

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616-008.939.15-39:616.12-008.61

©Коллектив авторов

### ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В СЕРДЦЕ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

*В.Н.Швец, В.В.Давыдов*

Государственный медицинский университет;  
пр. Маяковского, 26, Запорожье, Украина, 69035;  
тел. (0612) 34-24-42; факс. 0612-330125; эл.почта:dav@nord.vostok.net

Исследовали состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сердце взрослых (10-12 мес.) и старых (22 - 25 мес.) крыс линии Вистар при иммобилизационном стрессе. Оценка состояния ПОЛ проводилась по содержанию в миокарде диеновых конъюгатов, ТБК-реагирующих веществ и флуоресцирующих соединений типа шиффовых оснований. Исследования показали, что иммобилизация животных сопровождалась накоплением диеновых конъюгатов, соединений, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой, и шиффовых оснований в сердце крыс обеих возрастных групп. Однако уровень накопления этих метаболитов в миокарде старых животных был выражен в значительно большей степени, чем у взрослых крыс. Введение диметилсульфоксида ограничивало стрессорную стимуляцию ПОЛ. Обнаружены определенные возрастные особенности в эффективности антиоксидантного действия этого препарата на сердце при иммобилизационном стрессе. Обсуждается возможная роль обнаруженных сдвигов в снижении резистентности миокарда к стрессу при старении.

**Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, сердце, старение, иммобилизация.

**ВВЕДЕНИЕ.** Работами последних лет установлено, что реализация повреждающего действия стресса на миокард опосредована стимуляцией в нем перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1-3]. В настоящей работе исследовано состояние перекисного окисления липидов в сердце взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе.

**МЕТОДИКА.** Работа выполнена на 50 крысах самцах линии Вистар двух возрастов: взрослые (10 - 12 мес.) и старые - (22 - 25 мес.). Обе группы животных в свою очередь были разделены на 3 подгруппы: 1 - интактные, 2 - крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30 минут и 3 - животные, которым за 15 минут до иммобилизации внутривентрально вводили диметилсульфоксид (ДМСО) в дозе 175 мг на 100 г массы.

Эффективность воспроизведения стресса контролировали патоморфологически по изменению структуры надпочечников и тимуса, а также на основании измерения в крови концентрации глюкокортикоидов и катехоламинов [4].

После декапитации животных немедленно экстирпировали сердце, выделяли левый желудочек, который замораживали и хранили до исследования в жидком азоте.

## ПОЛ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

Замороженные пробы миокарда подвергали экстракции смесью гептан:изопропанол (1:1). В гептановых экстрактах спектрофотометрически определяли концентрацию диеновых конъюгатов [5].

В специальных экспериментах проводили экстракцию липидов миокарда по Фолчу [6]. Приготовленные экстракты использовали для спектрофлуориметрического определения концентрации флуоресцирующих продуктов типа шиффовых оснований. Измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi (Япония) при длине волны возбуждения 430 нм и при длине волны эмиссии 430 нм.

Часть проб замороженной сердечной мышцы гомогенизировали с охлажденной 5% трихлоруксусной кислотой. Гомогенаты центрифугировали на холоду в течение 10 мин при 3000 об/мин. В полученных безбелковых супернатантах определяли концентрацию веществ, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК - реагирующих веществ) [7].

Полученные данные подвергали статистической обработке по методу Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Из таблицы видно, что содержание диеновых конъюгатов в миокарде старых крыс на 25% превышало их величину в сердце взрослых животных. Концентрация других изученных продуктов ПОЛ в сердечной мышце старых и взрослых крыс находилась на одном уровне.

*Таблица.* Содержание продуктов перекисного окисления липидов в миокарде взрослых и старых крыс при стрессе.

Метаболит	Взрослые			Старые		
	Интактные	Стресс	ДМСО + стресс	Интактные	Стресс	ДМСО + стресс
Диеновые конъюгаты (нмоль / г)	28±1 (6)	36±1* (6)	26±2 (6)	35±1** (6)	46±1* (6)	35±1* (6)
ТБК-реагирующие вещества (мкмоль/г)	6,1 ±0,6 (6)	9,4±0,5* (6)	3,5 ±0,7* (6)	5,6 ±0,3 (6)	9,8 ±0,7* (6)	3,5 ±0,5* (6)
Шиффовы основания (ЕД/г)	39±10 (4)	99±8* (5)	41±11 (5)	39±9 (6)	149±13* (6)	86 ±16* (6)

Примечание: В скобках - число животных в каждой группе. Содержание шиффовых оснований представлено в единицах интенсивности флуоресценции липидных экстрактов при 430 нм в расчете на г миокарда. \*-р <0,05 к интактным \*\*-р <0,05 к интактным взрослым.

Иммобилизация животных обеих возрастных групп сопровождалась увеличением содержания первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в сердце. Так концентрация диеновых конъюгатов, ТБК-реагирующих веществ и шиффовых оснований возрастала у взрослых крыс на 29%, 54% и 154%, а у старых - на 31%, 75% и 282% соответственно по сравнению с их величиной у интактных животных соответствующих возрастных групп.

При этом соотношение концентраций шиффовых оснований и диеновых конъюгатов в миокарде при стрессе увеличивалось у взрослых крыс в 1,7 раза, а у старых - в 2,6 раза соответственно по сравнению с интактными животными. Соотношение концентраций шиффовых оснований и ТБК-реагирующих веществ в сердце взрослых крыс при стрессе увеличивалось в 1,5, а у старых - в 1,9 раз соответственно по сравнению с интактными (рис. 1).

Введение ДМСО взрослым крысам перед иммобилизацией предупреждало увеличение у них содержания первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в миокарде. У старых животных при этом сдвиги аналогичной направленности возникали лишь в отношении диеновых конъюгатов и ТБК-реагирующих веществ. Однако, под влиянием ДМСО у крыс этой возрастной группы не происходило нормализации уровня шиффовых оснований в сердечной мышце при

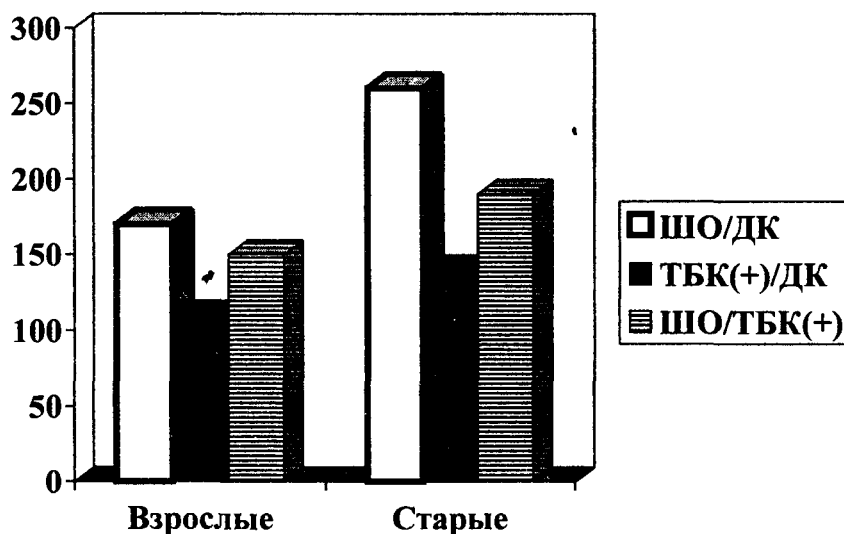


Рисунок 1.

Изменение соотношения концентраций первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в сердце взрослых и старых крыс при стрессе. Соотношение концентраций продуктов перекисного окисления липидов в миокарде intactных животных принято за 100%. Используемые сокращения: ДК - диеновые конъюгаты, ТБК(+) - ТБК-реагирующие вещества, ШО - шиффовы основания.

иммобилизации. Их концентрация в данном случае хотя и становилась на 43% меньше, чем у старых, подвергнутых стрессу крыс, но при этом она все-таки превышала на 121% ее величину в сердце старых intactных животных.

Полученные данные об увеличении содержания начальных продуктов перекисного окисления липидов - диеновых конъюгатов в сердце у старых крыс в сравнении со взрослыми животными отражают усиление скорости радикалообразования в миокарде на поздних этапах онтогенеза. Подобное предположение вполне укладывается в рамки свободнорадикальной теории старения [8].

Несмотря на обнаруженные возрастные различия в исходном состоянии процесса радикалообразования у взрослых и старых крыс, при стрессе в миокарде формируется однотипный сдвиг - стимуляция перекисного окисления липидов. Подтверждением этого служит увеличение концентрации первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (ТБК-реагирующие вещества) и конечных (шиффовы основания) продуктов этого процесса в сердечной мышце.

Факт возникновения явлений окислительного стресса и, как следствие, стимуляции перекисного окисления липидов при различных стрессорных состояниях, описан многими авторами [1,10,]. Его формирование в сердце предупреждается превентивным введением антиоксидантов и в том числе ДМСО. Последнее является важным аргументом в пользу существующего предположения о том, что в качестве одной из основных причин усиления свободнорадикальных процессов в миокарде при стрессе, может быть уменьшение мощности антиоксидантных систем сердца [11,12].

Однако, несмотря на однонаправленный характер сдвига в интенсивности ПОЛ, у взрослых и старых крыс выявляются определенные возрастные особенности со стороны стрессорной стимуляции данного процесса в миокарде. Так, анализ полученных данных о концентрации первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления в сердечной мышце свидетельствует о более выраженной стимуляции ПОЛ у старых животных. Возникновение этого сдвига, по всей вероятности, не определяется лишь возрастным изменением мощности антиоксидантной системы миокарда, о чем косвенно свидетельствуют результаты экспериментов по изучению особенностей влияния ДМСО на состояние перекисного окисления в сердце старых крыс при стрессе.

#### ПОЛ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

Особое значение в повышении интенсивности стрессорной стимуляции ПОЛ в миокарде при старении может иметь возрастное изменение состояния систем генерации активных форм кислорода в кардиомиоцитах и модуляция их чувствительности к действию повреждающих факторов стресса. Важную роль в том приобретает усиление образования свободнорадикальных продуктов электронтранспортными цепями митохондрий при старении [13,14].

Выявленные возрастные особенности в стрессорной стимуляции перекисного окисления липидов, по всей вероятности, сопровождаются появлением характерных сдвигов со стороны метаболизма вторичных продуктов этого процесса в сердце. На это указывает тот факт, что при исходно близкой концентрации начальных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) и ТБК-реагирующих веществ у старых крыс при стрессе вдвое увеличивается содержание его конечных продуктов (шиффовых оснований) по сравнению со взрослыми животными. Отражением того является и полуторократное увеличение индекса соотношения концентраций шиффовых оснований к диеновым конъюгатам (ШО/ДК), а также увеличение в 1,3 раза индекса соотношения ТБК-реагирующих веществ к диеновым конъюгатам (ТБК+/ДК) и соотношения шиффовых оснований к ТБК-реагирующим веществам (ШО/ТБК+) у старых крыс по сравнению со взрослыми животными (рис.).

Подобное состояние может возникать при изменении путей метаболизма ТБК-реагирующих веществ, среди которых особое значение имеет малоновый диальдегид и гомологичные ему соединения, образующиеся в процессе обмена перекисей липидов [9,15,16]. Характер обнаруженных сдвигов в содержании промежуточных продуктов ПОЛ в миокарде позволяет предположить, что при старении утилизация малонового диальдегида и его гомологов идет преимущественно по пути образования соединений типа шиффовых оснований. У взрослых животных в подобной ситуации усиливается использование малонового диальдегида для образования малоновой кислоты. Учитывая, что малонат играет ключевое значение в синтезе высших жирных кислот, можно предположить определенную взаимосвязь между усилением использования малонового диальдегида для образования малоновой кислоты и увеличением эффективности репаративных процессов в гидрофобном слое клеточных мембран, повреждаемых в условиях формирования оксидативного стресса [17,18].

