

## ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У КРЫС ПРИ СТРЕССЕ И ПОСЛЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

Хужахметова Л.К.<sup>1</sup>, Сентюрлова Л.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия (414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121), e-mail: sentlj2012@yandex.ru

В исследовании представлено изучение динамики свободнорадикальных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови и в тканях головного мозга при стрессогенном воздействии и при фармакологической коррекции (введение  $\alpha$ -токоферола, циклоферона и их комбинации) у старых крыс. Полученные результаты – повышение интенсивности перекисного окисления липидов у стрессированных старых организмов – отражают общую тенденцию липидной перекисной окисления во всем организме, в том числе в головном мозге. Имобилизационный стресс старых животных привел к значительному увеличению показателей ПОЛ. У крыс, находящихся в покое, и стрессированных имобилизацией старых крыс, получавших  $\alpha$ -токоферол, циклоферон и их комбинацию, было достоверно обнаружено снижение скорости спонтанного ПОЛ, аскорбат-зависимого ПОЛ (АСК-зависимого ПОЛ), уровня малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах тканей головного мозга и плазме крови, а также промежуточных продуктов ПОЛ - ацетилгидроперекисей, диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов. Наиболее выраженный антиоксидантный эффект оказывал комплекс  $\alpha$ -токоферол + циклоферон на стрессированных старых крыс.

Ключевые слова:  $\alpha$ -токоферол, циклоферон, свободнорадикальные процессы, перекисное окисление липидов, стресс, старые крысы.

## DYNAMICS OF PROCESSES OF LIPID PEROXIDATION IN RATS DURING STRESS AND AFTER PHARMACOLOGICAL CORRECTION

Khuzhakhmetova L.K.<sup>1</sup>, Sentyurova L.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Astrakhan state medical University, Astrakhan, Russia (414000, Astrakhan, street Bakinskaya, 121), e-mail: sentlj2012@yandex.ru

The study presents a study of the dynamics of free radical processes, lipid peroxidation (LPO) in plasma and in brain tissue at the impact of stress and pharmacological treatment (injection of  $\alpha$ -tocopherol, cycloferon and their combinations) in aged rats. The results – an increase in the intensity of lipid peroxidation in stressed oldest organisms reflect a General trend of lipid peroxidation throughout the body, including the brain. Immobilization stress older animals resulted in a significant increase of lipid peroxidation. In rats, at rest, and stressed by immobilization of old rats receiving  $\alpha$ -tocopherol, cycloferon and their combination was significantly observed decrease in speed spontaneous (LPO), ascorbate-dependent LPO (ASC-dependent LPO), malondialdehyde level (MDA) in homogenates of brain tissue and blood plasma, as well as intermediate products LPO acetylhydrolase, diene conjugates, metodiev and conjugate of treenow. The most pronounced antioxidant effect provided the complex  $\alpha$ -tocopherol + cycloferon in stressed aged rats.

Keywords:  $\alpha$ -tocopherol, cycloferon, free radical processes, lipid peroxidation, stress, old rats.

При стрессе различного генеза, а также при старении в организме наблюдается значительное усиление свободнорадикальных процессов [7]. Свободные радикалы вызывают повреждение наследственного материала, мембранных структур и др. Изучение процессов липидной перекисной окисления наиболее актуально для тканей головного мозга, содержащих более 40% липидов. Повышенная чувствительность нервной ткани обусловлена высокой степенью метаболических процессов, насыщенностью кислородом, низкой активностью каталаз, увеличением фракции полиненасыщенных жирных кислот [6]. Развитие окислительного стресса сопровождается снижением концентрации  $\alpha$ -токоферола, нивелирующего действие

свободных радикалов, в том числе стабилизацией биомембран [4], создаются условия для повышения окислительной деструкции белков, липидов, особенно у стареющих организмов [5].

