

УДК 615.272:616.45-001: 577.161.3
©Горден, Теплый

ОСОБЕННОСТИ ПОСТРЕССОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОЛ И СТРЕСС-ЛИМИТИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ α -ТОКОФЕРОЛА В ПЕЧЕНИ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

М.В. Горден, Д.Л. Теплый

Астраханский государственный университет. Естественный институт, кафедра анатомии и физиологии человека и животных, 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1; тел.: (8512) 22-93-47; факс: (8512) 25-17-18; эл. почта: tyam99@mail.ru

На модели эмоционально-болевого стресса у крыс разного возраста выявлены стрессорные изменения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени и плазме крови. Результаты исследований свидетельствуют о тканевых и возрастных различиях физиологического уровня ПОЛ у интактных крыс и его изменении у стрессированных животных. Предварительное введение витамина Е снимало накопление продуктов ПОЛ, особенно выраженное в печени.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, иммобилизационный стресс, возраст.

ВВЕДЕНИЕ. Продолжительное влияние стресса на организм приводит к морфофункциональным изменениям в органах и тканях, усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с накоплением токсичных продуктов пероксидации [1-6].

Важное значение в подавлении активации свободнорадикального окисления (СРО) и морфофункциональных повреждений при стрессе принадлежит антиоксидантным системам органов и тканей, относящимся к локальным стресс-лимитирующим системам и включающим ферментные и неферментные антиоксиданты [7-9].

Исходя из представлений об участии свободных радикалов в процессах старения, антиоксидантам в последнее время придают большое значение в стратегии воздействия на эти процессы и на связанные со старением заболевания [10-13].

В связи с этим изучение протекторных эффектов антиоксидантов и формирование резистентности организма к стрессиндуцирующим факторам продолжает оставаться актуальной проблемой.

Целью данной работы было изучение возрастных особенностей стресс-лимитирующих эффектов α -токоферола при действии на организм иммобилизационного стресса.

МЕТОДИКА. Эксперименты выполнены на 70 белых крысах-самцах линии Вистар, из которых молодые животные возрасте 3-4 месяца имели среднюю массу 220 г., а старые (25-27 месяцев) – 340 г. Определяли показатели ПОЛ: исходное содержание малонового диальдегида (МДА) в печени и плазме крови, а также скорости спонтанного и аскорбат-зависимого ПОЛ в печени.

Животные были разделены на 4 группы. Первая группа - контрольная. Крысы второй группы подвергались стрессорному воздействию. Животные третьей группы получали α -токоферол (α -ТФ), а четвертой α -ТФ на фоне действия иммобилизационного стресса.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛ ПРИ СТРЕССЕ

Животных подвергали иммобилизационному стрессу в узких пластиковых камерах, ограничивающих движение в течение двух часов (с 8-10 ч.) на протяжении шести дней. α -ТФ вводили *per os* в виде 10% масляного раствора D, L, α -токоферол ацетата в дозе 20 мг/кг массы животного в течении двух недель (одна неделя до стрессирования). По истечении двух недель животных декапитировали под эфирным наркозом. Доза α -токоферола выбрана на основании данных об оптимальном действии витамина Е как антиоксиданта при разовом введении не более 2 мг/100 г массы тела [11-15], лучшей абсорбции из кишечника в виде эмульсии [15] и максимальном уровне в тканях через 12 часов после перорального введения [16].

В плазме крови, полученной при декапитации, изучали состояние ПОЛ при помощи тест-наборов “Биоконт – ТБК” для определения концентраций ТБК-активных продуктов. Результаты выражали в микромолях МДА на литр плазмы (мкмоль/л). Экстинкцию проб измеряли на концентрационном фотоколориметре КФК-3 при длине волны $\lambda = 532$ нм. Содержание малонового диальдегида в гомогенатах печени определяли тиобарбитуровым методом [17]. Печень, как объект определения уровня свободнорадикального окисления (СРО), рекомендован в качестве субстрата в экспериментах с определением СРО [3, 18]. В настоящее время также существует мнение, что плазма крови обладает довольно высокой антиоксидантной активностью, обусловленной существованием различных низкомолекулярных или высокомолекулярных соединений, действие которых может носить ферментативный или неферментативный характер [19].

