

УДК.616.441-008.64:612.66

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В МОЗГУ КРЫС С ГИПОТИРЕОЗОМ

ХАДДАД АЙХАМ АЛИ¹, В. В. ДАВЫДОВ²

¹Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина;

²Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины, Харьков;
e-mail: davydov@kharkov.com

Целью работы явилось изучение возрастных особенностей изменения состояния свободнорадикального окисления белков и липидов в субклеточных фракциях полушарий головного мозга крыс с экспериментальным гипотиреозом. Установлено, что у взрослых крыс и животных пубертатного возраста при экспериментальном гипотиреозе и после интенсивной физической нагрузки (ИФН) в мозгу возникает состояние оксидативного стресса. Его проявлением служит накопление в митохондриальной и микросомной фракциях мозга продуктов свободнорадикального окисления. При гипотиреозе ограничивается эффективность реализации прооксидантного действия физической нагрузки на митохондрии мозга. Обсуждается значение этого сдвига в возникновении нарушений в ЦНС при гипотиреозе.

Ключевые слова: мозг, гипотиреоз, интенсивная физическая нагрузка, оксидативный стресс, пероксидное окисление липидов, свободнорадикальное окисление белков.

Среди многочисленных проявлений гипотиреоза широкое распространение имеет поражение ЦНС [1,2]. Механизм его возникновения до настоящего времени не изучен. Анализируя данные литературы по этому вопросу, можно предположить взаимосвязь нарушений в ЦНС с формированием в организме больных с гипотиреозом оксидативного стресса [3,4], к повреждающему действию которого мозг проявляет высокую чувствительность. Вместе с тем, систематизированные данные о состоянии свободнорадикальных процессов в головном мозгу при заболеваниях, сопровождающихся недостаточностью функции щитовидной железы, в литературе отсутствуют. Принимая во внимание современные представления о физиологической роли оксидативного стресса [5,6], следует обратить внимание на то, что существенно больший интерес, чем просто определение базального уровня свободнорадикального окисления, представляет изучение особенностей реализации в мозгу при гипотиреозе эффекта прооксидантных факторов. Подобные факторы появляются в организме под воздействием различных стрессоров, в том числе при интенсивной физической нагрузке [7,8].

Ввиду известных особенностей проявления гипотиреоза у детей и подростков и значении их в возникновении тяжелых осложнений

при этом заболевании в более зрелом возрасте [9] большой интерес представляет изучение возрастных аспектов данной проблемы.

Учитывая все вышеизложенное, в настоящей работе было предпринято изучение возрастных особенностей изменения свободнорадикального окисления белков и липидов в субклеточных фракциях полушарий головного мозга крыс при экспериментальном гипотиреозе в норме и в условиях прооксидантного воздействия на организм интенсивной физической нагрузки (ИФН).

Материалы и методы

Работа выполнена на 56 крысах-самцах линии Вистар. Использовали животных пубертатного возраста (1,5-месячных), а также взрослых половозрелых крыс (12-месячных). Животных обеих возрастных групп делили на 5 подгрупп: 1 – интактные животные, 2 – крысы, которых подвергали плаванию “до отказа” в пластиковой емкости, 3 – животные, у которых воспроизводили экспериментальный гипотиреоз путем ежедневного в течение 15 дней внутрибрюшного введения мерказолила из расчета 1 мг на 100 г массы тела [10], 4 – крысы, которым ежедневно в течение 15 дней путем внутрибрюшного введения получали эквивалентный объем изотонического раствора хлористого натрия (контроль) и 5 – животные

с гипотиреозом, которых подвергали плаванию “до отказа”.

Эффективность воспроизведения гипотиреоза на использованной модели подтверждали путем измерения концентрации ТТГ, тироксина и трийодтиронина в крови (рис. 1) с использованием наборов для ИФА исследований фирмы «DAI» (США) [11].

