

*И.В. Романовский,
О.Н. Ринейская,
С.В. Глинник,
Т.П. Красненкова*

Перекисное окисление липидов, содержание свободных аминокислот в мозге крыс при гипокинетическом стрессе на фоне экспериментального гипотиреоза

Белорусский государственный медицинский университет

Исследовано влияние гипокинетического стресса на активность процессов перекисного окисления липидов, ферментов антиоксидантной защиты и содержание аминокислот в тканях мозга крыс с экспериментальным гипотиреозом. Обнаружено, что при гипокинетическом стрессе на фоне экспериментального гипотиреоза увеличивается интенсивность процессов перекисного окисления липидов в тканях мозга, наблюдается увеличение содержания в мозге гистидина, таурина и метионина, а также значительное возрастание концентрации глутаминовой кислоты. Ключевые слова: гипокинетический стресс, экспериментальный гипотиреоз, перекисное окисление липидов, антиоксидантный статус, свободные аминокислоты.

Стресс составляет важную часть повседневной жизни человека, повышая устойчивость к постоянно меняющимся факторам окружающей среды. Однако сверхсильный или слишком продолжительный хронический стресс становится потенциально опасным для психического или физического здоровья. В механизмах развития стресс-реакции значительная роль принадлежит тиреоидным гормонам. Заболевания щитовидной железы занимают одно из ведущих мест в патологии эндокринных органов. В Республике Беларусь серьезную проблему представляет гипотиреоз, что, вероятно, объясняется как недостаточным поступлением в организм человека йода и других микроэлементов вследствие их дефицита в почве и питьевой воде, так и влиянием антропогенных факторов окружающей среды. Необходимость изучения тонких механизмов патогенеза данного заболевания, сопровождающегося нарушением всех видов внутриклеточного метаболизма, объясняется тем, что заместительная терапия, используемая при лечении гипотиреоза, не обеспечивает в полной мере необходимый баланс гормонов щитовидной железы. По-видимому, недостаточно одной только гормональной коррекции, для того чтобы достичь оптимального качества жизни больного с врожденным или приобретенным гипотиреозом. В последние годы появились литературные данные о роли гормонов щитовидной железы в адаптивных реакциях организма [2]. В связи с этим, нам представляется необходимым изучение особенностей формирования ответной реакции организма на стрессовое воздействие в условиях недостаточного содержания тиреоидных гормонов. Особенно важны и интересны исследования, посвященные головному мозгу, деятельностью которого регулируется функционирование организма в изменившихся под воздействием стрессового фактора условиях. Изучение влияния гипотиреоза на состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и содержание некоторых аминокислот в тканях мозга в условиях стресса, вероятно, приблизит нас к пониманию взаимоотношений, складывающихся при данной патологии между окислительно-восстановительными процессами и нейромедиаторными системами

организма. Цель исследования – изучить влияние гипокинетического стресса на активность процессов ПОЛ, ферментов антиоксидантной защиты и содержание аминокислот в тканях мозга крыс с экспериментальным гипотиреозом.

Материал и методы

Работа выполнена на 32 крысах-самцах массой 180-200 г., которые были разделены на 4 группы (по 8 особей): 1 группа-интактные крысы, получавшие на протяжении эксперимента (14 суток) обычную воду (контроль); 2 группа-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); 3 группа-крысы с экспериментальным гипотиреозом, который создавался при употреблении в качестве питья 0,02 % раствора пропилтиоурацила (ПТУ) в течение 14 суток из поилок при постоянном доступе (0,78 мг ПТУ на 100 г массы тела в сутки) (гипотиреоз); 4 группа-крысы с экспериментальным гипотиреозом, который создавался при употреблении в качестве питья 0,02 % раствора ПТУ в течение 14 суток из поилок при постоянном доступе, подвергнутые на 14-е сутки гипокинезии (гипотиреоз+стресс). В настоящем исследовании использована пропилтиоурациловая модель экспериментального гипотиреоза [7], который создается благодаря тому, что ПТУ ингибирует образование тиреоидных гормонов, главным образом, на этапе органификации йода – включения йода в тирозильные фрагменты тиреоглобулина. Это обусловлено прямым ингибирующим действием на тиреопероксидазу, осуществляющую активацию йода и процесс йодирования ароматических колец тирозина в составе тиреоглобулина. ПТУ также ингибирует реакцию конъюгации моно-и дийодтирозинов, ведущую к образованию йодтиронинов в составе тиреоглобулина, которая является заключительной стадией образования предшественников активных гормонов щитовидной железы. Кроме того, ПТУ обладает способностью ингибировать 5'-дейодиназы периферических тканей, которые катализируют превращение тироксина в трийодтиронин. Животные умерщвлялись под тиопенталовым наркозом (60 – 80 мг/кг) забором крови из сонной артерии. Забор органов (большие полушария головного мозга, щитовидная железа) производился на холоду. Интенсивность процессов ПОЛ в тканях оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) [9]. Определялась активность супероксиддисмутазы (СОД) [6], каталазы [3], глутатионредуктазы (ГР) [11], глутатионпероксидазы (ГП) [5]; концентрация белка в тканях определялась по методу Лоури [10]. Для анализа аминокислот (глутаминовой кислоты, гистидина, таурина, серина, фенилаланина, метионина, аргинина) в тканях мозга использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [4]. 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 созданию модели экспериментального гипотиреоза к 14-м суткам приема 0,02%-го раствора ПТУ крысами в качестве питья развивается выраженный гипотиреоз, при этом отмечается снижение уровня трийодтиронина на 56%, тироксина на 93% и повышение уровня ТТГ на 61% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Развитие гипотиреоза подтверждается 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 3).

