

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛУТАМИОНА В МОЗГУ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

В. В. РУДЕНКО, А. В. ГОЛОБОРОДЬКО, А. В. РЕДЬКО, В. В. ДАВЫДОВ

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

Целью работы было изучение особенностей изменения содержания глутамиона в мозгу крыс разного возраста в условиях иммобилизационного стресса. Показано, что в процессе онтогенеза в мозгу крыс происходят изменения содержания восстановленного глутамиона в сторону снижения их количества. В большей мере это снижение наблюдается у 2- и 24-месячных крыс, для которых характерно большее проявление стрессорной стимуляции свободнорадикальных процессов в мозгу и исходно более высокий уровень в нем восстановленного глутамиона.

Ключевые слова: глутамион, крысы, иммобилизационный стресс, мозг, онтогенез.

Стресс представляет собой один из распространенных этиологических факторов внутренних заболеваний и, в том числе, заболеваний сердечно-сосудистой и центральной нервной системы [1,2]. Помимо прочего, это обусловлено стрессорной стимуляцией свободнорадикальных процессов, которые обладают повреждающим эффектом на ткани внутренних органов [3,4]. В процессе онтогенеза происходит изменение чувствительности тканей к стрессорному повреждению [5,6]. Однако причины возникновения этого феномена окончательно не установлены. По всей вероятности, с возрастом организма нарушается определенная взаимосвязь между чувствительностью тканей внутренних органов к стрессорным повреждениям и модуляцией их устойчивости к свободнорадикальным процессам.

Важное значение в защите клеток от свободнорадикального повреждения имеют системы антиоксидантной защиты, которые, с одной стороны, обеспечивают обрыв цепей свободнорадикальных реакций, а с другой — утилизацию цитотоксических продуктов метаболизма свободных радикалов, к числу которых относятся многочисленные карбонильные соединения. Характерно, что обоими этими свойствами обладает восстановленный глутатион [7–9]. Однако до настоящего времени все еще нет ясных представлений об особенностях его участия в защите тканей от стрессорного повреждения в организме в зависимости от возраста. Учитывая это, целью работы явилось изучение особенностей изменения содержания

глутамиона в мозгу крыс при иммобилизационном стрессе у животных разного возраста.

Материалы и методы

Работа выполнена на 48 крысах — самцах линии Вистар 1,5-; 2-; 12- и 24-месячного возраста. Животных делили на 2 подгруппы: 1 — интактные, 2 — крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30 мин. Эффективность воспроизведения стресса контролировали по уровню 11-оксикортикостероидов в крови.

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом немедленно после окончания иммобилизации. Извлекали головной мозг, который гомогенизировали с 1н. раствором охлажденной хлорной кислоты. Гомогенат центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант нейтрализовали и использовали для определения содержания в нем окисленного и восстановленного глутамиона [10].

В специальных экспериментах осуществляли фракционирование мозга. С этой целью полушария головного мозга гомогенизировали при помощи стеклянного гомогенизатора Поттера-Эльвегейма в среде выделения, содержащей 0,32 М сахарозу и 0,01 М трис (pH 7,4) в соотношении 1 : 10 (масса ткани/объем среды выделения). Приготовленные таким образом гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g. Полученные супернатанты подвергали последующему центрифугированию в течение 20 мин при 10 000 g. Надосадочную жидкость

Содержание глутатиона (мкмоль/г ткани) в мозгу крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе ($M \pm m$; $n = 5-6$)

Показатель	Возраст животных:							
	1,5 месяца		2 месяца		12 месяцев		24 месяца	
	интактные	стресс	интактные	стресс	интактные	стресс	интактные	стресс
Глутатион восстановленный (GSH)	3,5 ± 0,2	2,9 ± 0,3	7,1 ± 0,8**	2,9 ± 0,3*	3,1 ± 0,6	2,4 ± 0,2	5,4 ± 0,3***	2,8 ± 0,1*
Глутатион окисленный (GSSG)	0,18 ± 0,04	0,08 ± 0,01*	0,23 ± 0,02	0,14 ± 0,02*	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,07 ± 0,01

Примечание: * $P < 0,05$ по отношению к интактным крысам; ** $P < 0,05$ по отношению к интактным 1,5-месячным крысам; *** $P < 0,05$ по отношению к интактным 12-месячным крысам

использовали в работе в качестве постмитохондриальной фракции, в которой проводили измерение содержания карбонилированных белков [11].

Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури.

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

Результаты и обсуждение

Из представленных в таблице данных видно, что в процессе онтогенеза в мозгу крыс происходит изменение уровня восстановленного глутатиона. Его содержание у животных двухмесячного возраста вдвое выше, чем у полуторамесячных. Второй пик повышения концентрации восстановленного глутатиона в мозгу возникает при старении: у 24-месячных крыс ее величина на 74% выше, чем у 12-месячных. Обращает на себя внимание еще и тот факт, что у старых животных в мозгу увеличивается восстановленность пула глутатиона (GSH/GSSG) по сравнению с его величиной у взрослых 12-месячных крыс (рис. 1).