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Экстирпировали головной мозг, который немедленно помещали в 0,9%-й раствор хлористого натрия, охлажденный до 4 °С. Выделяли большие полушария головного мозга, отмывали от крови и использовали для приготовления 10%-х гомогенатов на 0,32 М сахарозе (рН 7,4). Гомогенаты центрифугировали в течение 10 минут при 1000 g. Надосадочную жидкость вновь подвергали центрифугированию при 10 000 g в течение 20 минут. Супернатант использовали для получения микросом [12], а осадок суспендировали с 5 мл 0,32 М сахарозы (рН 7,4) и повторно центрифугировали 20 минут при 10 000 g. Отмытый осадок суспендировали с 2 мл изотонического раствора хлористого натрия и использовали в работе в качестве грубой митохондриальной фракции.

В пробах митохондриальной и микросомной фракции определяли содержание карбонилированных белков [13], флюоресцирующих соединений типа оснований Шиффа [14] и диеновых конъюгатов [15]. В митохондриальной и микросомной фракциях измеряли скорость индуцированного свободнорадикально-

го окисления белков и липидов [16]. Расчет интенсивности индуцированного свободнорадикального окисления липидов проводили по скорости накопления в реакционной смеси веществ, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой [17].

В митохондриальной фракции измеряли активность ферментов первой линии антиоксидантной защиты – каталазы [18] и супероксиддисмутазы [19] и рассчитывали индекс соотношения их активности. Содержание белка в пробах определяли по методу О. Lowry.

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью непараметрического метода Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что у взрослых крыс при ИФН и гипотиреозе возникает оксидативный стресс (табл. 1, 2), что не характерно для контрольной группы животных, которым вместо мерказолила вводили изотонический раствор. Он проявляется накоплением в мозгу животных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов и шиффовых оснований), а также карбонилированных белков, фенолгидразоны которых имеют максимум светопоглощения, соответствующий 370 нм. Обращает на себя внимание тот факт, что уровень накопления продуктов свободнорадикального окисления липидов в митохондриальной фракции мозга при гипотиреозе меньше, чем после ИФН.

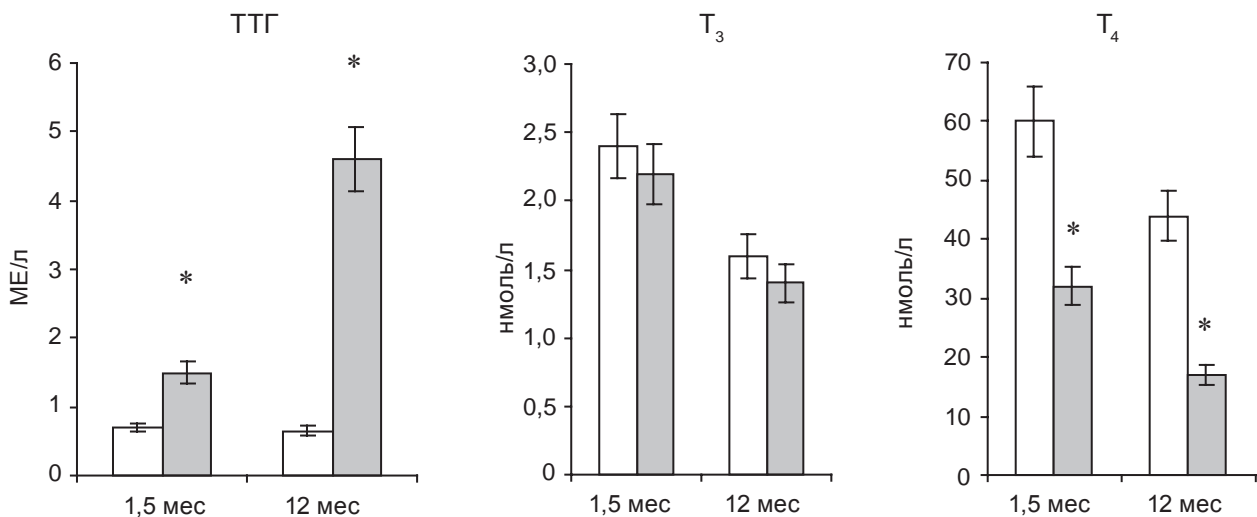


Рис. 1. Изменение содержания ТТГ и тиреоидных гормонов в крови 1,5-месячных и 12-месячных крыс с экспериментальным гипотиреозом. По результатам экспериментов на 5–6 крысах. * $P < 0,05$ по отношению к интактным животным. Светлые столбики – показатели у интактных крыс, темные столбики – показатели у крыс с гипотиреозом

