

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА

На модели острого эмоционально-болевого стресса (электрокожное раздражение) изучена стресс-чувствительность легочной ткани в отношении перекисного окисления липидов у экспериментальных животных разных возрастных групп (неполовозрелые 6-недельные, половозрелые 6-месячные и старые 25-месячные). Выявлены органоспецифические и возрастные особенности стресс-индуцированного свободнорадикального окисления липидов. Показано, что на раннем этапе постнатального онтогенеза легкие обладают большей стресс-устойчивостью к перекисному окислению липидов, значительная активация которого в стрессированной печени имеет место у животных всех возрастных групп.

Проблема стресса и его реализации на уровне отдельных органов по-прежнему остается актуальной для современной физиологии и медицины. Общеизвестно, что ключевым звеном в патогенезе стрессорного повреждения органов и тканей является интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4, 5, 7]. В то же время остаются малоизученными органоспецифические особенности свободнорадикальных реакций, и в частности стресс-реактивность легочной ткани в отношении ПОЛ. Есть все основания полагать, что ПОЛ и его регуляция должны иметь особое значение для респираторной системы, что связано с большой интенсивностью липидного обмена в легких и тесной зависимостью функций аэрогематического барьера от структуры альвеолярных фосфолипидов [3, 6, 18, 20]. Кроме того, легочную ткань из-за многочисленных альвеол и капиллярно-альвеолярных контактов рассматривают как одну из наиболее обширных биологических «мембран» в организме, внешняя поверхность которой постоянно и непосредственно контактирует с кислородом и другими инициаторами ПОЛ [12].

Исследование состава липидов органов и тканей в процессе развития является одной из актуальных задач, принимая во внимание значимость липидных нарушений в патогенезе большого числа заболеваний, в том числе легочной системы. Однако работы, посвященные исследованию возрастной динамики процессов ПОЛ в организме, единичны, и практически отсутствуют данные об онтогенетических особенностях стресс-чувствительности легких к свободнорадикальному окислению липидов.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было изучение в эксперименте уровня перекисного окисления липидов в легочной ткани и, для сравнения, в печени в условиях острого стрессорного воздействия у животных разного возраста.

Материал и методы исследования

Опыты поставлены на 52 крысах-самцах линии Вистар трех возрастов: неполовозрелых 6-не-

дельных средней массой 84 г (1-я группа), половозрелых 6-месячных средней массой 204 г (2-я группа) и старых 25-месячного возраста средней массой 360 г (3-я группа). Показатели ПОЛ изучались на модели эмоционально-болевого стресса, вызванного электрокожным раздражением (ЭКР) [2]. Животных помещали в камеру с решетчатым металлическим полом куда подавали электрический ток напряжением 30 В в течение 30 мин с интервалами в 30 секунд. Сразу после воздействия животных забивали под нембуталовым наркозом (в дозе 5 мг/100 г массы тела внутривенно). Контролем служили интактные крысы. Для подтверждения развития стресса изучали показатели стресс-реактивности животных – эозинопеническая проба, содержание адреналина в крови и относительная масса надпочечников (по отношению к массе тела). Количество эозинофильных гранулоцитов в крови определяли после их окрашивания жидкостью Дунгера с последующим подсчетом в камере Горяева [17]. Количество адреналина в крови, забираемой после декапитации, определяли по методу [22] с применением реактива Фолина.

Критериями оценки уровня перекисного окисления липидов в легочной ткани и печени были содержание в гомогенатах тканей промежуточного и конечного продуктов ПОЛ, а также скорость спонтанного и индуцированного аскорбатзависимого ПОЛ. Гидроперекиси липидов (ГПЛ) определяли родановым методом, основанным на получении розовой окраски при взаимодействии ГПЛ с роданистым аммонием в присутствии этанола и соляной кислоты с последующим колориметрическим измерением при $\lambda=480$ [19]. Определение малонового диальдегида (МДА) и кинетических характеристик процесса ПОЛ проводили тиобарбитуровым методом, основанным на взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного в розовый цвет триметинового комплекса, имеющего максимум поглощения при $\lambda=532$ [19]. При этом пробы инкубировали при 37°C в присутствии ионов железа и аскорбата, для

чего использовали $4 \cdot 10^{-5}$ М раствор соли Мора и 2,6 мМ раствор аскорбиновой кислоты. Концентрацию ГПЛ выражали в ед/0,05 г, МДА – в нмоль/0,05 г сырого веса тканей, скорость спонтанного (Сп.ПОЛ) и индуцированного (Аз.ПОЛ) окисления – в нмоль образовавшегося МДА в пробе за час инкубации. Данные обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

