

С. В. Глинник

Состояние процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты тканей при гипокинетическом стрессе у крыс с экспериментальным гипотиреозом

Белорусский государственный медицинский университет

Исследовано состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантного статуса печени и мозга у крыс с экспериментальным гипотиреозом, подвергнутых гипокинетическому стрессу. Установлено, что при гипотиреозе нарушается способность организма адекватно реагировать на стрессовый фактор. При этом наблюдаются разнонаправленные изменения процессов перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты тканей при гипокинетическом стрессе у эутиреоидных крыс и крыс с экспериментальным гипотиреозом.

Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, гипокинетический стресс, перекисное окисление липидов, антиоксидантный статус.

Одной из важных и актуальных проблем эндокринной патологии в Республике Беларусь являются заболевания щитовидной железы и, в частности, гипотиреоз. И весьма важным аспектом изучения данной патологии в постчернобыльский период стало изучение особенностей её проявления в условиях повышенных стрессовых воздействий, в том числе и радиофобии. Тиреоидная ось закономерно вовлекается в процессы адаптации организма к действию чрезвычайных раздражителей. Однако, сами изменения тиреоидной функции при стрессе и адаптации, как и изменения медиаторной функции при тиреоидной патологии, не позволяют оценить значение тиреоидных гормонов в приспособительных реакциях. Необходимо комплексное исследование гормонального обмена и состояния окислительно-восстановительных процессов в организме экспериментальных животных с измененным тиреоидным статусом в условиях дополнительных стрессовых воздействий различной природы.

Целью нашего исследования явилось изучение состояния процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты тканей при гипокинетическом стрессе у крыс с экспериментальным гипотиреозом.

Материал и методы

Работа выполнена на 32-х белых нелинейных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях освещения и пищевого режима вивария БГМУ. Животные были разделены на 4 группы (по 8 особей в каждой):

I (К)-интактные крысы, получавшие на протяжении эксперимента (14 суток) обычную воду;

II (Г)-крысы с экспериментальным гипотиреозом, который создавался путем дачи в качестве питья 0,02 % раствора пропилтиоурацила (ПТУ) (Fluka, Швейцария) в течение 14-ти суток из поилок, к которым крысы имели постоянный доступ (по расчетным данным каждая крыса получала 0,78 мг пропилтиоурацила на 100 г массы тела в сутки);

III (С)-крысы, получавшие на протяжении двух недель обычную воду и на 14-е сутки подвергнутые стрессу путем помещения на 3 часа в индивидуальные клетки-пеналы (гипокинезия);

IV (Г+С)-крысы с экспериментальным гипотиреозом, который создавался путем дачи в качестве питья 0,02% раствора ПТУ в течение двух недель, затем на 14-е сутки животные подвергались гипокинетическому стрессу.

Животные III и IV групп снимались с эксперимента непосредственно после окончания стрессового воздействия. Крыс умерщвляли под тиопенталовым наркозом (60 – 80 мг/кг) забором крови из сонной артерии. Забор органов (мозг, печень, щитовидная железа) производился на холоду. Массу щитовидной железы измеряли взвешиванием на электронных весах (Госметр, Россия). Относительную массу рассчитывали как отношение абсолютной массы органа к массе тела и выражали в мг/кг массы тела животного. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов оценивали по уровню малонового диальдегида [5] и по уровню диеновых конъюгатов [2] в тканях. Активность супероксиддисмутазы определяли по методу Nishikimi [7] в модификации В.Н.Чумакова и Л.П.Осинской [4], активность каталазы по методу М.А.Королюка и соавт. [1], глутатионредуктазы по модифицированному нами методу Wendell P.Z. [8], глутатионпероксидазы по методу В.М. Моина [3], концентрация белка в тканях определялась по методу Лоури [6]. Полученные данные обрабатывались методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно проведенным ранее исследованиям на кафедре биоорганической химии совместно с лабораторией экспериментальной медицины ЦНИЛ БГМУ по отработке модели экспериментального гипотиреоза к 14-м суткам приема 0,02%-го раствора ПТУ крысами в качестве питья развивался выраженный гипотиреоз, при этом отмечалось снижение уровня тироксина на 56%, трийодтиронина на 93% и повышение уровня тиреотропного гормона на 61% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Развитие гипотиреоза подтверждалось также достоверным увеличением весового коэффициента щитовидной железы у крыс в 1,8 раза ($p < 0,02$). Так, относительная масса щитовидной железы увеличилась с $0,10 \pm 0,01$ мг/кг (группа контроля) до $0,18 \pm 0,02$ мг/кг (группа с экспериментальным гипотиреозом). Экспериментальные данные по изучению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени (таб.1) указывают на то, что гипотиреоз вызывает снижение уровня малонового диальдегида (МДА) на 35%* и диеновых конъюгатов (ДК) на 11% (по сравнению с группой контроля). Дополнительное стрессовое воздействие (гипокинезия в течение 3 часов) приводит к повышению уровня МДА на 20% и снижению уровня ДК на 18%* (по сравнению с группой «гипотиреоз»). В то же время не обнаружено достоверных изменений активности перекисного окисления липидов по наработке МДА у крыс с нормальным тиреоидным статусом, подвергнутых гипокинетическому стрессу.