Таблиця 1. Изменение содержания продуктов свободнорадикального окисления в субклеточных фракциях мозга 12-месячных крыс с гипотиреозом в норме и под влиянием физической нагрузки ($M \pm m$; $n = 5-6$)

Показатели	Интактные крысы	Контроль	ИФН	Гипотиреоз	Гипотиреоз + ИФН
<i>Митохондриальная фракция</i>					
ДК, нмоль/мг белка	0,12 ± 0,01**	0,14 ± 0,02	0,27 ± 0,01*	0,28 ± 0,04*	0,11 ± 0,01***
ШО, мкмоль/мг белка	0,42 ± 0,04**	0,50 ± 0,04	0,83 ± 0,04*	0,65 ± 0,06*	0,52 ± 0,04
КБ ₃₆₃ , нмоль/мг белка	5,8 ± 0,9	5,7 ± 0,2	7,6 ± 1,0	4,6 ± 0,4	4,2 ± 0,4
КБ ₃₇₀ , нмоль/мг белка	4,6 ± 0,5	4,5 ± 0,2	11,8 ± 1,1*	8,8 ± 0,8*	7,2 ± 1,3
<i>Микросомная фракция</i>					
ДК, нмоль/мг белка	1,12 ± 0,01**	1,1 ± 0,1	3,9 ± 0,3*	4,3 ± 0,9*	3,8 ± 0,3*
ШО мкмоль/мг белка	6,70 ± 0,04	7,0 ± 0,4	7,2 ± 0,3	7,3 ± 0,5	6,2 ± 0,4
КБ ₃₆₃ , нмоль/мг белка	17,6 ± 1,5**	17,4 ± 0,7	21,2 ± 0,9	24,1 ± 3,0	25,6 ± 6,3
КБ ₃₇₀ , нмоль/мг белка	16,1 ± 0,7**	16,2 ± 0,3	14,3 ± 1,2	18,4 ± 1,3	23,8 ± 3,6*

Тут и в табл. 2: ДК – диеновые конъюгаты, ШО – шиффовы основания, КБ₃₆₃ – карбонилированные белки с максимумом поглощения фенолгидразонов при 363 нм, КБ₃₇₀ – карбонилированные белки с максимумом поглощения фенолгидразонов при 370 нм. * $P < 0,05$ к интактным; ** $P < 0,05$ к интактным 1,5-месячным, *** $P < 0,05$ к животным с гипотиреозом. Контроль – животные, которые в течение 15 дней путем внутрибрюшного однократного введения получали изотонический раствор хлористого натрия

Таблиця 2. Изменение содержания продуктов свободнорадикального окисления в субклеточных фракциях мозга 1,5-месячных крыс с гипотиреозом в норме и под влиянием физической нагрузки ($M \pm m$; $n = 5-6$)

Показатели	Интактные крысы	Контроль	ИФН	Гипотиреоз	Гипотиреоз + ИФН
<i>Митохондриальная фракция</i>					
ДК, нмоль/мг белка	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,3	0,39 ± 0,09	0,22 ± 0,02	0,15 ± 0,03
ШО, мкмоль/мг белка	0,84 ± 0,06	0,78 ± 0,05	0,72 ± 0,07	0,57 ± 0,03*	0,50 ± 0,02***
КБ ₃₆₃ , нмоль/мг белка	4,6 ± 0,5	4,5 ± 0,5	10,2 ± 0,7*	8,1 ± 0,4*	7,5 ± 1,4
КБ ₃₇₀ , нмоль/мг белка	5,9 ± 0,8	5,6 ± 0,5	7,5 ± 1,0	4,8 ± 0,5	3,8 ± 0,3
<i>Микросомная фракция</i>					
ДК, нмоль/мг белка	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	3,5 ± 0,1*	3,7 ± 0,3*	4,7 ± 0,7*
ШО мкмоль/мг белка	7,4 ± 0,6	7,9 ± 0,2	7,3 ± 0,3	8,6 ± 0,6	10,9 ± 1,2*
КБ ₃₆₃ , нмоль/мг белка	24,2 ± 1,8	23,8 ± 1,2	33,3 ± 7,7	34,5 ± 5,2	39,9 ± 7,3*
КБ ₃₇₀ , нмоль/мг белка	23,4 ± 1,8	24,3 ± 0,6	26,0 ± 6,3	29,3 ± 3,4	27,2 ± 2,9

