

ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНОМ СТРЕССЕ У КРЫС

К. О. МЕНАБДЕ, Г. М. БУРДЖАНАДЗЕ, М. В. ЧАЧУА,
З. Т. КУЧУКАШВИЛИ, Н. И. КОШОРИДЗЕ

*Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, Грузия;
e-mail: ketimenabde@yahoo.com*

Изучена интенсивность пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантной системы в плазме крови, в тканях головного мозга и сердечной мышцы крыс при их 40-дневной изоляции и нарушении циркадианного ритма. Согласно полученным данным, в плазме крови, в тканях головного мозга и сердечной мышцы животных наблюдаются неоднозначные количественные изменения содержания окиси азота (NO). На фоне этих изменений меняется интенсивность процесса ПОЛ, о чем говорят связанные с ним количественные изменения продуктов ПОЛ, в частности, ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов.

Исследована активность ферментов антиоксидантной системы клетки — супероксиддисмутазы и каталазы, а также митохондриальных ферментов тканей сердечной мышцы и головного мозга, таких как сукцинатдегидрогеназа, креатинкиназа и альдолаза.

Установлено, что изоляция животных и нарушение циркадианного ритма являются факторами, которые вызывают существенное снижение энергетического метаболизма в клетках головного мозга и сердечной мышцы и обуславливают окислительный стресс. Увеличение воздействия стрессогенных факторов может вызвать необратимые процессы, приводящие к возникновению патологий сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: циркадианный ритм, антиоксидантная система, окислительный стресс, пероксидное окисление липидов.

Известно, что вследствие любого стресса в живых клетках инициируются ответные реакции, такие как: свободнорадикальное окисление, изменение концентрации ионов кальция, снижение активности энергетического метаболизма. Все эти изменения в конечном итоге приводят к формированию ряда патологических состояний [1, 2].

Одним из основных показателей изменений клеточного метаболизма является активация процесса пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Интенсивность ПОЛ зависит от процесса образования активных форм кислорода и связана с качественными показателями антиоксидантной системы клетки [3, 4]. Фактором инициации ПОЛ являются свободные радикалы [5]. Процесс продолжается до тех пор, пока не включится антиоксидантная система клетки, назначением которой является защита клетки от токсического воздействия избыточного количества свободных радикалов. Интенсификация прооксидантных процессов, которые превышают антиоксидантные способности клетки, вызывает окислительный стресс. Окислительный стресс является важным

механизмом формирования таких хронических заболеваний как стенокардия, сердечная недостаточность, артериальная гипертензия, гиперкоагуляция, а также дислипидемия, дисфункция эндотелия, нейродегенеративные заболевания и др. [6, 7].

Антиоксидантная система животных организмов представлена рядом эндогенных соединений, активность которых в клетках не постоянна и меняется при определенных условиях, особенно при длительном и сильном стрессе. Как известно, к таким формам стресса относится изоляция животных и нарушение циркадианного ритма [8, 9].

Целью нашей работы было изучение активности ферментов антиоксидантной системы и энергетического обмена в плазме крови, тканях головного мозга и сердечной мышцы крыс при изоляции и нарушении циркадианного ритма.

Материалы и методы

Исследования проводились на половозрелых белых лабораторных крысах, которые были социально изолированы (в индивидуаль-

ных клетках) и содержались в условиях темноты (соотношение темнота/свет 23,5/0,5 час) в течение 40 дней. Контрольная группа находилась в естественных условиях (соотношение темнота/свет 10,00/14,00 час).

Методом дифференциального центрифугирования получали субклеточные фракции (СФ) из гомогената цельного головного мозга (митохондриальная фракция – 20 000 г/60 мин; цитозольная фракция – 100 000 г/60 мин) [10] и гомогената ткани сердца [11].

Концентрации NO_2^- в исследуемых пробах оценивали по методу [12].