Таблица 1

Состояние процессов перекисного окисления липидов по наработке малонового диальдегида и уровню диеновых конъюгатов в гомогенатах печени и мозга крыс

Группы животных	Малоновый диальдегид, мкМ / г ткани		Дневные коньюгаты, мМ/г ткани	
	печень	мозг	печень	мозг
Контроль	0.40 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.92 ± 0.03	0.36 ± 0.02
Гипотиреоз	0.26 ± 0.03 ¹⁾	0.38 ± 0.01 ¹⁾²⁾	0.82 ± 0.05 ²⁾	0.70 ± 0.05 ¹⁾
Стресс	0.41 ± 0.04 ²⁾	0.33 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.89 ± 0.05 ²⁾	0.35 ± 0.03 ²⁾
Гипотиреоз + стресс	0.31 ± 0.03	0.47 ± 0.01	0.67 ± 0.03	0.60 ± 0.01

1)-различия достоверны по сравнению с контролем при уровне значимости $p < 0,05$.

2)-различия достоверны по сравнению с группой гипотиреоз + стресс при уровне значимости $p < 0,05$.

В полной мере судить о состоянии окислительно-восстановительных процессов в организме экспериментальных животных невозможно без исследования активности ферментов антиоксидантной защиты. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в гомогенатах печени крыс при экспериментальном гипотиреозе повышалась на 7% (по сравнению с группой контроля), а при дополнительном стрессовом воздействии еще на 10%* (по сравнению с группой «гипотиреоз»), в то время как у интактных животных при гипокинезии активность СОД повышалась на 12% (по сравнению с контрольной группой) (таб.2). Активность каталазы (КАТ) при экспериментальном гипотиреозе в печени крыс снижалась на 24%* (по сравнению с группой контроля); при дополнительном стрессовом воздействии, как и при гипокинетическом стрессе у эутиреоидных крыс, достоверных изменений активности КАТ не обнаружено.

Таблица 2

Активность ферментов антиоксидантной защиты в гомогенатах печени и мозга крыс

Группы	СОД (ед./мг белка)		КАТ (мкМоль H ₂ O ₂ /мин*мг белка)		ГР (мМоль/4*мг белка)		ГП (мМоль/мг белка*мин)	
	печень	мозг	печень	мозг	печень	мозг	печень	мозг
К	49.21±3.4	4.97±0.2	1100.69±60.8	3.75±0.3	29.17±2.7	131.10±6.1	6.83±1.0	21.84±1.9
Г	52.86±1.9 ³⁾	2.60±0.2 ⁴⁾	837.92±82.7	3.70±0.2	36.15±1.7 ⁴⁾	114.40±4.5 ⁴⁾	6.58±0.5	11.84±2.6 ⁴⁾²⁾
С	54.91±3.8	5.82±0.2 ³⁾	1127.38±113.0 ³⁾	4.24±0.3	37.43±5.0	138.98±6.1 ²⁾	6.30±0.9	18.13±1.9 ³⁾
Г+С	58.22±1.5	2.25±0.2	813.57±27.3	3.84±0.4	30.52±3.1	113.29±3.9	7.78±1.3	26.05±1.2

1)-различия достоверны по сравнению с контролем при уровне значимости $p < 0,05$.

2)-различия достоверны по сравнению с группой гипотиреоз + стресс при уровне значимости $p < 0,05$.

Активность глутатионредуктазы (ГР) увеличивалась в гомогенатах печени у крыс с экспериментальным гипотиреозом на 24%* по сравнению с контрольной группой. Гипокинетический стресс у гипотиреоидных крыс приводил к снижению активности этого фермента на 16%* (по сравнению с

группой «гипотиреоз»). Хотя аналогичное воздействие на крыс с нормальным тиреоидным статусом вызывало активацию глутатионредуктазы в печени на 28%* по сравнению с контролем.