У крыс с гипотиреозом после выполнения физической нагрузки содержание всех исследованных продуктов свободнорадикального окисления не отличается от такового у крыс контрольной группы ($P > 0,05$). Вместе с тем концентрация продуктов свободнорадикального окисления в митохондриях мозга оказывается у них значительно ниже, чем у крыс без гипотиреоза, подвергнутых ИФН. При этом

содержание шиффовых оснований и карбонилированных белков у животных с гипотиреозом после ИФН достоверно не отличается, а концентрация диеновых конъюгатов снижается в 2,5 раза по сравнению с их величиной у крыс с гипотиреозом. Особенностью проявления оксидативного стресса после ИФН является еще и то, что у животных с гипотиреозом, подвергнутых ИФН, исчезает обусловленный

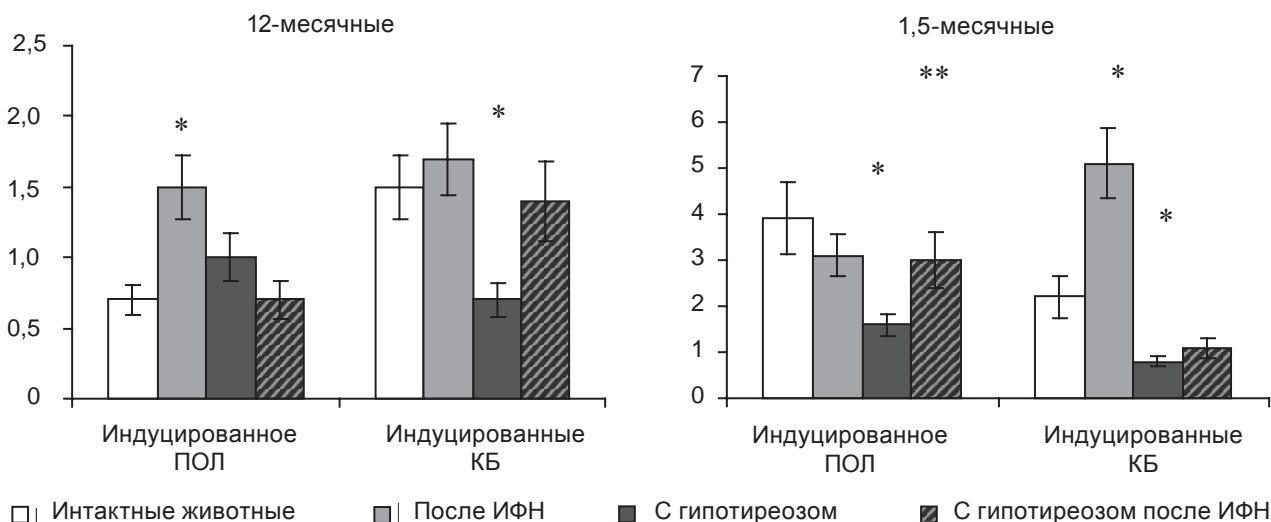


Рис. 2. Скорость индуцированного ПОЛ и индуцированного накопления карбонилированных белков в митохондриальной фракции мозга крыс с гипотиреозом и после ИФН (в нмоль/мин на 1 мг белка). По результатам экспериментов на 5–6 крысах. * $P < 0,05$ по отношению к интактным животным, ** $P < 0,05$ к крысам с гипотиреозом

физической нагрузкой эффект стимуляции индуцированного ПОЛ в митохондриальной фракции (рис. 2). Характерно, что подобный сдвиг не связан с нарушением функционирования митохондриальных ферментов первой линии антиоксидантной защиты (рис. 3).