Содержание ТБК-активных соединений определяли по концентрации малонового диальдегида методом [13], а диеновые конъюгаты (ДК) ненасыщенных жирных кислот определяли согласно методу, описаному в работе [14]. Количество общих липидов в сыворотке крови определяли с помощью диагностической тест-системы «Био-ЛА-Тест».

В исследуемых пробах определяли активность каталазы (1.11.1.6) [15], супероксиддисмутазы (СОД – 1.15.1.1) [16]. Активность креатинкиназы (2.7.3.2) определяли по модифицированному методу [17] (креатинкиназа катализирует превращение креатинина в креатинфосфат. Ион фосфата, освобожденный при гидролизе креатинфосфата, определяют после

депротеинирования как желтый комплекс фосфорнованадиевомолибденовой кислоты. $\lambda = 400 \text{ нм}$). Для определения активности сукцинатдегидрогеназы (1.3.99.1) применяли модифицированный метод [18]. Активность альдолазы (4.1.2.13) определяли по методу [19].

Концентрацию протеинов в исследуемых образцах измеряли по методу Лоури [20].

Статистическую обработку данных проводили по ANOVA.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что при 40-суточной изоляции и нарушении циркадианного ритма в плазме крови, тканях головного мозга и сердечной мышцы крыс наблюдаются разнонаправленные изменения концентрации NO_2^- (табл. 1). В частности, в плазме крови, на фоне длительного эмоционального стресса, содержание NO_2^- уменьшается, тогда как в тканях головного мозга и сердечной мышцы, наоборот, – увеличивается. Учитывая значение активных форм азота при формировании сердечно-сосудистой патологии [21], длительная изоляция животных и параллельное нарушение циркадианного ритма может стать причиной ряда заболеваний, в том числе атеросклероза, что, в данной ситуации подтверждается увеличением содержания об-

Таблица 1. Содержание NO_2^- , общих липидов, ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов в плазме крови, тканях головного мозга и сердечной мышцы крыс в условиях длительного психоэмоционального стресса ($M \pm m$, $n = 10$)

Исследуемые показатели	Головной мозг		Сердечная мышца		Плазма крови	
	Контроль	Стресс	Контроль	Стресс	Контроль	Стресс
NO_2^- , мкмоль/мл гомогената	0,30±0,04	0,80±0,06*	0,20±0,01	0,80±0,07**	0,90±0,11	0,50±0,08*
ТБК-активные продукты, мкмоль МДА/мг протеина	2,30±0,02	10,20±2,01**	0,6±0,1	3,30±0,33**	2,10±0,25	6,60±1,45*
Диеновые конъюгаты, мкмоль/мг протеина	2,20±0,38	0,60±0,01**	1,10±0,05	4,00±0,84**	1,2±0,1	5,30±0,57**
Общие липиды, мг/мл гомогената	6,3±0,9	6,20±0,15	5,90±0,41	6,00±0,21	5,45±,16	8,33±0,93*

Здесь и в табл. 2 * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$; концентрация протеинов в гомогенатах – 2,0 мг/мл

щих липидов в плазме крови. В то же время, в тканях головного мозга и сердечной мышцы этот показатель практически не меняется (табл. 1).

Как известно, NO активно включена в процесс ПОЛ, что способствует окислению различных протеиновых молекул, в том числе энзимов [22]. Соответственно, можно было предположить, что на фоне количественных изменений NO происходит изменение интенсивности процесса ПОЛ. Исходя из этих соображений изучали изменение содержания продуктов ПОЛ, в частности, концентрации ТБК-активных соединений и ДК в плазме крови, тканях головного мозга и сердечной мышцы крыс в условиях 40-суточной изоляции (табл. 1).