Активность глутатионпероксидазы (ГП) в гомогенатах печени достоверно не изменялась при экспериментальном гипотиреозе. Трехчасовая гипокинезия на фоне гипотиреоза вызывала увеличение активности ГП на 18%* (по сравнению с группой «гипотиреоз»), в то время как стресс у эутиреоидных крыс приводил к снижению активности этого фермента на 8% (по сравнению с группой контроля).

Результаты исследования процессов ПОЛ (таб.1) в тканях мозга показали, что гипотиреоз вызывал достоверное снижение уровня МДА на 12%* и увеличение уровня ДК на 92%* (по сравнению с группой контроля). Гипокинетический стресс у крыс с экспериментальным гипотиреозом приводил к увеличению уровня МДА в мозге крыс на 23,2%* и снижению уровня ДК на 14% (по сравнению с группой «гипотиреоз»). У эутиреоидных крыс, подвергшихся трехчасовой гипокинезии, уровень МДА и ДК снижался на 24%* и 2,5% соответственно (по сравнению с группой контроля). При исследовании активности ферментов антиоксидантной защиты в мозге крыс обнаружено (таб.2), что активность СОД при экспериментальном гипотиреозе по сравнению с контрольной группой снижалась практически вдвое (на 48%*), при дополнительном стрессовом воздействии еще на 14% (по сравнению с группой «гипотиреоз»), в то время как у крыс с нормальным тиреоидным статусом после трехчасовой гипокинезии активность СОД в мозге повышалась на 13% (по сравнению с группой контроля).

Активность ГР и ГП в мозге крыс с экспериментальным гипотиреозом снижалась соответственно на 13%* и 46%* (по сравнению с группой контроля). Гипокинетический стресс у гипотиреоидных крыс не приводил к достоверным изменениям активности ГР, но активность ГП в мозге возрастала более чем в два раза* (по сравнению с группой «гипотиреоз») и составила 120% от аналогичного показателя в группе контрольных животных. У крыс с нормальным тиреоидным статусом 3-х часовая гипокинезия приводила к снижению на 17%* активности ГП (по сравнению с группой контроля) в гомогенатах мозга и вызывала недостоверное увеличение активности ГР (на 6%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при гипотиреозе нарушается способность организма адекватно отвечать на такой стрессовый фактор как гипокинетический стресс, о чем свидетельствуют разнонаправленные изменения активности процессов ПОЛ и ферментов антиоксидантной защиты тканей при гипокинетическом стрессе у эутиреоидных крыс и при экспериментальном гипотиреозе.

Выводы:

1. Гипокинетический стресс у экспериментальных животных приводит к снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов в мозге, что, возможно, объясняется эффективной работой ферментов антиоксидантной защиты при пониженной метаболической активности.

2. Экспериментальный гипотиреоз приводит к снижению активности процессов перекисного окисления липидов и в мозге, и в печени, что сопровождается снижением активности супероксиддисмутазы,

глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы в мозге и каталазы в печени.

3. Гипокинезия на фоне гипотиреоза вызывает активацию процессов перекисного окисления липидов в печени и мозге экспериментальных животных, что сопровождается увеличением активности супероксиддисмутазы в печени и глутатионпероксидазы в исследованных тканях как наиболее мощных и значимых в обеспечении антиоксидантной защиты тканей.

Литература

1.Королюк М.А., Иванова А.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. Дело.-1988.-№ 1.-С. 16-19.

2. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов // Вопросы мед. химии.-1984.-Т. XXX.-№ 4.-С. 125-127.

3. Моин В.И. Простой и чувствительный метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело.-1986.-№ 12.-С. 724-727.

4. Чумаков В.Н., Осинская Л.Ф. Количественный метод определения активности цинк-, медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале // Вопросы мед.химии.-1977. – Т. XXIII.-№ 5.-С. 712-716.

5. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides // Lipids.-1980.-Vol. 15.-P. 137-140.

6. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent // Biol. Chem.-1951.-V. 193.-N. 1.-P. 265-275.

7. Nishikimi M.N., Appaji R., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen //Biochim. Biophys. Reseach. Communs.-1972.-V. 46.-N 2.-P. 849-854.

8.Wendell P.Z. Distribution of glutathion reductase and detection of glutathion-cystine transhydrogenax in rat tissues // Biochim. Biophys. Acta.-1968.-V. 159.-N. 1.-P. 179-181.