Таблица 1

Состояние процессов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях мозга крыс при гипокинетическом стрессе, экспериментальном гипотиреозе и при гипокинезии на фоне гипотиреоза.

Показатель	Контроль	Гипокинезия	Гипотиреоз	Гипотиреоз + гипокинезия
МДА (мкмоль/г ткани)	$0,43 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02^{12}$	$0,38 \pm 0,01^{12}$	$0,47 \pm 0,01$
СОД (ед./мг белка)	$4,97 \pm 0,24$	$5,62 \pm 0,23^{21}$	$2,60 \pm 0,16^{11}$	$2,25 \pm 0,16^{11}$
Каталаза (мкмоль \cdot Н $_2$ О $_2$ /мин \times мг белка)	$3,75 \pm 0,32$	$4,24 \pm 0,30$	$3,70 \pm 0,16$	$3,84 \pm 0,39$
ГР (мкмоль/ч \times мг белка)	$131,10 \pm 6,12$	$138,98 \pm 6,12^{21}$	$114,40 \pm 4,47^{11}$	$113,29 \pm 3,92^{11}$
ГП (мМоль/мг белка \times мин)	$21,84 \pm 1,91$	$18,13 \pm 1,90^{21}$	$11,84 \pm 2,63^{12}$	$26,05 \pm 1,16$

Различия достоверны по сравнению 1) с контролем; 2) с группой гипотиреоз + гипокинезия при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты исследования активности перекисного окисления липидов в тканях мозга (табл.1) крыс свидетельствуют о том, что гипотиреоз вызывал достоверное снижение уровня МДА на 12%. При этом обнаружено, что активность СОД при экспериментальном гипотиреозе по сравнению с контрольной группой уменьшалась практически вдвое (на 48%), а активность ГР и ГП снижалась соответственно на 13% и 46% (по сравнению с группой контроля). Гипокинетический стресс у крыс с экспериментальным гипотиреозом приводил к достоверному увеличению уровня МДА в мозге на 23,2% (по сравнению с группой 3), хотя гипокинезия у интактных животных (группа 2) сопровождался снижением на 24% интенсивности ПОЛ (по наработке МДА). В тканях мозга животных группы 4 не выявлено достоверных по сравнению с аналогичными показателями группы гипотиреозидных крыс изменений активности ферментов СОД, каталазы, ГР. Лишь активность ГП возрастает на 120%. Не обнаружено достоверных изменений активности каталазы в гомогенатах мозга при гипокинетическом стрессе как у эутиреозидных животных, так и в условиях экспериментального гипотиреоза.

Таблица 2

Содержание аминокислот (мкмоль/г) в тканях мозга крыс при гипокинетическом стрессе, экспериментальном гипотиреозе и при гипокинезии на фоне гипотиреоза.

Аминокислота	Контроль	Гипокинезия	Гипотиреоз	Гипотиреоз + гипокинезия
Глутаминовая кислота	$7,22 \pm 0,52$	$8,24 \pm 0,36^{21}$	$5,73 \pm 0,32^{12}$	$7,25 \pm 0,16$
Серин	$1,58 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,18$	$1,22 \pm 0,16$	$1,23 \pm 0,05^{11}$
Гистидин	$3,49 \pm 0,34$	$3,99 \pm 0,27$	$2,22 \pm 0,12^{12}$	$3,44 \pm 0,14$
Аргинин	$1,12 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,02^{11}$	$0,99 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,04^{11}$
Таурин	$4,76 \pm 0,65$	$4,89 \pm 0,20$	$3,63 \pm 0,29^{21}$	$4,60 \pm 0,15$
Метионин	$1,16 \pm 0,11$	$0,84 \pm 0,08^{12}$	$1,13 \pm 0,08$	$1,44 \pm 0,21$
Фенилаланин	$1,36 \pm 0,21$	$0,81 \pm 0,03^{12}$	$1,24 \pm 0,16^{21}$	$0,60 \pm 0,04^{11}$

Различия достоверны по сравнению 1) с контролем; 2) с группой гипотиреоз + стресс при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты проведенных исследований показали (табл. 2), что при экспериментальном гипотиреозе в тканях мозга крыс отмечается уменьшение содержания всех исследуемых аминокислот, но достоверно снижается лишь уровень глутаминовой кислоты (на 21%) и гистидина (на 37% по сравнению с группой 1). Гипокинезия в течение 3 часов приводила к уменьшению в тканях мозга крыс на 19% содержания аргинина, на 28% содержания метионина и на 48,5%-фенилаланина по сравнению с группой контроля. Гипокинетический стресс на фоне гипотиреоза вызывал уменьшение на 52% содержания в мозге фенилаланина, а также увеличение на 55% концентрации гистидина и на 26%-таурина и глутаминовой кислоты (по сравнению с группой 3).