Вследствие стресса (табл. 1), как в тканях головного мозга и сердечной мышцы, так и в плазме крови, количество ТБК-активных продуктов и ДК изменяется. В частности, после 40-суточной изоляции крыс и нарушения циркадианного ритма концентрация малонового диальдегида в головном мозгу, по сравнению с контрольными животными, возрастает в 4 раза, в сердечной мышце в 5 раз, а в плазме крови – в 3 раза. Количество ДК также возрастает в тканях сердечной мышцы и плазме крови, по сравнению с контрольными показателями. В то же время, в тканях головного мозга концентрация ДК, по сравнению с контрольными показателями, уменьшается, что возможно указывает на активацию в головном мозгу антиоксидантных компенсаторных систем, отвечающих на стрессовую стимуляцию.

Эти изменения способствуют ограничению прооксидативного процесса и соответственно способствуют утилизации продуктов свободнорадикального окисления. Можно предположить, что причиной данных изменений является увеличение активности антиоксидантных энзимов или энзимов, принимающих участие в утилизации цитотоксических карбонильных продуктов процесса свободнорадикального окисления, что, в свою очередь, предопределяется модуляцией гормонального регулирования.

Различные данные были получены также при определении количества общих липидов в исследуемых тканях. Как видно из табл. 1, 40-суточная изоляция животных и нарушение циркадианного ритма не влияют на количество общих липидов в тканях головного мозга и сердечной мышцы. Концентрация общих липидов в плазме крови животных, находящихся в стрессовых условиях, по сравнению с контролем, возрастает приблизительно на 52%. Полученные данные указывают на гиперлипидемию и на возможность возникновения связанных с ней осложнений [23].

Известно, что малоновый диальдегид, взаимодействуя с протеинами и нуклеиновыми кислотами, вызывает образование межмолекулярных связей. Таким образом, происходят структурные изменения различных протеинов, в том числе и энзимов антиоксидантной защиты, что вызывает изменение их активности. В нормальных условиях антиоксидантная система эффективно реагирует на изменения оксидантного статуса. Ключевыми энзимами

Таблица 2. Активность энзимов антиоксидантной системы в плазме крови, субклеточных фракциях тканей головного мозга и сердечной мышцы крыс в условиях стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадианного ритма ($M \pm m$, $n = 10$)

Ткани	Энзимы	Контроль	Стресс
Головной мозг	Митохондриальная СОД, мккат. на 1 мг протеина	15,79 ± 1,03	10,42 ± 2,08**
	Цитозольная СОД, мккат. на 1 мг протеина	6,44 ± 1,14	2,72 ± 0,79**
	Цитозольная каталаза, мкмоль/мин на 1 мг протеина	0,104 ± 0,05	0,054 ± 0,01*
Сердечная мышца	Митохондриальная СОД, мккат. на 1 мг протеина	16,79 ± 1,09	8,42 ± 3,43**
	Цитозольная СОД, мккат. на 1 мг протеина	5,41 ± 0,59	2,72 ± 0,26**
	Цитозольная каталаза, мкмоль/мин на 1 мг протеина	12,9 ± 3,0	4,8 ± 0,8**
Плазма крови	СОД, мккат. на 1 мг протеина	16,25 ± 0,56	9,08 ± 0,21*
	Каталаза, мкмоль/мин на 1 мг протеина	21,8 ± 1,9	14,67 ± 0,15*

этой системы являются супероксиддисмутаза и каталаза. Исходя из вышесказанного, мы изучали изменение активности этих энзимов в плазме крови, СФ тканей головного мозга и сердечной мышцы животных на фоне стресса, вызванного изоляцией крыс и нарушением циркадианного ритма (табл. 2).

Как следует из данных, представленных в табл. 2, при изоляции животных наблюдается значительное снижение активности СОД в мозгу и миокарде. В частности, после 40-дневной изоляции в митохондриальной фракции миокарда, по сравнению с контрольными показателями, активность энзима уменьшается почти на 50%. Снижается также активность цитозольной изоформы СОД и в плазме крови. Аналогичная картина наблюдается при определении активности каталазы.