Таким образом, при гипотиреозе в митохондриях мозга возникают условия для ограничения проявлений прооксидантного эффекта физической нагрузки. Одной из причин этого может быть повышение устойчивости

митохондрий к действию прооксидантов, отражением чего служит снижение в них скорости индуцированного ПОЛ. Возникновению такого сдвига, в свою очередь, предрасполагает увеличение содержания в митохондриях мозга при гипотиреозе продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов.

Сдвиги аналогичной направленности возникают и у крыс пубертатного возраста. Однако спектр их проявлений существенно меньше, чем у взрослых животных. У крыс этой

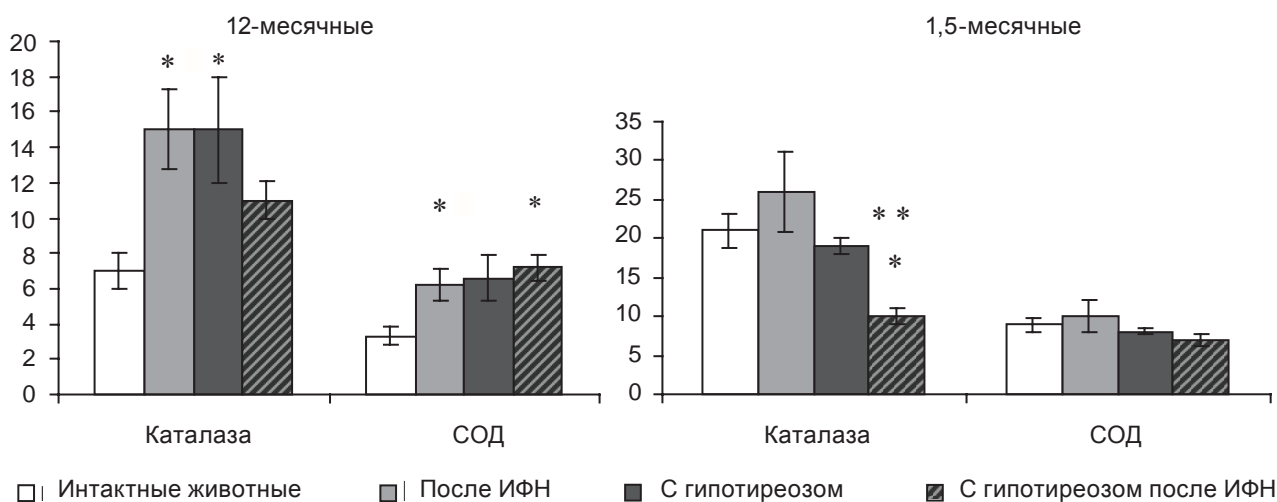


Рис. 3. Активность каталазы (мкмоль/мин на 1 мг белка) и СОД (ЕД/мг белка) в митохондриальной фракции мозга крыс с гипотиреозом и после ИФН. По результатам экспериментов на 5–6 крысах. * $P < 0,05$ к интактным, ** $P < 0,05$ к крысам с гипотиреозом; ИФН – интенсивная нагрузка

возрастной группы после ИФН и при экспериментальном гипотиреозе происходит увеличение концентрации карбонилированных белков с максимумом поглощения фенолгидразонов, соответствующим 363 нм. Величины других изучаемых показателей у них остаются на таком уровне как у животных контрольной группы, а также как у крыс с гипотиреозом, не подвергнутых физической нагрузке. Обнаруженный факт, с одной стороны, подтверждает точку зрения о том, что белки являются более чувствительной мишенью свободных радикалов, чем липиды [20]. С другой стороны, он отражает существование возрастных особенностей в проявлении данного феномена. Более того, полученные результаты могут указывать на то, что в процесс свободнорадикального окисления у взрослых крыс и животных пубертатного возраста вовлекаются различные белки. Окислительная модификация белков головного мозга предопределяет модуляцию функционирования нервных клеток, которая по этой причине приобретает характер, зависящий от возраста.