Интенсивность процессов ПОЛ в тканях мозга в известной мере может оказывать влияние на функциональное состояние нервной системы. Нервная ткань характеризуется относительно высоким уровнем липидной перекисидации по сравнению с другими тканями. Косвенным свидетельством необходимости высокой интенсивности перекисного окисления липидов служат данные о чрезвычайно низкой активности в этой ткани ферментов антиоксидантной защиты. Таким образом, экспериментальный гипотиреоз приводил к снижению активности ферментов антиоксидантной защиты больших полушарий мозга, при этом уменьшалась активность и процессов ПОЛ, что, вероятно, является следствием общего снижения окислительных процессов в организме при данной патологии. Ограничение двигательной активности сопровождается глубокими нарушениями обменных процессов, что снижает адаптационные возможности организма. Гипокинезия сопровождается нарушением тонуса сосудов головного мозга, нередко вазоспазмом, снижением скорости доставки к тканям питательных веществ – субстратов для синтеза белков, фосфолипидов, нейромедиаторов [1]. Гипокинезия в течение 3-х часов, однако, не приводила к нарушению деятельности ферментов антиоксидантной защиты тканей мозга, проявлением чего стало уменьшение интенсивности процессов ПОЛ непосредственно после окончания действия стрессового фактора. В условиях дефицита тиреоидных гормонов после гипокинезии наблюдалось увеличение интенсивности процессов ПОЛ, при этом не обнаружено существенных изменений активности ферментов антиоксидантной защиты, за исключением активности глутатионпероксидазы. Полученные данные, возможно, следует расценивать как нарушение координированной деятельности ферментативной антиоксидантной системы тканей мозга при гипокинетическом стрессе на фоне экспериментального гипотиреоза. Результаты эксперимента указывают на разнонаправленные изменения содержания различных аминокислот при гипотиреозе, гипокинезии и гипокинетическом стрессе на фоне гипотиреоза. При экспериментальном гипотиреозе в большей или меньшей мере отмечается снижение содержания всех исследуемых аминокислот. По-видимому, важным является значительное уменьшение концентрации глутаминовой кислоты, не только являющейся возбуждающим нейротрансмиттером, но и предшественником γ -аминомасляной кислоты-тормозного нейромедиатора. Гипокинетический стресс сопровождается уменьшением содержания в больших полушариях мозга аргинина – аминокислоты, при окислении которой образуется оксид азота, участвующий в регуляции церебрального кровотока и установлении межнейрональных связей.

Гипокинезия у гипотиреоидных крыс приводит к увеличению содержания в мозге гистидина, серусодержащих аминокислот-таурина и метионина, а также к значительному возрастанию концентрации глутаминовой кислоты. Изменение активности процессов ПОЛ и уровня свободных аминокислот в больших полушариях мозга крыс при экспериментальном гипотиреозе, а также при стрессовом воздействии на фоне гипотиреоза может являться одной из причин нарушения координированной деятельности всех структурных компонентов нервных клеток, обеспечивающих в данных условиях адекватное функционирование центральной нервной системы.

Литература

1. Акопян В.П., Соцкий О.П., Маилян К.Р. и др. Влияние ГАМК и пирацетама на АТФ-азную активность митохондрий мозга и печени в условиях экспериментальной гипокинезии // Вопросы мед. химии.-1999.-№5.-С.225 – 227.
2. Городецкая И.В., Божко А.П. Значение малых доз экзогенных тиреоидных гормонов в сохранении свободнорадикального гомеостаза миокарда и тиреоидного статуса в условиях антагонистических стрессов // Здравоохранение.-2000.-№ 1.-С. 13-15.
3. Королюк М.А., Иванова А.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.-1988.-№ 1.-С. 16-19.
4. Красненкова Т.П., Ринейская О.Н. Использование ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием // Сб. работ «Труды молодых ученых БГМУ»-2005.-С. 73-77.
5. Моин В.И. Простой и чувствительный метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело.-1986.-№ 12.-С. 724-727.
6. Чумаков В.Н., Осинская Л.Ф. Количественный метод определения активности цинк-, медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале // Вопросы мед.химии.-1977.-Т. XXIII.-№ 6.-С. 712-716.
7. Щитовидная железа /под ред. А.И. Кубарко/-Минск-Нагасаки, 1998.-С.368.
8. Яворская В.А., Малахов В.А., Белоус А.М. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах при начальных формах сосудистых заболеваний головного мозга // Неврологич. вестник.-1995.-вып. 3-4.-С.15-17.
9. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituricacid test, for detecting lipid hydroperoxides // Lipids.-1980.-Vol. 15.-P. 137-140.
10. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent // Biol. Chem.-1951.-V. 193.-N. 1.-P. 265-275.
11. Wendell P.Z. Distribution of glutathione reductase and detection of glutathione-cystine transhydrogenax in rat tissues // Biochim. Biophys. Acta.-1968.-V. 159.-N. 1.-P. 179-181.