**Цель.** Целью исследования явилось изучение динамики свободнорадикальных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови: конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) и промежуточных продуктов ПОЛ (ацетилгидроперекисей диеновых конъюгатов, кетодиенов, сопряженных триенов) и в тканях головного мозга - МДА при стрессогенном воздействии и при фармакологической коррекции (введение  $\alpha$ -токоферол-ацетата, циклоферона) у половозрелых крыс.

$\alpha$ -Токоферол является природным антиоксидантом, способен разрушать активные метаболиты кислорода, участвует в защите липопротеинов сыворотки крови, стабилизирует структуру цитолеммы, связывает продукты гидролиза фосфолипидов, на генном уровне осуществляет коррекцию апоптоза [4].

Согласно современным данным, циклоферон обуславливает стимуляцию выработки эндогенного интерферона, влияет на продукцию других цитокинов (фактор некроза опухоли, интерлейкины), модулирует уровень программмированной клеточной гибели [8].

### **Материалы и методы**

В эксперименте было использовано 64 белых беспородных старых крыс-самцов (30 мес), средней массой 352 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом освещении и свободном доступе к воде и пище.

В опыте использованы следующие группы.

1. Интактные крысы (контроль) (n = 8).
2. Крысы, получавшие масляный 10%-ный раствор  $\alpha$ -токоферол-ацетата per os, в течение двух недель, в дозе 0,5 мг на 100 г массы тела (n = 8).
3. Крысы, получавшие циклоферон (Полисан СПб) per os, в течение двух недель, 1,19 мг на 100 г массы тела (n = 8).
4. Крысы, получавшие совместно 10%-ный масляный раствор  $\alpha$ -токоферол-ацетата (0,5 мг на 100 г) и циклоферон per os (1,19 мг на 100 г массы тела) в течение двух недель (n = 8).
5. Крысы, подвергшиеся иммобилизационному стрессу в пластиковых цилиндрах по 1 часу в день в течение двух недель (n = 8).
6. Стрессированные крысы, получавшие предварительно 10%-ный масляный раствор  $\alpha$ -токоферол-ацетата в тех же дозах в течение двух недель (n = 8).
7. Стрессированные крысы, получавшие предварительно циклоферон в тех же дозах в течение двух недель (n = 8).

8. Стрессированные крысы, получавшие предварительно раствор  $\alpha$ -токоферол-ацетата и циклоферон тех же дозах в течение двух недель ( $n = 8$ ).

По окончании воздействий на следующий день проводили декапитацию животных.

Определение динамики процессов ПОЛ в гомогенатах тканей головного мозга (по методу И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили (1977) в модификации Е.А. Строева и В.Г. Макаровой (1986) [3].

Метод основан на реакции одного из конечных продуктов – малонового диальдегида (МДА) - с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при 532 нм.

Экстинкцию всех проб измеряли на спектрофотометре (светофильтр зеленый, длина волны 532 нм) в кювете с толщиной слоя 1 см.

Единицы измерения в методике определения скорости ПОЛ – нмоль/час, для определения уровня МДА – нмоль/500 мг ткани.

#### **Определение уровня свободнорадикального окисления липидов в плазме крови**

Для оценки уровня ПОЛ у животных контрольной и опытных групп определяли исходную концентрацию вторичного продукта ПОЛ - малонового диальдегида в плазме крови тиобарбитуровым методом [2; 3].

Высчитывали среднюю величину содержания ТБК – активных продуктов на одного животного и далее на группу.

Определение уровня промежуточных продуктов перекисного окисления липидов (ПП ПОЛ)

(по методу Волчегорского В.А. и соавторов (1989)) [1].

Интенсивность образования промежуточных продуктов ПОЛ с изолированными двойными связями (220 нм), диеновых конъюгатов (232 нм), кетодиенов и сопряженных триенов (278 нм) спектрофотометрически определяли в изопропанольной и гептановой фракции.

Принцип метода основан на интенсивном поглощении конъюгированных диеновых структур в области 232-234 нм.