Оценивая причины снижения чувствительности мозга к прооксидантным воздействиям в периоде полового созревания, можно думать об особой роли возрастных различий в состоянии гормонального статуса, в том числе возрастных особенностей реакции тиреоидной системы на физическую нагрузку [11], а также функционирования антиоксидантной системы. Определенное значение при этом приобретают возрастные различия в базальном уровне содержания продуктов свободнорадикального окисления в митохондриях. Действительно, как видно из табл. 2, концентрация продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов и шиффовых оснований) в митохондриальной фракции мозга крыс пубертатного возраста существенно выше, чем у взрослых животных. Накопление продуктов окисления липидов и белков в митохондриальной фракции способствует снижению чувствительности митохондрий к инициации свободнорадикальных процессов. С подобным предположением согласуются результаты экспериментов, связанных с изучением скорости индуцированного накопления карбонилированных белков, но не данные о состоянии индуцированного ПОЛ (рис. 2).

Как и в митохондриальной, так и в микросомной фракции мозга при ИФН и экспериментальном гипотиреозе усиливаются процес-

сы свободнорадикального окисления (табл. 1 и 2). Однако возникающий в микросомной фракции сдвиг имеет более ограниченный и независимый от возраста характер. Его проявлением при экспериментальном гипотиреозе и при ИФН служит накопление первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов). В отличие от митохондриальной фракции, накопление диеновых конъюгатов в микросомной фракции происходит в равной мере при ИФН как у животных с гипотиреозом, так и без него. При этом содержание данных метаболитов у крыс с гипотиреозом, подвергнутых ИФН, не отличается от такового у крыс с гипотиреозом, не подвергнутых физической нагрузке.

Различия в интенсивности стимуляции свободнорадикальных процессов в митохондриях и микросомах мозга, могут быть обусловлены неодинаковой ролью этих субклеточных структур в процессе радикалообразования в нервных клетках. Основное значение в формировании оксидативного стресса в мозгу имеют митохондрии, чему способствует интенсивный аэробный обмен в нем.

Таким образом, в мозгу крыс с гипотиреозом возникает состояние оксидативного стресса, связанное, по всей вероятности, с усилением процессов радикалообразования в митохондриях нервных клеток. Одновременно с этим у них ограничивается эффективность реализации прооксидантного эффекта физической нагрузки на митохондрии мозга.

Ограничение реализации эффекта прооксидантных воздействий приобретает важное значение для мозга. Это обусловлено тем, что свободнорадикальные интермедиаты выступают в роли своеобразных посредников, обуславливающих взаимодействие между клеткой и внешней средой, обеспечивающих формирование в них адаптивных реакций [21,22]. Ограничение эффективности их образования в ответ на действие прооксидантов, предопределяет нарушение реакции мозга на внешние стимулы, проявлением которого может служить угнетение ВНД при гипотиреозе. Эти сдвиги возникают как у взрослых половозрелых животных, так и у крыс, находящихся в периоде полового созревания. Однако в пубертатном возрасте их выраженность меньше, что может вносить определенный вклад в появление различий в проявлении сдвигов со стороны ЦНС при гипотиреозе в разные возрастные периоды.

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗМІНИ ПРОЦЕСІВ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ В МОЗКУ ЩУРІВ З ГІПОТИРЕОЗОМ

Хаддад Айхам Али¹, В. В. Давидов²

¹Харківська медична академія
післядипломної освіти, Україна;

²Інститут охорони здоров'я дітей та
підлітків АМН України, Харків;
e-mail: davydov@kharkov.com

Метою роботи було вивчення вікових особливостей зміни стану вільнорадикального окислення білків та ліпідів у субклітинних фракціях півкуль головного мозку щурів з експериментальним гіпотиреозом. Встановлено, що у дорослих щурів та тварин пубертатного віку при експериментальному гіпотиреозі та після фізичного навантаження у мозку виникає стан оксидативного стресу. Його проявом слугує накопичення в мітохондріальній та мікросомній фракціях мозку продуктів вільнорадикального окислення. При гіпотиреозі обмежується ефективність реалізації прооксидантної дії фізичного навантаження на мітохондрії мозку. Обговорюється значення цього здвигу у виникненні центральних порушень при гіпотиреозі.

