

ОСОБЕННОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА

Деев Р.В., Телешева И.Б., Зворыгин И.А., Байбурина Г.А., Аглетдинов Э.Ф., Галиуллина И.Г.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Челябинск, Россия (454092 г. Челябинск ул.Воровского, 64), e-mail: sinitskiyai@yandex.ru

Посттравматическое стрессовое расстройство сопровождается чрезвычайно высокой частотой сопутствующих заболеваний, среди которых наиболее распространенными считаются ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, нарушения мозгового кровообращения, а также патология печени. Учитывая важнейшую роль печени в жизнеобеспечении организма, постстрессорные нарушения функций органа могут быть как основным проявлением соматической патологии, так и усугублять тяжесть других сопутствующих заболеваний. Главными факторами, ведущими к формированию соматической патологии при посттравматическом стрессовом расстройстве, в настоящее время считаются изменения нейроэндокринного статуса, неизбежно сопровождающиеся активацией свободнорадикального окисления. Поэтому изучение окислительного стресса как фактора, вовлеченного в патогенез различных нервно-психических заболеваний и их осложнений – одна из наиболее актуальных проблем медицинской биохимии. Исследование выполнено на 40 белых беспородных лабораторных крысах. На различных сроках экспериментального моделирования посттравматического стрессового расстройства исследовано содержание основных категорий продуктов свободнорадикального окисления в печени. Показано, что основным проявлением окислительного стресса в печени является усиление окислительной модификации белков в органе, что может быть причиной его постстрессорной дисфункции.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство, печень, свободнорадикальное окисление.

FEATURES OF FREE-RADICAL OXIDATION IN THE LIVER IN EXPERIMENTAL MODELING OF PTSD

Deev R.V., Telesheva I.B., Zvorygin I.A., Bayburina G.A., Agletdinov E.F., Galiullina I.G.

South Ural state medical university (454092 Chelyabinsk, Vorovskogo st., 64), e-mail: sinitskiyai@yandex.ru

Posttraumatic stress disorder accompanied by an extremely high frequency of comorbidities, include coronary heart disease, hypertension, stroke, and liver disease. Given the crucial role of the liver in the livelihood of the body, liver dysfunction may be the main manifestation of somatic pathology and exacerbate the severity of other comorbidities. The main factors leading to the formation of somatic pathology in posttraumatic stress disorder, is now considered a endocrine status changes, inevitably accompanied by the activation of free radical oxidation. Therefore, the study of oxidative stress as factors involved in the pathogenesis of various neuropsychiatric diseases and their complications - one of the most urgent problems of medical biochemistry. The study was performed on 40 albino laboratory rats. At different periods of experimental modeling of PTSD studied the content of the main categories of products of free radical oxidation in the liver. It is shown that the main manifestation of oxidative stress in the liver is increased oxidative modification of proteins in the body, which may cause its dysfunction.

Keywords: Posttraumatic stress disorder, liver, free radical oxidation.

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) - тяжёлое психическое состояние, которое возникает в результате единичной или повторяющихся психотравмирующих ситуаций (например, тяжёлая физическая травма, либо угроза смерти, сексуальная агрессия), сопровождающееся психопатологическими реперевиваниями, избеганием либо выпадением памяти о травмирующих событиях и высоким уровнем тревожности, который сохраняется на протяжении более месяца после психологической

травмы [3]. В современном мире, с учетом происходящих последние десятилетия террористических актов, природных и техногенных катастроф, повышения плотности населения, роста безработицы, преступности и т.д., проблема ПТСР, приобретает особую значимость. Особенно важно, что эти расстройства сопровождаются чрезвычайно высокой частотой сопутствующих заболеваний, среди которых наиболее распространенными считаются ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, нарушения мозгового кровообращения, а также патология печени [7].

Общеизвестно, что печень характеризуется высокой чувствительностью к стрессорным воздействиям различной природы. Учитывая важнейшую роль этого органа в жизнеобеспечении организма, постстрессорные нарушения функций печени могут быть как основным проявлением соматической патологии, так и усугублять тяжесть других сопутствующих заболеваний [9].

Главными факторами, ведущими к формированию соматической патологии при ПТСР, в настоящее время считаются изменения нейроэндокринного статуса, неизбежно сопровождающиеся активацией свободнорадикального окисления (СРО). Поэтому изучение окислительного стресса как фактора, вовлеченного в патогенез различных нервно-психических заболеваний и их осложнений – одна из наиболее актуальных проблем медицинской биохимии. Между тем, к настоящему моменту основные проявления окислительного стресса в печени при ПТСР до сих пор не изучены.