Полученные экспериментальные данные обработаны с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel. Сравнение средних показателей производили с помощью стандартных методов вариационной статистики. Различия в показателях считались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Исследование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах тканей головного мозга показало (табл. 1), что при введении  $\alpha$ -токоферол-ацетата скорость

спонтанного ПОЛ снижается на 11,8%, количество МДА уменьшается на 25,6% по сравнению с контрольной группой. При введении циклоферона также наблюдается снижение скорости спонтанного ПОЛ на 13,9%, количество МДА на 20,3%.

**Таблица 1**

Показатели динамики процессов ПОЛ в гомогенатах тканей головного мозга

|  |                                 | Скорость спонт. ПОЛ нмоль/ч   | Скорость АСК-ПОЛ нмоль/ч     | Количество МДА нмоль/500 мг ткани |
|--|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|  | Контроль                        | 11,17±/± 0,3                  | 88,41 ±/± 1,8                | 1,68±/±0,12                       |
|  | Токоферол                       | 9,88 ±/± 0,4***               | 79,17 ±/± 1,9***             | 1,25 ±/± 0,1***                   |
|  | Циклоферон                      | 9,62 ±/± 0,4***               | 82,27 ±/± 2,4**              | 1,34 ±/± 0,09**                   |
|  | Токоферол + Циклоферон          | 8,43 ±/± 0,6***               | 76,84±/± 2,6***              | 1,22 ±/± 0,11***                  |
|  | Стресс                          | 13,61 ±/± 0,76***             | 99,81 ±/± 2,1***             | 2,45 ±/± 0,24***                  |
|  | Стресс + Токоферол              | 10,65±/± 0,5 <sup>000</sup>   | 81,87±/±1,9 <sup>**000</sup> | 1,52 ±/± 0,10 <sup>000</sup>      |
|  | Стресс + Циклоферон             | 8,95±/± 0,82 <sup>**000</sup> | 76,22±/±2,3 <sup>**000</sup> | 1,54 ±/± 0,09 <sup>000</sup>      |
|  | Стресс + Токоферол + Циклоферон | 8,21±/± 0,57 <sup>**000</sup> | 74,08±/±2,2 <sup>**000</sup> | 1,49 ±/± 0,10 <sup>000</sup>      |

Примечание. Статистическая значимость с группой «Контроль»: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Статистическая значимость с группой «Стресс»: <sup>0</sup>- $p < 0,05$ ; <sup>00</sup>- $p < 0,01$ ; <sup>000</sup> -  $p < 0,001$ .

При комбинированном воздействии  $\alpha$ -токоферол-ацетата с циклофероном скорость спонтанного ПОЛ снизилась на 24,5%, скорость АСК-зависимого ПОЛ – на 13,2% и количество МДА – на 27,4%, что отразило большую активность совместного действия препаратов. Иммунизационный стресс старых животных привел к увеличению показателей ПОЛ: скорость спонтанного ПОЛ увеличилась на 22,0%, скорость АСК-зависимого ПОЛ на 13,1%, а также значительно повысилось количество МДА - на 45,8% по сравнению с контролем. Действие  $\alpha$ -токоферол-ацетата у стрессированной группы вызвало снижение скорости спонтанного ПОЛ на 21,7%, АСК-зависимого ПОЛ на 18,1%, количества МДА на 28,6%. Отмечена динамика снижения показателей при введении циклоферона у стрессированных животных: скорость спонтанного ПОЛ – на 20,4%, АСК-зависимого ПОЛ – на 26,4%, количества МДА на 38,3% - по сравнению с интактными стрессированными животными. Циклоферон на стрессированных животных повлиял следующим образом:

скорость спонтанного ПОЛ снизилась на 34,6%, АСК-зависимого ПОЛ – на 23,6% и МДА – на 37,2%, по сравнению со стрессированной группой.

Введение комплекса  $\alpha$ -токоферол-ацетата и циклоферона стрессированным старым крысам снизило скорость спонтанного ПОЛ на 34,2%, АСК-зависимого ПОЛ (26,1%) и количество МДА (39,2%) по сравнению с интактной стрессированной группой, а также привело к снижению показателей по сравнению с контрольной группой, находящейся в покое: скорость спонтанного ПОЛ снизилась на 20,1%, АСК-ПОЛ - на 15,3%, количество МДА – на 11,3%.

