

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У СТРЕССИРОВАННЫХ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Хужахметова Л.К.¹, Сентюрова Л.Г.¹

¹ГБОУ 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 (показателей малонового диальдегида) в плазме крови в покое, при иммобилизационном стрессе и при фармакологической коррекции стресса (введение α -токоферола, циклоферона и их комбинации) у половозрелых и старых крыс. Результаты наших исследований отражают уровень свободнорадикальных процессов, интенсивность которых увеличивается при старении и стрессовых воздействиях и нивелируется фармакологическими препаратами – антиоксидантами, иммуномодуляторами. Иммобилизационный стресс старых крыс привел к значительному увеличению количества малонового диальдегида в плазме крови - на 95%, по сравнению с крысами, находящимися в покое, что на 31,7% превышает данный показатель у молодых крыс. Корректирующая активность препаратов трех групп была отмечена у крыс всех изученных возрастов, но особенно у старых животных. Наиболее выраженный антиоксидантный эффект оказывал комплекс α -токоферол + циклоферон на стрессированных старых крыс.

Ключевые слова: α -токоферол, циклоферон, свободнорадикальные процессы, перекисное окисление липидов, стресс, половозрелые и старые крысы.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PROCESSES OF LIPID PEROXIDATION IN STRESSED ADULT AND OLD RATS

Khuzhakhmetova L.K.¹, Sentyurova L.G.¹

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

The study presents the study of the dynamics of free radical processes of lipid peroxidation (malondialdehyde indicators) in plasma at rest, with immobilization stress and the pharmacological correction of stress (injection of α -tocopherol, and cycloferon combination) in Mature and aged rats. The results of our research reflect the level of free radical processes, the intensity of which increases with aging and stress and leveled pharmacological agents, antioxidants, immunomodulators. Immobilization stress aged rats led to a significant increase in the number of malonic dialdehyde in blood plasma is 95%, compared with rats, at rest, 31.7% higher than in young rats. Correcting the activity of the preparations of the three groups was observed in rats of all studied ages, but especially for older animals. The most pronounced antioxidant effect was provided by a complex of α -tocopherol + cycloferon in stressed aged rats.

Keywords: α -tocopherol, cycloferon, free radical processes, lipid peroxidation, stress, adult and old rats.

Усиление свободнорадикальных процессов наблюдается при стрессовых состояниях и особенно выражено при старении. Активация перекисного окисления липидов является одним из компонентов стрессорных повреждений, приводящих к интенсивной выработке свободнорадикальных продуктов. Окислительный стресс приводит к деструкции белков и липидов биомембран, усиливает апоптоз-специфические процессы, которые интенсивно проявляются в процессе возрастной инволюции [2; 7]. Развитие окислительного стресса сопровождается снижением концентрации α -токоферола, развитием стресс-индуцированного иммунного дисбаланса. α -Токоферол является природным антиоксидантом, участвует в защите липопротеинов сыворотки крови, стабилизирует структуру цитолеммы, связывает

продукты гидролиза фосфолипидов, на генном уровне осуществляет коррекцию апоптоза [4; 5; 8].

Исходя из вышеизложенного, изучение влияния иммуностропных препаратов, в частности циклоферона, который обуславливает стимуляцию выработки эндогенного интерферона, модулирует уровень программированной клеточной гибели [1; 6], в сочетании с антиоксидантом α -токоферол-ацетатом на проявление стрессорных реакций в онтогенезе является весьма актуальным.

Цель. Целью исследования явилось изучение динамики свободнорадикальных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови: конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) при стрессогенном воздействии и при фармакологической коррекции (введение α -токоферол-ацетата, циклоферона) у половозрелых и старых крыс.