По эозинопеническому критерию воздействие электрическим током оказалось стресс-реализующим у неполовозрелых и половозрелых 6-месячных крыс, что выражалось в снижении числа эозинофилов в крови соответственно на 41% ($p < 0,001$) и 16% ($p < 0,02$) по сравнению с контролем. Достоверного изменения этого показателя у старых крыс не выявлено. Анализ крови на содержание адреналина выявил его увеличение после ЭКР – на 34,8% ($p < 0,05$) у 6-месячных, 16,6% ($p < 0,001$) у 25-месячных и 5,9% ($p < 0,05$) у 6-недельных крыс. При этом исходный уровень катехоламина в крови крысят был значительно выше, чем у взрослых животных ($p < 0,001$). Достоверных изменений относительной массы надпочечников выявить не удалось, хотя тенденция к ее увеличению наблюдалась у 2-й и 3-й возрастной группы животных.

Однократное 30-минутное электрораздражение отразилось на интенсивности ПОЛ в легочной ткани 2-й группы животных. Это подтверждалось соответствующими изменениями всех изучаемых параметров. Так, после ЭКР содержание в легких ГПЛ увеличилось по сравнению с контролем в 7 раз, МДА – в 2 раза. Скорость спонтанного ПОЛ повысилась на фоне стресса почти в 2 раза, а индуцированного аскорбатзависимого –

более чем в 3 раза (табл. 1). У старых крыс (3-я группа) острый стресс сопровождался выраженным накоплением в легочной ткани промежуточного продукта перекисного окисления – ГПЛ, их содержание после стресса увеличилось на 68,8% ($p < 0,01$). Обращает на себя внимание значительно высокий исходный уровень ГПЛ в легких старых крыс, более чем в 6 раз превышающий таковой у крысят ($p < 0,001$) и 6-месячных ($p < 0,001$). Достоверных изменений в содержании МДА и кинетических характеристик ПОЛ у животных этой группы не выявлено, хотя скорость спонтанного и аскорбатзависимого окисления тенденциозно возрастала на 19,4% и 15,2% соответственно. При этом стрессорных изменений этих показателей в легких неполовозрелых крыс выявить не удалось (таблица 1).

В ходе эксперимента обнаружена значительная стресс-индуцированная активация ПОЛ в печени животных. У крыс 2-й возрастной группы содержание МДА в печеночной ткани после ЭКР повышалось с $3,17 \pm 0,40$ до $5,10 \pm 0,38$ нмоль/0,05 г ($p < 0,01$), скорость Сп.ПОЛ – с $15,0 \pm 2,46$ до $37,35 \pm 4,95$ ($p < 0,001$), а Аз.ПОЛ – с $36,84 \pm 7,1$ до $74,4 \pm 8,43$ нмоль МДА/ч ($p < 0,01$). У старых животных эти параметры повышались на фоне стресса соответственно на 58,4% ($p < 0,01$), 104% ($p < 0,01$) и 80,6% ($p < 0,001$). Печень крысят, в отличие от их легких, как и у взрослых животных, ответила на стресс значительным усилением скорости процессов ПОЛ. Концентрация МДА и скорость ее спонтанного нарастания после ЭКР у молодых животных были такими же, как у половозрелых крыс, повышаясь соответственно на 38% ($p < 0,01$) и 92,7% ($p < 0,001$). Скорость индуцированного аскорбатзависимого ПОЛ увеличивалась на 45,8% ($p > 0,05$). При этом как исходные, так и стрессорные значе-

Таблица 1. Показатели перекисного окисления липидов в легочной ткани в условиях острого эмоционально-болевого стресса у крыс разных возрастных групп ($M \pm m$)