### Изменение концентрации МДА в плазме крови

При определении количества малонового диальдегида было выявлено изменение содержания липидных перекисей в плазме крови у экспериментальных 30-месячных крыс (табл. 2).

**Таблица 2**

Показатели конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) в плазме крови старых крыс

| Группы животных                 | Количество МДА, мкмоль/л     |
|---------------------------------|------------------------------|
| Контроль                        | 1,94 +/- 0,12                |
| Токоферол                       | 1,43 +/- 0,08***             |
| Циклоферон                      | 1,43 +/- 0,09***             |
| Токоферол + Циклоферон          | 1,44 +/- 0,06***             |
| Стресс                          | 3,79 +/- 0,1***              |
| Стресс + Токоферол              | 1,64 +/- 0,09 <sup>000</sup> |
| Стресс + Циклоферон             | 1,53 +/- 0,14 <sup>000</sup> |
| Стресс + Токоферол + Циклоферон | 1,61 +/- 0,12 <sup>000</sup> |

Примечание. Статистическая значимость с группой «Контроль»: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Статистическая значимость с группой «Стресс»: <sup>0</sup>- $p < 0,05$ ; <sup>00</sup>- $p < 0,01$ ; <sup>000</sup> -  $p < 0,001$ .

Действие  $\alpha$ -токоферола на контрольную группу крыс, находящихся в покое, привело к снижению концентрации МДА в плазме на 26,3% по сравнению с контрольной группой. Циклоферон снизил данный показатель на 26,4%. Сочетание токоферола с циклофероном привело к снижению количества МДА – на 25,8%. У крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу, количество малонового диальдегида увеличилось на 95,4% по сравнению с контролем. Фармакологическая коррекция  $\alpha$ -токоферол-ацетатом снизила данный показатель на 56,7%, циклофероном – на 59,6%, а сочетанное их действие привело к снижению количества МДА на 57,6%. Также следует отметить, что действие этих препаратов снизило показатели МДА по сравнению с контролем:  $\alpha$ -токоферол на 15,5%; циклоферон на 19,6%; их совместное действие - на 17,0%.

## Определение промежуточных продуктов ПОЛ в плазме крови – ацетилгидроперекисей, диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов

Наибольшее снижение количества диеновых конъюгатов было выявлено при введении  $\alpha$ -токоферола и сочетании  $\alpha$ -токоферола с циклофероном у крыс, находящихся в покое – 46,7%. (табл. 3).

**Таблица 3**

Показатели промежуточных продуктов ПОЛ в плазме

| Группы животных                 | Ацетилгидро-перекиси (ед. оптической плотности) | Диеновые конъюгаты (ед. оптической плотности) | Кетодиены и сопряженные триены (ед. оптической плотности) |
|---------------------------------|---|---|---|
| Контроль                        | 0,48 +/- 0,04                                   | 0,15 +/- 0,03                                 | 0,083 +/- 0,004   |
| Токоферол                       | 0,32 +/- 0,06**                                 | 0,08 +/- 0,02*                                | 0,070 +/- 0,004*  |
| Циклоферон                      | 0,35 +/- 0,04***                                | 0,10 +/- 0,02*                                | 0,073 +/- 0,003*  |
| Токоферол + Циклоферон          | 0,33 +/- 0,04***                                | 0,08 +/- 0,03*                                | 0,070 +/- 0,006*  |
| Стресс                          | 0,67 +/- 0,08***                                | 0,21 +/- 0,06***                              | 0,116 +/- 0,007***  |
| Стресс + Токоферол              | 0,29 +/- 0,07*** <sup>000</sup>                 | 0,125 +/- 0,04 <sup>*0</sup>                  | 0,072 +/- 0,006 <sup>*000</sup>                           |
| Стресс + Циклоферон             | 0,34 +/- 0,05*** <sup>000</sup>                 | 0,12 +/- 0,05 <sup>*0</sup>                   | 0,078 +/- 0,005 <sup>*000</sup>                           |
| Стресс + Токоферол + Циклоферон | 0,33 +/- 0,06 <sup>*000</sup>                   | 0,10 +/- 0,06 <sup>*0</sup>                   | 0,069 +/- 0,006 <sup>*000</sup>                           |