Оценивая результаты проведенных исследований, можно предположить, что различия в содержании восстановленного глутатиона в мозгу крыс в разные периоды их развития отражают изменения в эти периоды мощности антиоксидантной системы. Обращает на себя внимание значительное повышение этого показателя в раннем периоде половой зрелости (двухмесячный возраст).

Принимая во внимание факт существования различий в содержании восстановленного глутатиона в зависимости от возраста животных, а также его участие в защите клеток от свободнорадикального повреждения [8,12], представляло интерес изучить особенности изменения содержания глутатиона в мозгу крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизационному стрессу. Проведенные в этом направлении исследования показали, что у животных всех возрастных групп после 30-минутной иммобилизации в мозгу происходит уменьшение содержания восстановленного глутатиона. Возникновение подобного сдвига, очевидно, обусловлено стрессорной стимуляцией свободнорадикальных процессов [2–4].

Вместе с тем было установлено, что уровень понижения содержания восстановленного глутатиона в мозгу при иммобилизационном стрессе у крыс разного возраста существенно различается. В большей мере концентрация восстановленного глутатиона уменьшается в

мозгу иммобилизованных 2- и 24-месячных крыс. В то же время у 1,5- и 12-месячных животных подобный сдвиг имеет характер всего лишь выраженной тенденции.

Интерес вызывает еще и тот факт, что уменьшение содержания восстановленного глутатиона в мозгу крыс под влиянием стресса не сопровождается параллельным увеличением концентрации его окисленной формы. Более того, у 1,5-, 2- и 24-месячных иммобилизованных животных содержание этого метаболита даже уменьшается по сравнению с его исходным уровнем.

Анализируя причины снижения концентрации окисленного и восстановленного глутатиона в головном мозгу крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу, можно предположить их взаимосвязь с одновременным повышением скорости восстановления окисленного глутатиона в глутатионредуктазной реакции и увеличением использования восстановленного глутатиона в процессе конъюгации с белками нервных клеток, а также многочисленными карбонильными метаболитами, образующимися в них при стрессорной стимуляции свободнорадикальных процессов. Можно предположить, что в условиях повышения интенсивности свободнорадикальных процессов в мозгу при стрессе оба эти процесса приобретают компенсаторное значение. Характерно, что в большей мере оно проявляется у 2- и 24-месячных животных.

Обнаруженные возрастные различия в использовании глутатиона в мозгу крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации, могут быть связаны с неодинаковым уровнем стрессорной стимуляции в нем свободноради-

кальных процессов. Учитывая, что в качестве чувствительного маркера оксидативного стресса выступает накопление карбонилированных белков [13,14], то для проверки высказанного предположения далее было проведено изучение особенностей их накопления в постмитохондриальной фракции мозга крыс разного возраста в условиях иммобилизации. Полученные результаты представлены на рис. 2. Видно, что максимальный уровень стрессорного накопления карбонилированных белков в мозгу происходит именно у 2- и 24-месячных животных.

Таким образом, максимальное использование глутатиона в мозгу 2- и 24-месячных крыс обусловлено тем, что в этом возрасте иммобилизационный стресс вызывает максимальную стимуляцию в их мозгу свободнорадикальных процессов. При этом увеличение в мозгу пула глутатиона и повышение уровня его восстановленности в раннем периоде после наступления половой зрелости и в позднем онтогенезе, представляет собой своеобразную защитную реакцию нервных клеток, т. е. происходит повышение их чувствительности к действию прооксидантных факторов стресса. Однако механизмы формирования этого сдвига не ясны. Требуется также специального изучения вопрос о том, в какой мере повышенная чувствительность мозга к действию прооксидантных факторов стресса в раннем периоде половой зрелости и при старении реализуются в повышении чувствительности мозга к повреждающему эффекту стресса. Выяснению этих вопросов будут посвящены наши дальнейшие исследования.

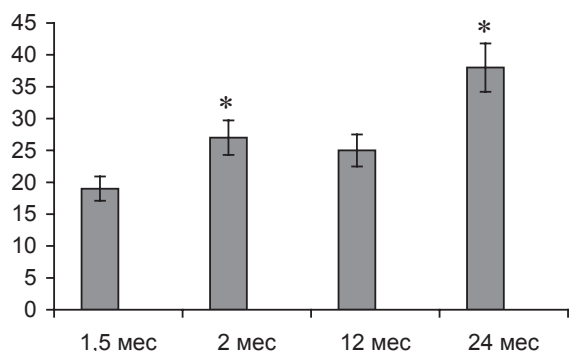


Рис. 1. Динамика уровня восстановленности пула глутатиона (GSH/GSSG) в головном мозгу крыс в процессе онтогенеза. Каждая возрастная группа включает 5–6 животных: * $P < 0,05$ к 1,5-месячным; ** $P < 0,05$ к 12-месячным