Показатели	Неполовозрелые		Половозрелые		Старые	
	Контроль	Стресс	Контроль	Стресс	Контроль	Стресс
ГПЛ, ед/0,05 г	$0,043 \pm 0,013$	$0,095 \pm 0,029$	$0,048 \pm 0,017$	$0,348 \pm 0,067$	$0,308 \pm 0,040$	$0,52 \pm 0,038$
p	$>0,05$		$<0,001$		$<0,01$	
МДА, нмоль/0,05 г	$2,02 \pm 0,30$	$3,44 \pm 1,06$	$1,46 \pm 0,22$	$2,74 \pm 0,50$	$1,35 \pm 0,19$	$1,22 \pm 0,12$
p	$>0,05$		$<0,05$		$>0,5$	
Сп.ПОЛ, нмоль МДА/ч	$8,35 \pm 1,26$	$6,60 \pm 0,92$	$8,39 \pm 1,21$	$15,79 \pm 1,33$	$5,82 \pm 0,54$	$6,95 \pm 0,89$
p	$>0,05$		$<0,01$		$>0,05$	
Аз.ПОЛ, нмоль МДА/ч	$13,0 \pm 4,57$	$19,4 \pm 4,09$	$7,88 \pm 1,10$	$25,72 \pm 6,70$	$6,63 \pm 0,92$	$7,64 \pm 1,12$
p	$>0,05$		$<0,05$		$>0,05$	

Примечание: p дано в сравнении с контролем.

ния этих показателей в печени в 2-5 раз превышали таковые в легочной ткани.

Таким образом, острый стресс эмоционально-болевого модальности вызывает значительное усиление перекисного окисления липидов в ткани легких только взрослых крыс, причем более выраженное у животных 6-месячного возраста.

Литературные данные дают основание считать, что активация свободнорадикального окисления и нарушение соотношения в системе перекисное окисление/антиоксиданты имеют важное значение в обеспечении адаптационных реакций на повреждающие воздействия окружающей среды [8, 10, 11]. Показано, что именно в острую фазу адаптации интенсифицируются процессы ПОЛ и происходят изменения в активности антиоксидантов – угнетение активности супероксиддисмутазы, неоднозначная направленность и индивидуальные различия в каталазной активности [23]. И только с увеличением сроков адаптации отмечается мобилизация этих ферментов, направленная на поддержание сбалансированности между интенсивностью генерации продуктов ПОЛ и активностью антиоксидантной системы (АОС) организма. Обнаружено также нарушение соотношения активности про- и антиоксидантных систем сердца в процессе развития экспериментального стресса у крыс [9]. Авторы полагают, что стресс реализует свое действие на липидный обмен путем активации выброса катехоламинов, которые увеличивают содержание в тканях цАМФ, что в свою очередь ведет к повышению активности липаз, проявлению разрушающего действия на мембраны лизофосфолипидов и активацию ПОЛ.

Можно полагать, что интенсификация перекисного окисления липидов в легких при остром электрокожном раздражении приводит к возникновению относительной недостаточности функции внутриорганной антиоксидантной системы.

По наблюдениям некоторых авторов, процессы перекисного окисления липидов имеют возрастные особенности. Так, показано, что у старых крыс существенно снижена по сравнению с молодыми активность супероксиддисмутазы в мозге, тогда как уровень диеновых конъюгатов и ПОЛ не изменяются. Не изменяется с возрастом в мозге и антиокислительная активность (АОА). В печени старых животных отмечено увеличение концентрации шиффовых оснований и продуктов перекисного окисления белков и значительное снижение активности супероксиддисмутазы, при этом уровень диеновых конъюгатов и общая АОА в печени с возрастом не изменяются. В сыворот-

ке крови с возрастом увеличивается содержание продуктов ПОЛ и перекисного окисления белков [1]. Обнаружено также, что эмоционально-болевым стресс приводит к активации спонтанного и индуцированного ПОЛ в микросомах печени, более выраженной у взрослых животных по сравнению со старыми крысами [14]. Эти данные свидетельствуют как о существенном изменении с возрастом активности свободнорадикальных процессов в организме животных, так и об органических особенностях их динамики.

Проведенный нами анализ стресс-реактивности легких на модели острого эмоционально-болевого воздействия показал ареактивность неполовозрелых, 6-недельных крыс в отношении ПОЛ. Правильнее будет определить это как недостаточную зрелость реактивности к действующему фактору на данном этапе онтогенеза, что, несомненно, связано с возрастными особенностями нейро-гормонально-метаболических механизмов регуляции.

Важное значение в адаптации организма к условиям окружающей среды имеет гипоталамо-гипофизарно-адренортикарная система (ГТАКС). Ее адекватная реакция на действие экстремальных факторов обеспечивает повышение общей резистентности организма и возможна лишь благодаря слаженному взаимодействию всех звеньев системы, которое в свою очередь зависит от их функциональной зрелости [13]. Главной причиной активации свободнорадикального окисления при стрессе считают выброс катехоламинов. Их введение животному активирует ПОЛ, ингибирует активность супероксиддисмутазы и повреждает клеточные мембраны. Полагают, что активация ПОЛ и повреждение, например, кардиомиоцитов катехоламинами реализуется через гиперстимуляцию β -адренорецепторов и через образование активной формы кислорода при аутоокислении адреналина [10, 16].