Примечание. Статистическая значимость с группой «Контроль»: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Статистическая значимость с группой «Стресс»: <sup>0</sup>- $p < 0,05$ ; <sup>00</sup>- $p < 0,01$ ; <sup>000</sup>-  $p < 0,001$ .

Значительное изменение показателей промежуточных продуктов ПОЛ наблюдали у стрессированной группы - увеличение ацетилгидроперекисей в ед. опт. плотности на 60,4%, диеновых конъюгатов и кетодиенов почти на 40% (табл. 3).

Воздействие  $\alpha$ -токоферол-ацетата на стрессированную группу снизило показатели ацетилгидроперекисей на 56,7%, а диеновых конъюгатов – 40,5%. Действие циклоферона также привело к снижению данных показателей. Комбинация  $\alpha$ -токоферола и циклоферона снизила количество ацетилгидроперекисей на 50,7%, диеновых конъюгатов – на 52% и кетодиенов и сопряженных триенов – на 40,5%.

## Заключение

Полученные нами результаты – повышение интенсивности перекисного окисления липидов у стрессированных старых организмов – отражают общую тенденцию липидной перекисидации во всем организме, в том числе головном мозге. Иммобилизационный стресс старых животных привел к значительному увеличению показателей ПОЛ - значительно повысилось количество МДА - на 45,8% по сравнению с контролем. У крыс, находящихся в покое, и стрессированных иммобилизацией крыс, получавших  $\alpha$ -токоферол, циклоферон и их комбинацию, было достоверно обнаружено снижение скорости спонтанного ПОЛ, АСК-зависимого ПОЛ, уровня МДА в гомогенатах тканей головного мозга и плазме крови, а также промежуточных продуктов ПОЛ - ацетилгидроперекисей, диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов.

## Список литературы

1. Волчегорский В.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах крови / В.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский [и др.] // *Вопр. мед. хим.* – 1989. - № 1. – С. 127-131.
2. Орехович В.Н. *Современные методы в биохимии.* - М. : Медицина, 1977. – 391 с.
3. Строев Е.А. *Практикум по биологической химии : учебное пособие* / Е.А. Строев, В.Г. Макарова. – М. : Высшая школа, 1986. – 230 с.
4. Теплый Д.Л. *Нейрофизиологические эффекты витамина Е.* – Астрахань : ООО «ЛЕОН», 2008. – 310 с.
5. Хужахметова Л.К. Влияние  $\alpha$ -токоферол-ацетата, циклоферона и их комбинирования на свободнорадикальные процессы у стрессированных крыс / Хужахметова Л.К., Теплый Д.Л. // *Естественные науки.* - 2010. - № 4. - С. 141-147.
6. Halliwell B. Free radicals in the Brain // *Aging, Neurological and Mental Dis-orders.* – Berlin, 1992. - P. 21-40.
7. Posevitz V. Restraint stress and anti-tumor immune response in mice / V. Posevitz, C. Vizler, S. Benuhe, E. Duda, A. Borsod // *Akta Biol Hung.* – 2003. – Vol. № 2. – P. 167-176.
8. Zmushko E.L. Cutokinin inducing and antiviral activity of cycloferon on experimental herpetic infection / E.L. Zmushko, Lu.A. Mitin, V.V. Katsalukha // *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* - № 4. – P. 105-107.

**Рецензенты:**

Зурнаджан С.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань;

Фельдман Б.В., д.б.н., заведующий кафедрой биологии и ботаники ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань.