворе осмия, образцы заливали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие срезы окрашивали 1% раствором азура II. Морфометрическое исследование проводили методом компьютерной морфометрии в универсальном микроскопе «Leica DM 4000B» (Германия). Измеряли ширину каждой зоны и камбиального слоя коры надпочечника (не менее 15 измерений), затем производился расчет суммарной величины ширины коры и вычисление соотношений ширины зон коры надпочечника в ряду клубочковая : пучковая : сетчатая, где за единицу принималась суммарная ширина клубочковой зоны и камбиального слоя.

Статистическая обработка результатов включала нахождение средних значений, дисперсии и ошибки средних. Значимость различий между показателями по группам оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Показатели электропроводности и поляризуемости (Кп) ткани надпочечников крыс обеих групп в 5-месячном возрасте достоверно не различались. К 14 мес. электрическое сопротивление надпочечников в обеих группах на высоких и низких частотах соизмеримо возрастало (на 40%), причем изменения показателей у крыс OXYS превышали контрольные на 5–10%. Тем не менее по сравнению с 5-месячными животными изменение соотношения показателей электропроводности было недостоверным. Наиболее существенные различия между линиями зафиксированы у животных к 26 мес., когда наблюдали инверсию соотношения импедансов – изменения у крыс Вистар превышали таковые у крыс OXYS, соотношение импедансов составляло 50–60%, ($p < 0{,}05$). Увеличение с возрастом у крыс OXYS и Вистар Кп соответственно на 28 и 37% ($p < 0{,}05$) и низкочастотного сопротивления (в 2–4 раза по сравнения с 5 мес.), как правило, связывается с потерей тканями проводящей жидкости и увеличением количества свободных радикалов [6]. Тем не менее Кп надпочечника крыс OXYS в позднем онтогенезе был меньше контрольных значений (на 10%), начиная с 14 мес. Это свидетельствует о сравнительно более низкой поляризационной емкости и снижении резистентности крыс OXYS к эндо- и экзогенным воздействиям [2, 7], а также наличии у этих животных склонности к развитию различного рода дисфункций, что позволяет утверждать информативность Кп не только на организменном, но и на органном уровне.

Электрический импеданс тканей, в том числе надпочечника, на низких частотах определяется особенностями структуры органа, уровнем кровоснабжения и содержанием проводящей жидкости в межклеточных пространствах, «плотностью упаковки» структурных элементов в единице объема, тогда как электропроводность на высокой частоте и соответственно ее дисперсия в исследуемом диапазоне частот – поляризацией фосфолипидов мембран клеток в поле внешнего электрического тока и дипольной поляризацией структурных образований в цитоплазме [6, 10–12].

По данным морфометрического исследования, старение животных сопровождалось уменьшением ширины коры надпочечника у крыс обеих линий: у Вистар – на 14 и 6%, у крыс OXYS – на 15 и 23% ($p < 0{,}05$), соответственно в возрасте 14 и 26 мес. по сравнению с 5-месячными особями (таблица).

Электрофизиологические и морфометрические показатели коры надпочечников крыс линий Вистар и OXYS в процессе онтогенеза (M ± m)

Показатель	Возраст животных					
	5 мес		14 мес		26 мес	
	Вистар	OXYS	Вистар	OXYS	Вистар	OXYS
Ширина коры, мкм	751,43 ± 23,77	841,40 ± 59,25	645,51 ± 0,95*	715,02 ± 64,23	705,87 ± 18,07	645,30 ± 55,79±
Ширина клубочковой зоны, мкм	64,28 ± 8,21	57,54 ± 5,07	84,32 ± 21,04	64,05 ± 8,37	57,15 ± 4,65	57,45 ± 7,70
Ширина камбиального слоя, мкм	18,61 ± 1,50	11,98 ± 1,08#	18,63 ± 5,26	13,47 ± 1,52	6,97 ± 1,79**	13,48 ± 1,72#
Ширина пучковой зоны, мкм	432,59 ± 12,07	555,27 ± 51,85	341,24 ± 2,06**	407,62 ± 38,50	442,57 ± 13,54	386,29 ± 37,50±
Ширина сетчатой зоны, мкм	235,96 ± 16,85	216,62 ± 19,72	201,30 ± 23,29	229,89 ± 19,42	199,17 ± 18,07	188,08 ± 23,98
Сопротивление на высокой частоте, Ом	814,4 ± 75	916,4 ± 85	1090,6 ± 92	1438,2 ± 157±±	2236,3 ± 55**	1351,4 ± 214±#
Сопротивление на низкой частоте, Ом	1236,3 ± 214	1400,6 ± 95	1829,3 ± 142	2160,5 ± 185±±#	4813,0 ± 15**	2650,5 ± 310±±##
Коэффициент поляризации	1,56 ± 0,08	1,55 ± 0,08	1,65 ± 0,07	1,50 ± 0,08	2,15 ± 0,02*	1,96 ± 0,05±#

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, по сравнению с 5 мес Вистар; ± – $p < 0,05$, ±± – $p < 0,01$, по сравнению с 5 мес OXYS; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с Вистар аналогичного возраста.

У крыс Вистар и OXYS в одни и те же периоды онтогенеза значительно различалась ширина отдельных зон коры надпочечника и их размерное соотношение. У 5-месячных крыс OXYS была уменьшена ширина клубочковой зоны (на 11 %), камбиального слоя (на 36 %, $p < 0,05$) и сетчатой зоны (на 8 %), но увеличена ширина пучковой зоны (на 28 %) при сравнении с одновозрастными крысами Вистар. В возрасте 14 мес. у крыс Вистар и OXYS отмечено увеличение ширины клубочковой зоны (на 31 и 11 %) и уменьшение ширины пучковой зоны (на 21 и 27 %) по сравнению с 5-месячными особями. При этом у крыс Вистар происходило снижение ширины сетчатой зоны (на 15 %), а у крыс OXYS – небольшое увеличение этого показателя (на 6 %) по сравнению с 5-месячными особями. В возрасте 26 мес у крыс Вистар происходило уменьшение ширины клубочковой зоны (на 11 %), камбиального слоя (на 63 %, $p < 0,01$) и сетчатой зоны (на 15 %), ширина пучковой зоны восстанавливалась до значений 5-месячных животных. У крыс OXYS в возрасте 26 мес. ширина клубочковой зоны была такой же, как и в 5 мес., вероятно, в результате сохранения пролиферативной активности клеток камбиального слоя, ширина которого была увеличена (на 13 %) по сравнению с 5-месячными особями. Происходило дальнейшее снижение ширины пучковой и сетчатой зон (соответственно на 31 и 13 % при сравнении с 5-месячным возрастом).

Изменения ширины зон обусловили следующие соотношения их ширины в ряду «клубочковая : пучковая : сетчатая» у крыс обеих линий: у крыс Вистар и OXYS в возрасте 5 мес. – соответственно 1:5:3 и 1:8:3, в возрасте 14 мес. – соответственно 1:3:2 и 1:5:3, в возрасте 26 мес. – 1:7:3 и 1:5:3. Следует отметить, что у крыс OXYS в возрасте 5 мес. и у крыс Вистар в возрасте 26 мес. это соотношение было подобно наблюдаемому у крыс Вистар, подвергнутых многократному воздействию стрессогенного фактора [3]. Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе естественного старения (крысы Вистар) происходит похожая структурно-функциональная реорганизация коры надпочечника, как и при продолжительном действии стрессогенных факторов. При преждевременном старении (крысы OXYS) подобная реорганизация коры надпочечников происходит уже в молодом возрасте (5 мес.).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изменения импеданса надпочечника зависят от колебаний размерных характеристик коры, в основном клубочковой и пучковой зон. Относительные изменения линейных размеров клубочковой зоны в позднем онтогенезе приводят не к росту, а к снижению сопротивления надпочечника. Инверсия (относительно 5-месячного возраста) и отсутствие различий в размерах клубочковой зоны у животных обеих линий, а также разнонаправленность изменений линейных размеров клубочковой и пучковой зон коры позволяют нам предположить наличие более тонких, внутриклеточных изменений особенно у крыс OXYS.

Сопротивление надпочечника токам высоких частот свидетельствует о наличии

структурных изменений в самой клетке: увеличении концентрации или появлении в цитоплазме или на мембранах адренокортикоцитов структурных образований с другим временем релаксации [6]. С возрастом в тканях увеличивается количество полярных и неполярных молекул различного размера, включая продукты свободнорадикального окисления, снижается антиоксидантная активность липидов, изменяется структура и функции клеточных и внутриклеточных мембран, степень гидрофильности и вязкости липидов [1, 2, 9]. Потеря жидкости тканями надпочечника в процессе старения организма приводит к увеличению вязкости цитоплазмы адренокортикоцитов, что и способствует росту ее электрического сопротивления, одновременно, препятствуя поляризации липидов мембран и других внутриклеточных образований, снижает его. Это малозаметно в ранние сроки развития животных, однако в позднем онтогенезе влияние таких процессов более значительно. В результате сопротивление коры у крыс экспериментальной группы может стать ниже контрольных значений и даже привести к инверсии показателей.

Список литературы

1. Бакарев М.А., Непомнящих Л.М. Структурные проявления нарушения митохондриальной функции в скелетных мышцах у преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюл. экспер. биол. – 2004. – № 12. – С. 674–679.