Цель исследования: характеристика основных проявлений окислительного стресса в печени при экспериментальном моделировании ПТСР.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 40 белых беспородных лабораторных крысах. Посттравматические стрессовые расстройства моделировали путем содержания животных в условиях длительного постоянного и неизбежного воздействия сильного безусловного раздражителя [5]. Контрольную группу составили интактные животные, не подвергавшиеся стрессорным воздействиям (n=16). Для оценки динамики формирования окислительного стресса сформировано три опытных группы. Продолжительность воздействия для всех групп составляла 10 суток. Первая опытная группа после завершения воздействия стрессора содержалась в обычных условиях в течение 3 суток (n=8), вторая - 10 суток (n=8), третья - 14 суток (n=8).

В гомогенатах печени определяли содержание первичных, вторичных и конечных молекулярных продуктов ПОЛ, а также уровень спонтанной и металл - катализируемой окислительной модификации белков (ОМБ) [1,2]. Все исследования были проведены

одномоментно. Поведенческие реакции животных изучались с использованием теста «приподнятый крестообразный лабиринт» [4].

Результаты обработаны методами вариационной статистики и выражены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Оценка статистической значимости различий осуществлялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистические взаимосвязи изучали при помощи непараметрического корреляционного анализа, выполняя расчёт коэффициентов корреляции рангов по Спирмену (R_s). Статистические различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования представлены в таблице. На третьи сутки после завершения стрессорного воздействия было выявлено одновременное усиление липопероксидации и ОМБ в печени. При этом, наиболее выраженным был прирост содержания вторичных гептан- и изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ (кетодиены и сопряженные триены), а также уровня карбонилированных белков. Это происходило на фоне уменьшения содержания изопропанол-растворимых диеновых конъюгатов в ответ на индукцию ПОЛ *in vitro*. Известно, что мощность антиоксидантной защиты клетки определяется уровнем окисляемости, отражающим «экранирование» ненасыщенных связей в липидах [2]. Поэтому факт ограничения Fe^{+2} /аскорбат - индуцированного ПОЛ в данном случае можно трактовать как снижение эффективности антиоксидантных систем.

В ходе ряда патологических состояний окислительный стресс сочетается с карбонильным, возникающим в результате увеличения концентрации активных соединений, содержащих альдегидные и карбонильные группы. Активными карбонильными соединениями являются вторичные продукты ПОЛ, возникающие при перекисном окислении липидов. Карбонильные продукты образуются также при свободнорадикальном окислении белков [8]. Вышеперечисленные соединения модифицируют аминокислотные остатки белков и азотистые основания нуклеиновых кислот, меняя свойства этих важнейших биомолекул. Карбонильный стресс в настоящее время считается наиболее тяжелым проявлением оксидативного стресса, приводящим к инициации воспаления, аутоиммунных повреждений, гибели клетки (апоптоз или некроз) [6].

Изменения содержания продуктов свободнорадикального окисления в гомогенатах печени крыс на различных сроках экспериментального моделирования ПТСП

Показатель	Контроль (n=16)	3 суток после завершения воздействия (n=8)	10 суток после завершения воздействия (n=8)	14 суток после завершения воздействия (ПТСП)
------------	--------------------	--	---	--

				(n=8)
Диеновые конъюгаты (гептановая фаза)	0,979±0,008	0,839±0,033 *	0,971±0,006	1,015±0,005 *
Кетодиены и сопряжённые триены (гептановая фаза)	0,211±0,018	0,361±0,044 *	0,243±0,037	0,207±0,022
Шиффовы основания (гептановая фаза)	0,020±0,002	0,011±0,001 *	0,025±0,002	0,028±0,002 *
Диеновые конъюгаты (изопропанольная фаза)	0,386±0,027	0,485±0,013 *	0,331±0,029	0,257±0,013 *
Кетодиены и сопряжённые триены (изопропанольная фаза)	0,176±0,012	0,233±0,008 *	0,153±0,019	0,160±0,007
Диеновые конъюгаты (изопропанольная фаза, индукция Fe ²⁺ / аскорбат)	2,822±0,220	2,031±0,049 *	3,197±0,246	4,135±0,245 *
Кетодиены и сопряжённые триены (изопропанольная фаза, индукция Fe ²⁺ / аскорбат)	4,970±0,544	4,269±0,265	5,888±1,085	5,575±0,374
Карбонилированные белки, мкмоль/ г белка (индукция Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	7,547±1,205	24,510±6,257 *	6,909±1,007	11,09±4,850
Карбонилированные белки, мкмоль/ г белка (индукция Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	56,647±2,020	55,299±4,791	47,569±2,059 *	56,922±3,753
* - статистически значимые отличия от контрольной группы; е.о.и. – единицы окислительного индекса				

Отличительной особенностью окислительного стресса в печени через 10 суток после завершения стрессорных воздействий было полное восстановление до уровней контрольных значений, как процессов ПОЛ, так и окислительной модификации белков.