Исследовали фоновое содержание МДА, а также рассчитывали среднюю скорость его образования при спонтанном и аскорбат-зависимом ПОЛ. Концентрацию МДА выражали в нмоль/0,05 г сырого веса ткани, а кинетические характеристики ПОЛ в нмоль образовавшегося МДА в пробе за 1 час инкубации

С целью выявления динамики стресс-реакции определяли относительную массу надпочечников. О развитии стресса судили также по изменению количества эозинофильных гранулоцитов в крови [20]. Сравнение полученных значений проводили методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Из полученных результатов (табл. 1, 2) следует, что под действием иммобилизационного стресса наиболее выраженное изменение интенсивности процессов ПОЛ наблюдалось у старых крыс. Концентрация МДА в плазме крови старых крыс была выше, чем у молодых, что может быть следствием истощения антиоксидантной системы организма, характерного для поздних этапов постнатального онтогенеза [7, 8, 21]. Так, в плазме крови старых животных, подвергнутых иммобилизации, произошло достоверное повышение концентрации МДА ($p < 0,001$), в то время как у молодых животных величина уровня ПОЛ при действии стрессора не отличалась от контроля.

Таблица 1. Изменение уровня ПОЛ в плазме крови у молодых и старых крыс в условиях иммобилизационного стресса.

Группы	Молодые крысы	Старые крысы
	МДА плазмы крови (мкмоль/л)	МДА плазмы крови (мкмоль/л)
Контроль	0,82 ± 0,07	1,94 ± 0,08
стресс	0,82 ± 0,12	2,32 ± 0,03*
α -ТФ	0,58 ± 0,04*	1,23 ± 0,03*
α -ТФ + стресс.	0,72 ± 0,04	2,15 ± 0,06

Примечание. * - $p < 0,001$ в сравнении с контролем. Представлены средние значения \pm ошибка средней. В каждой группе было по 8-9 животных.

Таблица 2. Изменение уровня ПОЛ в печени у молодых и старых крыс в условиях иммобилизационного стресса.

Молодые крысы				
Группы	Количество животных	Исходный уровень МДА (нмоль/0,05 г сырого веса ткани)	Спонтанное ПОЛ (нмоль МДА/ч)	Аскорбат-зависимое ПОЛ (нмоль МДА/ч)
Контроль	9	1,12± 0,14	12,25±1,4	42,3±3,97
Стресс	8	1,02±0,19	10,13±1,42	39,74±2,7
α-ТФ	9	0,38 ±0,1*	3,86± 1,02*	7,5±0,82*
α-ТФ + стресс	8	0,86±0,077	5,3±1,13*	9,05±1,38*
Старые крысы				
Группы	Количество животных	Исходный уровень МДА (нмоль/0,05 г сырого веса ткани)	Спонтанное ПОЛ (нмоль МДА/ч)	Аскорбат-зависимое ПОЛ (нмоль МДА/ч)
Контроль	9	0,59 ± 0,09Δ	11,63±0,57	23,95±0,50
Стресс	9	1,05 ±0,06*	12,53±0,012	26,74±0,70*
α-ТФ	9	0,19 ±0,05*	2,38± 0,31*	17,70±1,08*
α-ТФ + стресс	9	0,68 ±0,08	7,18±0,94*	11,95±0,87*

Примечание. * - $p < 0,001$ - в сравнении с контролем. Δ - $p < 0,01$ - в сравнении с контролем молодых крыс.

Введение α-ТФ интактным животным обеих возрастных групп способствовало снижению свободнорадикальных процессов: обнаружено достоверное ($p < 0,001$) снижение накопления ТБК-активных продуктов в плазме крови (табл. 1). Однако, на фоне действия иммобилизационного стресса α-ТФ не вызвал изменения интенсивности ПОЛ в плазме крови разновозрастных животных.