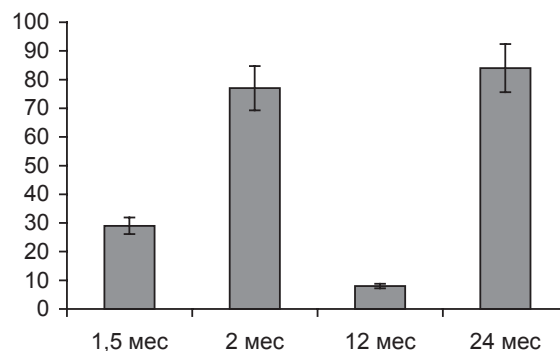


Рис. 2. Увеличение содержания карбонилированных белков (в % к исходному уровню) у крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизационному стрессу. Каждая возрастная группа состояла из 5–6 животных

**ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ВМІСТУ
ГЛУТАТІОНУ В МОЗКУ ЩУРІВ,
РІЗНИХ ЗА ВІКОМ, В УМОВАХ
ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ**

*В. В. Руденко, А. В. Голобородько,
А. В. Редько, В. В. Давидов*

ДУ “Інститут охорони здоров’я дітей і
підлітків АМН України”, Харків;
e-mail: davydov@kharkov.com

Метою роботи було вивчення особливостей зміни вмісту глутатіону в мозку щурів різного віку в умовах іммобілізаційного стресу. Виявлено, що у процесі онтогенезу відбувається зміна вмісту відновленого глутатіону в мозку щурів. В умовах іммобілізаційного стресу вміст цього метаболіту в мозку щурів усіх досліджених вікових груп знижується. Більшою мірою це зрушення виявляється у 2- і 24-місячних щурів, для яких характерним є більш виражений прояв стресорної стимуляції вільнорадикальних процесів у мозку і вищий початковий рівень відновленого глутатіону.

Ключові слова: щури, іммобілізаційний стрес, мозок, онтогенез, глутатіон.

**AGE-RELATED PECULIARITIES
OF GLUTATHIONE CONTENT
CHANGES IN THE BRAIN OF RATS
DURING IMMOBILIZATION STRESS**

*V. V. Rudenko, A. V. Goloborodko,
A. V. Redko, V. V. Davydov*

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

S u m m a r y

The work is aimed at studying age-related peculiarities as regards glutathione content changes in the brain of rats under immobilization stress. It has been established that some changes in the content of reduced glutathione take place in the brain

in the process of ontogenesis. During immobilization stress the content of this metabolite decreases in the brain of all age groups of rats under study. To a greater extent this shift manifests itself in 2- and 24-month-old rats which are characterized by more active stress-stimulated free-radical processes in the brain and by an initially higher level of reduced glutathione.

Key words: rats, immobilization stress, brain, ontogenesis, glutathione.

1. *Меерсон Ф. З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 270 с.
2. *Liu J., Wang X., Shigenaga M. K. Yeo H. C.* // *FASEB J.* – 1996. – **10**, N 13. – P. 1532–1538.
3. *Kovacs P., Juranek I., Stankovicova T., Svec P.* // *Pharmazie.* – 1996. – **51**, N 1. – P. 51–53.
4. *Davydov V. V., Shvets V. N.* // *Exp. Gerontol.* – 2001. – **36**. – P. 1155–1160.
5. *Lakatta E. G.* Heart aging: a fly in the ointment // *Circ. Res.* – 2001. – **88**. – P. 984–986.
6. *Фролькис В. В., Безруков В. В., Кульчицкий О. К.* Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наук. думка, 1994. – 320 с.
7. *Dickinson D. A., Forman H. J.* // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – **64**. – P. 1019–1026.
8. *Seo Y. J., Lee J. W., Lee E. H.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – **37**, N 8. – P. 1272–1281.
9. *Morgan P. E., Dean R. T., Davies M. J.* // *Ibid.* – **36**, N 4. – P. 484–496.
10. *Verbunt R. I. A. M., van Dockum W. G., Bastiaanse E. M. L. et al.* // *Mol. Cell. Cardiol.* – 1995. – **144**. – P. 85–92.
11. *Дубинина Е. Е.* // *Вопросы мед. химии.* – 2000. – № 4. – С. 36–47.
12. *Davydov V. V., Dobaeva N. M., Bozhkov A. I.* // *Exp. Gerontol.* – 2004. – **39**. – P. 11–16.
13. *Levine R. L.* // *Free Radical Biol. Med.* – 2002. – **32**, N 9. – P. 790–796.
14. *Reinheckel T., Noack H., Lorenz S. et al.* // *Free Radic. Res.* – 1998. – **29**, N 4. – P. 297–305.

Получено 26.09.2007