По нашему мнению, ареактивность легких неполовозрелых животных в отношении ПОЛ при однократном стрессорном воздействии может быть связана с незрелостью различных звеньев ГТАКС, в частности с недостаточным выбросом катехоламинов, связанным с быстрым истощением их запасов в надпочечниках и низким уровнем их синтеза во время стресс-реакции. В пользу этого указывают и наши данные о намного меньшем по сравнению со взрослыми крысами стрессорном уровне адреналина в крови крысят. Также важное значение имеет и недостаточная реактивность органов-мишеней на более ранних этапах онтогене-

за. Известно, что количество рецепторов и их чувствительность к стресс-реализующим гормональным факторам в периферических органах и тканях гораздо ниже в раннем возрасте [21]. Низкая концентрация адренорецепторов на постсинаптических мембранах в органах, с одной стороны, и не до конца сформированная система внутриклеточных посредников и их метаболизма, с другой, может

обуславливать отсутствие стрессорного ответа на органном уровне у неполовозрелых животных. Наконец, определенную роль может играть более высокий антиоксидантный статус организма неполовозрелых крыс в сравнении со взрослыми. Последнее имеет особое значение в обеспечении резистентности легких к действию экстремальных, стресс-индуцирующих факторов.

Список использованной литературы:

1. Анисимов В.Н., Арутюнян А.В., Опарина Т.И. Возрастные изменения активности свободнорадикальных процессов в тканях и сыворотке крови крыс // Физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 1999. – Т. 85, №4. – С. 502-507.
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991.
3. Верболович В.П., Петренко Е.П., Подгорный Ю.К. Свободнорадикальные реакции сурфактантов легкого и ферментативные антиоксиданты // Сурфактанты легкого в норме и патологии. – Киев: Наука думка, 1983. – С. 98-109.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972.
5. Владимиров Ю.А. Роль нарушения свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1989, №4. – С. 7-18.
6. Дубилей П.В., Уразаева З.В., Хамитов Х.С. Барьерная функция легких и обеспечение гомеостаза. – Казань: Из-во Казанского унта, 1987.
7. Журавлев А.И. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. – М.: Наука, 1982.
8. Козлов Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов в биомембранах в норме и патологии // Биоантиокислители. – М., 1975. – Т. 1. – С. 5-14.
9. Маркова Е.А., Мисула И.Р. Изменения активности перекисного окисления липидов в миокарде взрослых и старых крыс при стрессе // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1994, №3. – С. 37-38.
10. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984.
11. Меерсон Ф.З., Пшеничкова М.Г. Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина, 1988.
12. Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. М.: Наука, 1998.
13. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Шалапина В.Г. «Критические периоды» постнатального онтогенеза в формировании активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы // Тез. докл. V Всеросс. конф. «Нейроэндокринология-2000». – С.-Петербург, 2000. – С. 99-100.
14. Парамонтова Г.И., Губский Ю.Н., Горюшко А.Г. и др. Влияние стресса на перекисное окисление липидов и физико-химическое состояние мембран эндоплазматического ретикула печени взрослых и старых крыс // Украинский биохим. журнал. – 1996. – т. 68, №5. – С. 47-53.
15. Петрина С.Н., Юшина Л.В. Роль липидов в адаптационных реакциях организма на экстремальные воздействия // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1989, №3. – С. 51-55.
16. Петрович Ю.А., Гуткин Д.В. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1986, №5. – С. 85-92.
17. Ронин В.С., Старобинец Г.М. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований. – М.: Высшая школа, 1989.
18. Симбирцев С.А., Беляков Н.А., Ливчак М.Я. Изолированное легкое. – Л.: Медицина, 1983.
19. Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1986.
20. Сыромятникова Н.В., Гончарова В.А., Котенко Т.В. Метаболическая активность легких. – Л.: Медицина, 1987.
21. Угрюмов М.В. Нейроэндокринная регуляция в онтогенезе. – М.: Наука, 1989.
22. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. – М.: Просвещение, 1975.
23. Шаназаров А.С., Махновский В.П. Значение реакций перекисного окисления липидов в изменении устойчивости организма к гипоксии // Известия АН КиргССР. Хим.-технол. и биол. науки. – 1987, №1. – С. 85-89.