2. Возрастные изменения окисленности белков и липидов в печени преждевременно стареющих крыс OXYS / Н.Г. Колосова, А.Ю. Гришанова, Ж.С. Крысанова, Т.В. Зуева, О.И. Синицина // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 1. – С. 73–78.

3. Надпочечники: Ультраструктурная реорганизация при экстремальных воздействиях и старении / Е.Л. Лушникова, Л.М. Непомнящих, Е.В. Колдышева, О.П. Молодых. – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 336 с.

4. Биоимпедансный анализ состава тела человека / Д.В. Николаев, А.В. Смирнов, И.Г. Бобринская, С.Г. Руднев. – М.: Наука, 2009. – 392 с.

5. Судаков К.В. Адаптивный результат в формировании функциональных систем организма // Успехи современной биологии – 2004. – № 5. – С. 568–471.

6. Электрический импеданс биотканей / Ю.В. Торнуев, А.П. Хачатрян, Р.Г. Хачатрян, В.П. Махнев, А.С. Осенний. – М.: Изд-во ВЗПИ. – 1990. – 155 с.

7. Торнуев Ю.В., Непомнящих Л.М, Колдышева Е.В. Воздействие низкохолиновой диеты и этанола на электропроводящие свойства тканей мышей СВА // Бюл. экспер. биол. – 2005. – Т. 140, № 11. – С. 515–518.

8. Торнуев Ю.В., Колдышева Е.В. Возрастные изменения электропроводности надпочечников крыс OXYS // Бюл. СО РАМН. – 2008. – № 6. – С. 27–30

9. Bernardi P. Mitochondria in muscle cell death // Ital. J. Newrol. Sci. – 1999. – Vol. 20. – P. 395–400.

10. Castro R., Barlow-Walden L., Woodson T., Keresman J.D., Zhang G.H., Martine J.R. Ion transport in an Immortalized Rat Submandibular Cell line SMG – C6 // Pros. Soc. Exper. Biol. Med. – 2000. – Vol. 225. – P. 29–48.

11. Dittmar V., Reber H. New equations for estimating body cell mass from bioimpedance parallel models in healthy elder Germans // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol. – 2001. – Vol. 281, № 5. – P. 1005–1014.

12. Schoeller D. Bioelectrical impedance analysis. What does it measure? // Annals of the New York Academy Sciences. – 2000. – Vol. 904. – P. 159–162.

References

1. Bakarev M.A., Nepomnyaschykh L.M. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2004. no. 12. pp. 674–679.

2. Kolosova N.G., Grishanova A.Yu., Krysanova Zh.S., Zueva T.V., Sinitsina O.I. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2004. T. 50, no. 1. pp. 73–78.

3. Lushnikova E.L., Nepomnyaschykh L.M., Koldysheva E.V., Molodykh O.P. Nadpochechniki: Ultrasrukturnaya reorganizatsiya pri ekstremalnych vozdeistviyakh i starenii [Adrenal glands: Ultrastructural reorganization under extreme impacts and during aging]. Moscow: Publishing House RAMS, 2009. 336 p.

4. Nikolaev D.V., Smirnov A.V., Bobrinskaya I.G., Rudnev S.G. Bioimpedansnyi analiz sostava tela cheloveka [Bioimpedance analysis of human body]. M.: Nauka. 2009. 392 p.

5. Sudakov K.V. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2004. no. 5. pp. 568–471.

6. Tornuev Yu.V., Khachatryan A.P., Khachatryan R.G., Makhnev V.P.,Osenniy A.S. Electricheskiy impedans biotkaney [Electrical impedance of biotissues]. M.: Izd-vo VZPI. 1990. 155 p.

7. Tornuev Yu.V., L.M., Koldysheva E.V. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsini.* 2005. V. 140, no. 11. pp. 515–518.

8. Tornuev Yu.V., Nepomnyaschykh L.M., Koldysheva E.V. *Bulleten SO RAMN.* 2008. no. 6. pp. 27–30

9. Bernardi P. *Ital. J. Newrol. Sci.* 1999. Vol. 20. pp. 395–400.

10. Castro R., Barlow-Walden L., Woodson T., Keresman J.D., Zhang G.H., Martine J.R. *Pros. Soc. Exper. Biol. Med.* 2000. Vol. 225. pp. 29–48.

11. Dittmar V., Reber H. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001. Vol. 281 (5).pp. 1005–1014.

12. Schoeller D. *Annals of the New York Academy Sciences.* 2000. Vol. 904. pp. 159–162.

Рецензенты:

Меньщикова Е.Б., д.м.н., руководитель группы свободнорадикальных процессов ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск;

Гуляева Л.Ф., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 11.04.2012.