Из полученных данных следует, что изоляция животных и нарушение природного циркадианного ритма вызывает ослабление активности антиоксидантной системы головного мозга, сердечной мышцы и крови крыс. В первую очередь эти изменения затрагивают митохондриальные энзимы.

Учитывая полученные результаты, в следующих сериях опытов была изучена активность митохондриальных энзимов клеток сердечной мышцы и головного мозга, таких как сукцинатдегидрогеназа, креатинкиназа и альдолаза, в условиях стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадианного ритма.

Сукцинатдегидрогеназа играет важную роль в функционировании дыхательной цепи. Как видно из рис. 1, на 40-й день изоляции, как в сердечной мышце, так и в головном мозгу, активность сукцинатдегидрогеназы, по сравнению с контрольными показателями, значительно уменьшается. В сердечной мышце активность энзима уменьшается приблизительно на 46,5%, что позволяет предположить ингибирование протекающего в митохондриях окислительного фосфорилирования, уменьшение генерации АТФ и усиление оксидативного стресса.

На снижение интенсивности окислительного фосфорилирования указывает также снижение активности креатинкиназы. Известно, что креатинкиназа активно включена в процесс, поддерживающий количество АТФ в клетках с помощью системы креатин/креатинфосфокиназа/креатинфосфат. Эффективное функционирование системы регулируется митохондриальной и цитозольной изоформами энзима [24]. Полученные данные представлены на рис. 2.

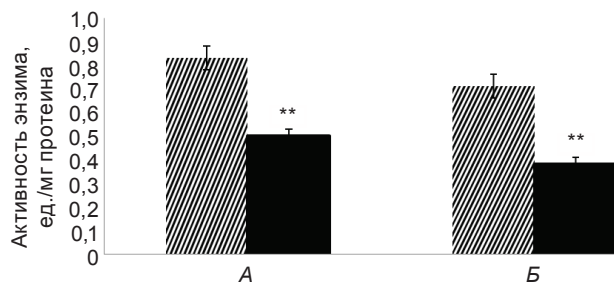


Рис. 1. Изменение активности сукцинатдегидрогеназы в головном мозгу (А) и сердечной мышце (Б) крыс, в условиях стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадианного ритма. Здесь и на рис. 2–3 * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$; ▨ — контроль; ■ — стресс

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что в условиях стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадианного ритма в клетках головного мозга и сердечной мышцы существенно снижается уровень окислительного фосфорилирования и соответственно генерация энергии, что является показателем нарушения энергетического метаболизма клеток. Как известно, анаэробный метаболизм углеводов — один из источников энергии в клетках, поэтому было интересно проследить за этим процессом в условиях стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадианного ритма. О течении процесса гликолиза судили по изменениям активности альдолазы. Как видно на рис. 3, в условиях длительного эмоционального стресса (40 дней) активность альдолазы, как в головном мозгу, так и в сердечной мышце, по сравнению с контрольными показателями, значительно снижена.

Показано, что изоляция животных и нарушение циркадианного ритма являются фак-

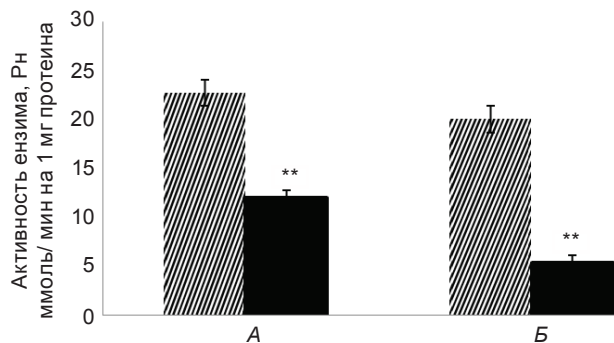


Рис. 2. Изменение активности креатинкиназы в головном мозгу (А) и сердечной мышце (Б) крыс, в условиях стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадианного ритма