Следует отметить, что исходное содержание МДА в печени молодых крыс выше, чем у старых ($p < 0,01$). Под действием стресса в ткани печени старых крыс происходило достоверное ($p < 0,001$) возрастание аскорбат-зависимого ПОЛ. Достоверное ($p < 0,001$) повышение исходного уровня МДА у старых особей в сравнении с контролем имело ту же направленность. Выявлено, что при стрессировании у старых крыс концентрация МДА увеличилась на 78% ($p < 0,001$), а скорость аскорбат-зависимого ПОЛ - на 12%, по сравнению с исходными значениями (табл. 2). Причиной этого может быть возрастное снижение активности антиокислительной системы.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛ ПРИ СТРЕССЕ

У молодых крыс статистически значимых изменений интенсивности аскорбат-зависимого ПОЛ и фонового накопления продуктов ПОЛ под действием стресса не наблюдалось.

Введение витамина Е вызывало достоверное снижение по кинетическим показателям уровня ПОЛ в печени крыс обоего возраста как в сравнении с контрольной ($p < 0,001$), так и со стрессированной группой ($p < 0,001$). На модели эмоционально-болевого стресса показан выраженный протекторный эффект витамина Е: под влиянием предварительно введенного α -ТФ скорость индуцированного ПОЛ в печени снижалась в 4,4 раза по сравнению с иммобилизацией ($p < 0,001$) у молодых крыс и в 2,2 раза – у старых животных ($p < 0,001$). По сравнению с контролем у молодых крыс происходило снижение аскорбат-зависимого ПОЛ в 4,7 раза ($p < 0,001$), а у старых крыс в 2 раза ($p < 0,001$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют как о существенном изменении с возрастом активности свободнорадикальных процессов, так и органных особенностях их динамики.

Под действием стресса в исследуемых группах животных выявлены возрастные изменения относительной массы надпочечников. У старых животных, в отличие от молодых, стресс вызвал достоверное ($p < 0,05$) увеличение относительной массы надпочечников на 23%, по сравнению с контрольной группой животных.

Под влиянием α -ТФ у старых животных происходило достоверное ($p < 0,01$) понижение относительной массы надпочечников на 24% по сравнению с контрольной группой животных, а у молодых крыс существенных изменений не наблюдалось (табл. 3).

Таблица 3. Изменение количества эозинофильных гранулоцитов и массы надпочечников после иммобилизационного стресса.

Группы животных	n	Количество эозинофильных гранулоцитов в 1 мм ³ крови	Относительная масса надпочечников, мг/г
Молодые крысы			
Контроль	9	365±7,8	0,076±0,004
стресс	8	353±4,2	0,074±0,004
α -токоферол 20 мг/кг	9	347,5±9,01	0,073±0,004
α -токоферол 20 мг/кг + стресс.	8	358,6±8,0	0,064±0,003**
Старые крысы			
Контроль	9	432±17,5	0,078±0,005
стресс	9	309±11,9***	0,096±0,008*
α -токоферол 20 мг/кг	9	410±12,5	0,059±0,006**
α -токоферол 20 мг/кг + стресс.	9	377±18,6**	0,065±0,006

Примечание. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ в сравнении с контрольными значениями.

Предварительное введение α -ТФ старым крысам на фоне стрессорного воздействия привело к достоверному ($p < 0,001$) снижению на 33% относительной массы надпочечников по сравнению с группой стрессируемых животных, не получавших α -ТФ, и вызвало выраженную тенденцию к снижению веса надпочечников, по сравнению с контролем.

У молодых животных предварительное введение α -ТФ на фоне стрессорного воздействия привело к достоверному ($p < 0,01$) понижению на 16% относительной массы надпочечников по сравнению с контролем, однако в сравнении со стрессируемой группой животных существенных изменений не произошло (табл. 3).

Таким образом, при стрессорном воздействии гипертрофия надпочечников происходит только у старых животных, что указывает на более выраженную устойчивость к стрессу молодых животных.

Возрастные особенности реакции молодых и старых животных на стресс проявляются и в изменении количества эозинофилов крови. Так, иммобилизация старых крыс привела к достоверному ($p < 0,001$) снижению числа эозинофилов на 29% по сравнению с контролем. У молодых крыс значительных изменений не обнаружено. Несмотря на то, что введение α -ТФ не вызывало значимых изменений количества эозинофилов у крыс обеих возрастных групп, предварительное введение α -ТФ на фоне стресса сопровождалось тенденцией к нормализации числа эозинофилов в сравнении со стрессируемой группой животных (табл. 3).