Материалы и методы

В эксперименте было использовано 128 белых беспородных крыс-самцов - половозрелых (10 мес.) и старых (30 мес.). 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): 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).
2. Крысы, получавшие масляный 10%-ный раствор α -токоферол-ацетата per os, в течение двух недель, в дозе 0,5 мг на 100 г массы тела; 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).
3. Крысы, получавшие циклоферон (Полисан СПб) per os, в течение двух недель, в дозе 0,77 мг на 100 г массы тела - 10-месячным и 1,19 мг на 100 г массы тела – 30-месячным; 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).
4. Крысы, получавшие совместно 10%-ный масляный раствор α -токоферол-ацетата (0,5 мг на 100 г) и циклоферон per os (0,77 мг на 100 г массы тела – 10-месячным и 1,19 мг на 100 г массы тела – 30-месячным) в течение двух недель; 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).
5. Крысы, подвергшиеся иммобилизационному стрессу в пластиковых цилиндрах по 1 часу в день в течение двух недель; 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).
6. Стрессированные крысы, получавшие предварительно 10%-ный масляный раствор α -токоферол-ацетата в тех же дозах в течение двух недель; 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).
7. Стрессированные крысы, получавшие предварительно циклоферон в тех же дозах в течение двух недель; 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).
8. Стрессированные крысы, получавшие предварительно раствор α -токоферол-ацетата и циклоферон тех же дозах в течение двух недель; 10 мес. (n = 8), 30 мес. (n = 8).

Выведение животных из эксперимента проводили методом быстрой декапитации через сутки после окончания воздействия.

Определение уровня свободнорадикального окисления липидов в плазме крови

Для оценки уровня ПОЛ у животных контрольной и опытных групп определяли исходную концентрацию вторичного продукта ПОЛ - МДА в плазме крови тиобарбитуровым методом [3]. При декапитации животных кровь собирали и центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 15 минут, выделяли плазму. В дальнейшем определяли уровень конечного продукта ПОЛ – МДА с помощью набора реактивов для определения активных продуктов ТБК в плазме крови фирмы «Агат». Оптическую плотность опытной пробы измеряли против холостой пробы при двух длинах волн: 535 и 570 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, на цифровом спектрофотометре APEL PD-303 UV. Полученные данные рассчитывали по формуле: $C = \frac{D_{535} - D_{570}}{0,156} \times 16$, где: C – содержание ТБК-активных продуктов в опытной пробе мкмоль/л; D_{535} – оптическая плотность опытной пробы при 535 нм; D_{570} – оптическая плотность опытной пробы при 570 нм; 0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса МДА – ТБК в л/мкмоль/см; 16 – коэффициент разведения сыворотки.

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

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 ПОЛ в плазме крови выявило изменения содержания МДА у экспериментальных половозрелых и старых крыс (табл. 1, 2).

Таблица 1

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

	Группы животных	Количество МДА, мкмоль/л
1	Контроль	1,21 +/- 0,11
2	Токоферол	0,83 +/- 0,14**
3	Циклоферон	0,91 +/- 0,18**
4	Токоферол + Циклоферон	0,74 +/- 0,16**
5	Стресс	1,98 +/- 0,21***
6	Стресс + Токоферол	0,98 +/- 0,021* ⁰⁰⁰
7	Стресс + Циклоферон	1,12 +/- 0,16 ⁰⁰⁰
8	Стресс + Токоферол + Циклоферон	1,08 +/- 0,18 ⁰⁰⁰

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

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

Таблица 2

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

	Группы животных	Количество МДА, мкмоль/л
1	Контроль	1,94 +/- 0,12
2	Токоферол	1,43 +/- 0,08 ^{***}
3	Циклоферон	1,43 +/- 0,09 ^{***}
4	Токоферол + Циклоферон	1,44 +/- 0,06 ^{***}
5	Стресс	3,79 +/- 0,1 ^{***}
6	Стресс + Токоферол	1,64 +/- 0,09 ^{*000}
7	Стресс + Циклоферон	1,56 +/- 0,14 ^{*000}
8	Стресс + Токоферол + Циклоферон	1,61 +/- 0,12 ^{*000}

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

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

У половозрелых крыс, находящихся в покое, α -токоферол-ацетат снизил показатели МДА на 30,8%, а в сочетании с циклофероном на 38,3%. У старых же крыс фармакологическая коррекция в трех группах снизила МДА в среднем на 26%.

Выраженная активация ПОЛ наблюдалась у крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу: у половозрелых крыс количество МДА увеличилось на 65,1%, а у старых на 95,4%, что свидетельствует о снижении адаптационных процессов у животных данной группы, связанном с накоплением антиоксидантов (табл. 3).