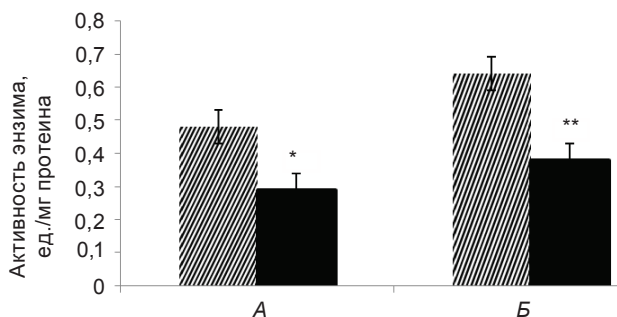


Рисунок 3. Изменение активности альдолазы в головном мозгу (А) и сердечной мышце (Б) крыс, в условиях стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадианного ритма

торами, которые существенно снижают энергетический метаболизм в тканях головного мозга и сердечной мышцы и обуславливают оксидативный стресс, который, со своей стороны, может стать причиной образования токсичных радикалов.

Оксидативный стресс лежит в основе молекулярного механизма повреждения кровеносных сосудов и миокарда, что является предпосылкой таких болезней, как хроническая сердечная недостаточность, атеросклероз, гиперлипидемия, артериальная гипертензия, кардиомиопатия и др. [25, 26]. При социальной изоляции животных и нарушении циркадианного ритма, показателем оксидативного стресса является снижение активности антиоксидантных энзимов – СОД и каталазы, как в плазме крови, так и в клетках миокарда и головного мозга.

Настоящий проект выполнен при финансовой поддержке Национального научного фонда Грузии (Грант № GNSF/ST08/2-375). Все идеи в статье принадлежат авторам и могут не совпадать с мнением Национального научного фонда Грузии.

ТКАНИННА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ В УМОВАХ ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ В ЩУРІВ

К. О. Менабде, Г. М. Бурджанадзе, М. В. Чачуа, З. Т. Кучукашвілі, Н. І. Кошорідзе

Тбіліський державний університет
ім. І. Джавахішвілі, Грузія;
e-mail: ketimenabde@yahoo.com

Досліджено інтенсивність процесу ПОЛ та активність ензимів антиоксидантної системи у плазмі крові, тканинах головного мозку і серцевого м'яза щурів в умовах ізоляції та порушення циркадианного ритму. Одержані дані показали, що процес пероксидного окислення ліпідів інтенсифікується на тлі кількісних змін рівня оксиду азоту. Про активацію ПОЛ свідчать зміни концентрації ТБК-активних продуктів і дієнових кон'югатів.

Також вивчена активність ензимів супероксиддисмутази, каталази, сукцинатдегідрогенази, креатинкінази і альдолази. Показано, що ізоляція тварин і порушення циркадианного ритму є факторами, які зумовлюють зниження енергетичного метаболізму в тканинах головного мозку і міокарда і обумовлюють оксидативний стрес, що може стати причиною утворення токсичних радикалів. Продовження часу дії стресогенних чинників може спричинити незворотні процеси, які є причиною виникнення патологій серцево-судинної системи.

Ключові слова: циркадианний ритм, антиоксидантна система, оксидативний стрес, пероксидне окислення ліпідів.

TISSUE SPECIFICITY OF LIPID PEROXIDATION UNDER EMOTIONAL STRESS IN RATS

K. O. Menabde, G. M. Burjanadze, M. V. Chachua, Z. T. Kuchukashvili, N. I. Koshoridze

Iv. Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia;
e-mail: ketimenabde@yahoo.com

S u m m a r y

The intensity of lipid peroxidation and activity of antioxidant system enzymes in the blood plasma, brain and cardiac muscle of laboratory rats under 40 days of isolation and violation of diurnal cycle was studied. The obtained data show that on the background of concentration changes in NO changes also take place in the intensity of lipid peroxidation process, indicated by changes in the concentration of TBA-active products and diene conjugates.