Через 14 суток после завершения воздействия стрессора выявлено увеличение содержания гептан-растворимых продуктов ПОЛ при одновременном снижении содержания изопропанол-растворимых продуктов. В данном случае не исключено усиление активности фосфолипазы A₂, которая, осуществляя гидролиз мембранных фосфолипидов, фактически уменьшает количество полярных субстратов (изопропанол - растворимые фосфолипиды) для перекисления, увеличивая при этом содержание неполярных (гептан-растворимых) субстратов – свободных жирных кислот.

Это происходило на фоне увеличения содержания изопропанол-растворимых первичных продуктов ПОЛ в ответ на индукцию (Fe²⁺/ аскорбат), что свидетельствует о

возрастании эффективности липофильных антиоксидантов. Тем не менее, изменения подобного рода следует интерпретировать как достаточно выраженный окислительный стресс. Следует обратить внимание на очевидную тенденцию к повторному усилению карбонилирования белков при одновременном статистически значимом увеличении содержания шиффовых оснований.

Нейроэтологическое тестирование животных через 14 суток после завершения стрессорных воздействий выявило усиление интенсивности груминга, снижение времени, проведённого в центре крестообразного лабиринта, угнетение двигательной активности (рис.).

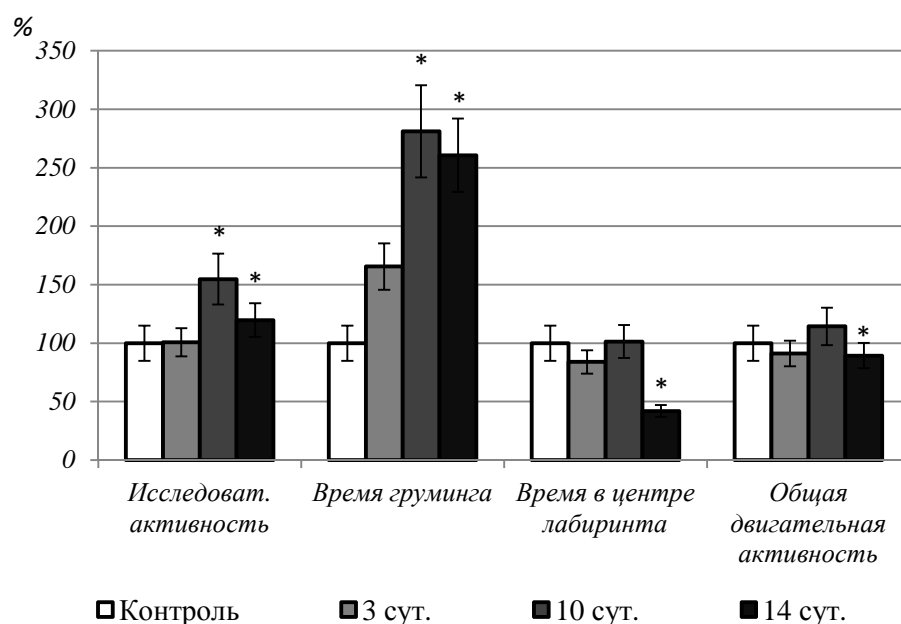


Рис. Изменения поведенческой активности крыс при экспериментальном моделировании ПТСР. Данные представлены в процентах от соответствующих показателей контрольной группы (100%) * - статистически значимые отличия от контроля

Таким образом, даже спустя достаточно длительное время после завершения стрессорных воздействий, то есть после двухнедельного содержания животных в обычных условиях, сохранялись поведенческие расстройства тревожного характера, что является атрибутивным признаком ПТСР.

Не исключено, что активация свободнорадикального окисления в печени могла повлечь за собой дисфункцию органа с последующим высвобождением продуктов окисления в кровотоки и проявлению токсических эффектов интермедиатов СРО на системном уровне. Данное предположение базируется на наличии корреляционных взаимосвязей между содержанием продуктов СРО в гомогенатах печени и некоторыми нейроэтологическими параметрами в опытной группе животных через 14 суток после завершения воздействия стрессора. Уровень исследовательской активности (количество выглядываний животного за

пределы лабиринта) имел обратную взаимосвязь с содержанием в печени вторичных гептан-растворимых ($R=-0,87$; $P=0,005$) и первичных изопропанол-растворимых ($R=-0,94$; $P=0,001$) продуктов ПОЛ, и прямую – с уровнем ПОЛ в ответ на индукцию Fe^{2+} / аскорбат ($R=0,91$; $P=0,002$). Суммарная продолжительность актов груминга была напрямую связана с содержанием первичных изопропанол-растворимых ($R=0,78$; $P=0,021$) и вторичных гептан-растворимых ($R=0,88$; $P=0,004$) продуктов ПОЛ в печени животных. Следует также отметить наличие корреляционных взаимосвязей между индексом тревожности и уровнем окислительной модификации белков в печени ($R=0,88$; $P=0,004$).

Заключение

Таким образом, в динамике экспериментального моделирования посттравматического стрессового расстройства в печени наблюдаются изменения содержания продуктов СРО. На ранних этапах формирования ПТСР основным проявлением окислительного стресса является одновременное усиление карбонилирования белков и накопление вторичных продуктов ПОЛ, что соответствует состоянию так называемого карбонильного стресса. На более поздних сроках (10 суток после завершения воздействия) выявлено одновременное ограничение липопероксидации и ОМБ с восстановлением до контрольных значений.

Через 14 суток после завершения воздействия стрессора, к моменту формирования устойчивых поведенческих расстройств, характерных для ПТСР, также выявлены признаки окислительного стресса: наблюдалось одновременное увеличение содержания в печени гептан-растворимых первичных (диеновые конъюгаты), конечных (основания Шиффа) продуктов ПОЛ и уровня карбонилированных белков. Известно, что шиффовы основания образуются в процессе реакции продуктов ПОЛ и ОМБ альдегидной природы с аминокруппами, что приводит к образованию меж- и внутримолекулярных сшивок в молекулах протеинов [10]. Поэтому, высокий уровень шиффовых оснований в данном случае свидетельствует в пользу усиления окислительной модификации белков. Это предположение подтверждается наличием корреляционных взаимосвязей между уровнем гептан-растворимых шиффовых оснований и уровнем металл - катализируемой ОМБ ($R_s= 0,8$, $P=0,014$). Таким образом, основным проявлением окислительного стресса в печени при экспериментальном моделировании ПТСР является усиление окислительной модификации белков.

Список литературы

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Методические рекомендации. - СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000.-104 с.
2. Львовская Е.И. Зависимость функциональных эффектов продуктов ПОЛ от их содержания в организме / Е.И. Львовская, Д.А. Дятлов, Н.М. Григорьева [и др.]. – Челябинск, 2005. – 170 с.
3. Arlington V.A. American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders / V.A. Arlington //American Psychiatric Publishing.- 2013. — P. 271–280.
4. Belzung C. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review/ C. Belzung, G. Griebel //Behav. Brain. Res.-2001 Nov 1; 125(1-2):141-149.
5. Cohen H. et al. Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of posttraumatic stress disorder //Neuropsychopharmacology. – 2004.
6. Curtis J. M. et al. Protein carbonylation and metabolic control systems / J.M. Curtis, W.S. Hahn, E.K. Long, J.S. Burrill // Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2012. – Т. 23. – №. 8. – P. 399-406.
7. McMillan K.A. Social Anxiety Disorder Is Associated With PTSD Symptom Presentation: An Exploratory Study Within A Nationally Representative Sample/ McMillan K.A., Sareen J., Asmundson G.J.G. // Journal of traumatic stress. – 2014. – Т. 27. – №. 5. – P. 602-609.
8. Miyata T. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of “carbonyl stress” in long-term uremic complications/ T. Miyata, C.De. Strihou, K. Kurokawa // Kidney international. – 1999. – Т. 55. – №. 2. – P. 389-399.
9. Nguyen H.A. et al. Spectrum of disease in US veteran patients with hepatitis C //The American journal of gastroenterology. – 2002. – Т. 97. – №. 7. – P. 1813-1820.
10. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes //Chemistry and physics of lipids. – 1987. – Т. 44. – №. 2. – P. 175-189.

Рецензенты:

Волчегорский И.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Челябинск;
Рябинин В.Е., д.б.н., профессор, профессор кафедры биологической химии ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Челябинск.