Ключові слова: мозок, гіпотиреоз, фізичне навантаження, окислювальний стрес, пероксидне окислення ліпідів, вільнорадикальне окислення білків.

AGE PECULIARITIES IN CHANGES OF FREE RADICAL OXIDATION PROCESSES IN THE BRAIN OF RATS WITH HYPOTHYROIDISM

Khaddad Aikham Ali¹, V. V. Davydov²

¹Kharkov Medical Academy of
Postgraduate Education, Ukraine;

²Institute of Children and Adolescent Health Care,
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov;
e-mail: davydov@kharkov.com

Summary

The objective of the present experiment was to study age peculiarities of free radical protein oxidation and lipid peroxidation in brain of 1.5-month-old and 12-month-old rats with drug-induced hypothyroidism. It has been shown that hypothyroidism in both 1.5-month and 12-month old rat is accompanied by the oxidative stress in the brain. It manifests by an increase of content

of lipid peroxidation products and protein carbonyls in mitochondrial and microsomal fractions. Hypothyroidism decreases the prooxidant effect of exercises on the brain mitochondria.

Key words: brain, hypothyroidism, exercises, oxidative stress, lipid peroxidation, free radical protein oxidation.

1. Larsen P. R. The Thyroid and Its Diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone. — 1996. — P. 541–567.
2. Зефирова Г. С. Заболевания щитовидной железы. — М: Арт-Бизнес-Центр, 1999. — 215 с.
3. Das K., Chainy G. B. // Neurochem. Res. — 2004. — **29**, N 9. — P. 1755–1766.
4. Constantini F., Pierdomenico S. D., Cesare D. // Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. — 1998. — **18**. — P. 732–737.
5. Vendemiale G., Grattagliano I., Altomare E. // Int. Clin. Lab. Res. — 1999. — **29**, N 2 — P. 49–55.
6. Schoneich C., Sharov V. S. // Free Radical Biol. Med. — 2006. — **41**, N 10. — P.1507–1520.
7. Urso M. L., Clarkson P. M. // Toxicology. — 2003. — **189**, N 1–2. — P. 41–54.
8. Мохаммад Салем Джазаєрлі, Давидов В. В. // Укр. біохім. журн. — 2006. — **78**, N 5. — С. 81–87.
9. Браверман Л. Е. Болезни щитовидной железы. — М.: Медицина, 2000. — 432 с.
10. Krasilnikova O. A., Kavok N. S., Babenko N. A. // BMC Physiology. — 2002. — **2**, N 12. — P. 9–11.
11. Мохаммад Салем Джазаєрлі, Давидов В. В. // Міжнар. ендокрин. журн. — 2006. — **2**, № 4. — С. 78–80.
12. Де-Пьер Ж., Дальнер Г. Биохимическое исследование мембран. — М.: Мир, 1979 — С. 75–123.
13. Дубинина Е. Е. // Вопр. мед. химии. — 2000. — № 4. — С. 36–47.
14. Rice-Evans C. A., Diplock A. T., Symons M. C. R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. — London, 1991. — 234 p.
15. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1997. — С. 66–68.
16. Вьюшина А. В., Герасимова И. Г., Флеров М. А. // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2002. — **133**, № 3. — С. 286–288.
17. Muller G., Fruhant A., Mathias B. // Z. Gesamte. Med. und Grenzgeb. — 1986. — **41**, N 24. — S. 673–676.

18. *Барабой В. А., Орел В. Э., Карнаух И. М.* Перекисное окисление липидов и радиация. — К.: Наукова думка, 1991. — 256 с.
19. *Костюк В. А.* // *Вопр. мед. химии.* — 1990. — **36**, № 2. — С. 28–35.
20. *Reinheckel T., Noack H., Lorenz S. et al.* // *Free Radical Res.* — 1998. — **29**, N 4. — P. 297–305.
21. *Hensley K., Robinson K. A., Gabbita S. P. et al.* // *Free Radical Biol. Med.* — 2000. — **28**, N 10. — P. 1456–1462.
22. *Mossan B. T.* // *Ibid.* — N 9. — P. 1315–1316.

Получено 31.05.2007