Полученные нами данные свидетельствуют о тканевых и возрастных различиях физиологического уровня ПОЛ у интактных крыс и его изменении у стрессированных животных. Активация ПОЛ в печени и крови старых крыс на фоне стрессорного воздействия и неизменный уровень процессов ПОЛ у молодых животных, указывают на более выраженную устойчивость к стрессу молодых животных [6]. Подавление интенсивности процессов ПОЛ на фоне предварительного введения витамина Е и в ходе его сочетания с экстремальным воздействием, указывает на его протекторное действие, выраженное в печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Горизонтов П.Д.* (1983) Стресс и система крови, Медицина, М.
2. *Микаелян Э.М., Мхитарян В.Г.* (1985) Биол. журн. Армении, **38**(5), 393-399.
3. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, Наука, М.
4. *Девяткина Т.А., Тарасенко Л.М., Коваленко Э.Г.* (1989) Вопр. мед. химии, **35**, 45-49.
5. *Пшенникова М.Г.* (2000) Патол. физиол. exper. тер., №4, 20-29.
6. *Барабой В.А.* (1991) Усп. совр. биол., **111**, 923-931.
7. *Плецитый К.Д., Давыдова Т.В., Фомина В.Г.* (1988) Патол. физиол. exper. тер., №1, 38-40
8. *Сейфула Р.Д., Борисова Н.Г.* (1990) Фармакол. и токсикол., **53**(6), 3-10.
9. *Меерсон Ф.З., Сухих Г.Т., Плещитый К.Д.* (1985) Бюлл. exper. биол. мед, №6, 646-647
10. *Угрюмов М.В.* (1989) Нейроэндокринная регуляция в онтогенезе. Наука, М.
11. *Rikans L.E., et al.* (1997) Biochim. Biophys. Acta, **1362**, 116-127.
12. *Harman D.* (1994) Ann. N.Y. Acad. Sci., **717**, 1-15.
13. *Cutler R.* (1991) Ann. N.Y. Acad. Sci., **621**, 1-28.
14. *Martin A., Janigian D., Shukitt-Hale B., Prior R.L et. al.* (1999) Brain. Res., **825**, 50-59.
15. *Kelliher S., Davies T., Smith C. et.al.* (1972) J. Vitam. Nutr. Res., **42**, 394-402.
16. *Carpenter M.P.* (1971) Biochem. Biophys. Acta, **231**, 52-79.
17. *Стальная И.Д., Гаршвили Т.Г.* (1977) Современные методы в биохимии. - Медицина, М.; с. 66-68.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛ ПРИ СТРЕССЕ

18. *Xu H., Watkins., Seifert M.F., Burgess J.P.* (1995) *FASEB J.*, **9**, 273-276.
19. *Halliwell B., Gutteridge M.C.* (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, 1-8.
20. *Теплый Д.Л.* (1990) *Цитология*, **32**, 12, 1161-1167.
21. *Газиев А.И., Усманова Т.Е., Подлуцкий А.Я., Никонова Л.В., Безлепкин В.Г., Сирота Н.П.* (1997) *Усп. геронтол.*, № 1, 80-84.

Поступила: 17. 09. 2003

SPECULIARITIES OF POST-STRESS CHANGES OF LIPID PEROXIDATION AND STRESS-LIMITED EFFECTS OF α -TOCOPHEROL IN LIVER AND BLOOD SERUM OF INFANT AND OLD RATS

M.V. Gorden, D.L. Teply

Astrakhan State University, Department of anatomy and physiology of man and animals.
Astrakhan, pl. Shaumyana, 1, 414000 Russia; tel.: (8512) 22-93-47; fax: (8512) 25-17-18;
e-mail: tyam99@mail.ru

The process of lipid peroxidation (LPO) and the effects of α -tocopherol were studied in the liver and blood serum of albino male rats under acute immobilization stress. The results of the research show tissue and age specific responses of LPO in the intact and stressed animals. Pretreatment of animals with α -tocopherol decreased accumulation of LPO products especially in the liver.

Key words: lipid peroxidation, immobilization stress, age, malondialdehyde.