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют высказать предположение о том, что стимуляция ПОЛ может иметь различные последствия в процессе формирования стрессорного повреждения миокарда у взрослых и старых крыс. У взрослых животных стимуляция начальных стадий перекисного окисления, сопровождаемая усилением использования малонового диальдегида и гомологичных ему соединений для образования высших жирных кислот, способствует повышению эффективности течения репаративных процессов в гидрофобном слое биологических мембран. У старых крыс стимуляция перекисного окисления липидов сопровождается выраженным накоплением конечных продуктов данного процесса в миокарде, что предопределяет усиление повреждающего действия стресса на миокардиальные клетки [1] и может выступать в роли патогенетического важного звена повышения чувствительности сердечной мышцы к стрессу при старении [19-21]. Однако высказанные предположения требуют проведения специальных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Сауля А.И., Меерсон Ф.З. (1990) Постстрессорное нарушение функции миокарда. Кишинев: Штиинца.
2. Ceremuzinski L., Barcikowski B., Lewicki Z. (1991) *Exp.Pathol.*, **43**, 213 - 220.
3. Ytrehus K., Hegstad A.C. (1991) *Acta Physiol.Scand.*, **599**, 81 - 91.

4. Швец В.Н., Давыдов В.В. (1992) Биохимия стресса и пути повышения эффективности лечения заболеваний стрессорной природы. Запорожье, издат. ЗГМУ, с.64-67.
5. Стальная И.Д. (1977) Современные методы в биохимии. М.: Медицина, с. 63-64.
6. Kates M. (1977) Techniques of Lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids. Amsterdam, London: American Elsevier Publishing Co., 320 p.
7. Muller G., Fruhant A., Mathias B. (1986) Z. Gesamte. Um. Med. und Grenzgeb., **41**, 673-676.
8. Harman D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 7124-7128.
9. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М.: Наука.
10. Микаэлян Э.М., Мкртчян С.Л. (1987) Журнал exper. клин. мед., **27**, 119-124.
11. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. (1993) Усп. совр. биол., **113**, 456-470.
12. Michiels C., Raes M., Tonsaint O., Remacle J. (1994). Free Radic. Biol. Med., **17**, 235-248.
13. Nohl H. (1990) Age, **13**, 104.
14. Sawada M., Carlson J.S. (1987) Mech. Ageing. Dev., **41**, 125-137.
15. Давыдов В.В. (1991) Укр. биохим. журн., **63**, 56-61.
16. Давыдов В.В. (1993) Укр. биохим. журн., **65**, 97-100.
17. Parinandi N.L., Weis B.K., Natarajan V., Schmid H. (1990) Arch. Biochem. Biophys., **280**, 45-52.
18. Morini P., Casalino E., Marcotrigiano G.O., Landriscina C. (1990). Biochim. Biophys. Acta, **1046**, 207 - 213.
19. Чеботарев Д.В., Коркушко О.В. (1977). Тер. архив, №2, 121-126.
20. Lakatta E.G. (1980) Fed. Proc., **39**, 314-317.
21. Docherty I.R. (1990) Pharmacol. Rev., **42**, 103-126.

Поступила 13.12.00

#### LIPID PEROXIDATION IN THE HEART OF ADULT AND OLD RATS DURING THE IMMOBILIZED STRESS

V.N. Shvets, V.V. Davydov.

State Medical University, 26 Mayakowsky av., Zaporozhye, 69035, Ukraine.  
fax: 0612-330125; tel.: (0612) 34-24-42;  
e-mail: dav@nord.vostok.net

Lipid peroxidation (LPO) in the heart of adult (10-12 month) and old (22-25 month) Wistar male rats was investigated during immobilized stress.

Immobilization of rats was accompanied by increasing the concentration of all studied LPO intermediates in the myocardium of both age groups. Accumulation of LPO products in old rat hearts was considerably higher than in adult ones. Dimethyl sulfoxide injection limited stress-induced stimulation of LPO. There were age related variations in efficiency of this antioxidant effect on the heart during immobilized stress.

**Key words:** lipid peroxidation, heart, aging, immobilization.