The changes taking place in the activity of superoxidodismutase, catalase, succinatdehydrogenase, creatine kinase and aldolase under stress were studied.

The resulting data show that isolation of animals and violation of diurnal cycle are the factors causing a significant reduction in the energy metabolism in the brain and heart tissue cells and resulting in oxidative stress that, in its turn, may become the reason for development of toxic radicals.

Furthermore, prolonged stress may result in irreversible processes that are considered to be the reasons for significant pathologies of the cardiovascular system.

Key words: diurnal cycle, antioxidant system, oxidative stress, lipid peroxidation.

1. *Cenci S., Sitia R.* // FEBS Lett. – 2007. – **581**. – P. 3652–3657.
2. *Laurent G., Solari F., Mateescu B. et al.* // Cell Metabolism. – 2005. – **7**. – P. 113–124.
3. *Kranner I., Simona Birtic S.* // Integr. Comp. Biol. – 2005. – **45**. – P. 734–740.
4. *Gorenek L., Acar A., Aydın A. et al.* // J. Trans. Med. – 2006. – **4**. – P. 25–31.
5. *Cao W., Carney J. M.* // Neurosci. Lett. – 2000. – **88**. – P. 233–238.
6. *Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K. et al.* // Circulation. – 2001. – **104**. – P. 263–268.
7. *Landmesser U., Spiekermann S., Dikalov S. et al.* // Ibid. – 2002. – **106**. – P. 3073–3078.
8. *Kunieda T., Minamino T., Katsuno T.* // Circ. Res. – 2006. – **98**. – P. 532–539.
9. *Maekawa T., Kim S., Nakai D. et al.* // The EMBO J. – 2009. – **29**. – P. 196–208.
10. *De Robertis E.* // Handb. Neurochem. – 1969. – **2**. – P. 365–372.
11. *Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д.* // Биохимия. – 1985. – **50**, № 8. – С. 1350–1361
12. *Pahan K., Liu X., McKinney M. J. et al.* // J. Neurochem. – 2000. – **74**. – P. 2288–2295.
13. *Uchiyama M., Michara M.* // Biochem. – 1978. – **86**. – P. 271–278.
14. *Скорняков В. И., Кожемякин Л. А., Смирнов В. В.* // Лаб. дело. – 1988. – **8**. – С. 14–16.
15. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Маёрова И. Г., Токарев В. Е.* // Там же. – 1988. – **1**. – С. 16–19.
16. *Сухина Л. А., Аль-Сауди Самси* // Питання експериментальної та клінічної медицини. – Збірник статей. – 2009. – Вип. 13, **1**. – С. 144–149.
17. *Ueda I., Wada T.* // Anal. Biochem. – 1970. – **37**. – P. 169–174.
18. *Miyadera H., Shiomi K., Ui H. et al.* // PNAS. – 2003. – **100**. – P. 473–477.
19. *Koeck T., Levison B., Hazen S. L. et al.* // Mol. Cell Proteomics. – 2004. – **3**. – P. 548–557.
20. *Lowry o., Rosebrough N., Farr A., Rendall R.* // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. –P. 265–268.
21. *Landmesser U., Spiekermann S., Dikalov S. et al.* // Circulation. – 2002. – **106**. – P. 3073–3078.
22. *Eileen M. Bulger E. M., Ronald V. M., Maier M. D.* // Arch. Surg. – 2001. – **136**. – P. 1201–1207.
23. *Seelig M. S.* // Mineral Res. Intern. Tech. Prod. Inform. – 2003. – **1**. – P. 11.
24. *Menabde K., Chipasvili M., Zaalishvili N., Koshoridze N.* // J. Biol. Phys. Chem. (JBPC) – 2008. – **8**, N 1. – P. 13–18.
25. *Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшикова Е. Б.* Окислительный стресс. – М.: Наука, 2001. – с. 342.
26. *Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н.* Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях. – М.: Наука, 2001. – с. 78.

Получено 16.12.2010