Коррекция фармакологическими препаратами стрессированных животных показала значительное изменение количества МДА по сравнению с группой «Стресс» (табл. 4).

Таблица 3

Изменение содержания малонового диальдегида в плазме крови крыс по сравнению с группой «Контроль»

Опытные Группы / показатели	α -токоферол (в покое)		Циклоферон (в покое)		α -токоферол + Циклоферон (в покое)		Стресс	
	10 мес.	30 мес.	10 мес.	30 мес.	10 мес.	30 мес.	10 мес.	30 мес.
МДА	↓ на 30,8%	↓ на 26,3%	↓ на 24,2%	↓ на 26,3%	↓ на 38,3%	↓ на 26,1%	↑ на 65,1%	↑ на 95,4%

Таблица 4

Изменение содержания малонового диальдегида в плазме крови крыс по сравнению с группой «Стресс» и по сравнению с группой «Контроль»

Опытные группы / показатели	Стресс		α -токоферол-ацетат		Циклоферон		α -токоферол-ацетат + Циклоферон	
	10 мес.	30 мес.	10 мес.	30 мес.	10 мес.	30 мес.	10 мес.	30 мес.
МДА по сравн. с гр. «Стресс»	↑ на 51%	↑ на 118,6%	↓ на 24%	↓ на 34%	↓ на 25%	↓ на 30%	↓ на 32,5%	↓ на 39,4%
МДА по сравн. с гр. «Контроль»	↑ на 32%	↑ на 186%	↓ на 20,5%	↓ на 58%	↓ на 22%	↓ на 47%	↓ на 33%	↓ на 59,7%

У 30-мес. крыс выраженный стресс-корректирующий эффект был отмечен при введении циклоферона, а также при комплексном введении α -токоферол-ацетата с циклофероном – до 58%. У молодых крыс введение α -токоферол-ацетата оказало ожидаемое антиоксидантное действие и привело к достоверному снижению МДА на 50,5% по сравнению со стрессированной группой, и на 18% по сравнению с контролем. Комбинация препаратов (α -токоферол-ацетата с циклофероном) снизила МДА соответственно на 45,5% и на 10% (табл. 3, 4).

Заключение

Результаты наших исследований отражают уровень свободнорадикальных процессов, интенсивность которых увеличивается при старении и стрессовых воздействиях и корректируется фармакологическими препаратами – антиоксидантами, иммуномодуляторами. Имобилизационный стресс старых крыс привел к значительному увеличению количества МДА в плазме крови - на 95%, по сравнению с крысами, находящимися в покое, что на 31,7% превышает данный показатель у молодых крыс. Нивелирующая активность препаратов трех групп была отмечена у крыс всех изученных возрастов, но особенно выражена у старых животных.

Таким образом, сравнение показателей перекисного окисления липидов позволяет рекомендовать для коррекции отрицательного влияния стресса применять комбинацию иммуномодулятора и антиоксиданта.

Список литературы

1. Бажанова Е.Д. Участие интерферона-альфа в регуляции апоптоза клеток гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы старых мышей при оксидативном стрессе / Е.Д. Бажанова, Д.Л. Теплый // Морфология. – 2004. – Т. 125, № 1. – С. 23-26.
2. Зозуля Ю.Б. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга / Зозуля Ю.Б., Барабой В.А., Стукова Д.А. – Знание, 2000. – 344 с.
3. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. - М. : Медицина, 1977. – 391 с.
4. Теплый Д.Л. Нейрофизиологические эффекты витамина Е. – Астрахань : ООО «ЛЕОН», 2008. – 310 с.
5. Хужахметова Л.К. Влияние α -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. Хужахметова Л.К., Сентюрова Л.Г. Динамика процессов перекисного окисления липидов у крыс при стрессе и после фармакологической коррекции // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – URL: www.science-education.ru/127-21144.
7. Halliwell B. Free radicals in the Brain // Aging, Neurologikal and Mental Dis-orders. – Berlin, 1992. - P. 21-40.
8. Wolf R. Vitamin E: the radical protector / R. Wolf, D. Wolf, V. Rucco // Venerol. - 1998. – Vol. 10, № 2. – P. 103-117.

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;

Горст В.Р., д.б.н., профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань.