

*С.В. Глинник,  
О.Н. Ринейская,  
И.В. Романовский*

**Состояние процессов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты печени и мозга крыс при холодовом стрессе на фоне экспериментального гипотиреоза**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Исследовано влияние холодового стресса на активность процессов перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты в печени и мозге крыс с экспериментальным гипотиреозом. Обнаружено повышение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в печени при холодовом стрессе на фоне гипотиреоза, несмотря на возрастание активности ферментов антиоксидантной защиты. В мозге гипотиреоидных животных при переохлаждении активность ферментов антиоксидантной защиты повышалась, что, по-видимому, предотвращало увеличение интенсивности свободно-радикальных процессов. Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, холодовой стресс, перекисное окисление липидов.

Стресс является отражением всех адаптивных реакций организма, неспецифических биологических феноменов, возникающих в ответ на действие различных раздражителей и направленных на реализацию приспособительных механизмов, адаптирующих организм к стрессовому воздействию [5]. Важное место в реализации адаптивно-приспособительных реакций организма занимают гормоны щитовидной железы, которые способны мобилизовать резервы организма для устранения повреждений, вызванных действием стрессового фактора [6, 10]. Учитывая высокую распространенность врожденного и приобретенного гипотиреоза в Республике Беларусь, нам представлялось необходимым изучение особенностей формирования ответной реакции организма на стрессовое воздействие в условиях недостаточной функции щитовидной железы, а поскольку тиреоидные гормоны имеют непосредственное отношение к терморегуляции, то в качестве стрессового фактора нами было выбрано холодовое воздействие.

Цель исследования – изучить влияние холодового стресса на активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ферментов антиоксидантной защиты в печени и мозге крыс с экспериментальным гипотиреозом.

Материал и методы

Экспериментальная часть работы состояла из двух серий. В первой серии (16 крыс-самцов, массой 180-200 г) оценивалась степень выраженности холодового стресса по нарушению индивидуального поведения животных при помощи теста «открытое поле» [1]. Холодовой стресс создавался путем помещения крыс в воду с температурой 10°C на 10 минут. Ректальную

температуру до и после стрессового воздействия измеряли при помощи электротермометра. Вторая серия эксперимента выполнена на 32 крысах, которые были разделены на 4 группы (по 8 особей в каждой): 1 группа – интактные крысы, получавшие на протяжении эксперимента (14 суток) обычную воду; 2 группа – крысы, получавшие на протяжении двух недель обычную воду и на 14-е сутки подвергнутые холодовому стрессу; 3 группа – крысы с экспериментальным гипотиреозом, который развивался при употреблении в качестве питья 0,02 %-ного раствора пропилтиоурацила (ПТУ) в течение 14 суток (0,78 мг ПТУ на 100 г массы тела в сутки) [8]; 4 группа – крысы с экспериментальным гипотиреозом, подвергнутые на 14-е сутки холодовому стрессу.

Животных умерщвляли под тиопенталовым наркозом (60-80 мг/кг) путем забора крови из сонной артерии. Исследуемые органы (печень, мозг, щитовидная железа, надпочечники) забирались при 0°C. Массу щитовидной железы и надпочечников измеряли взвешиванием на электронных весах (Госметр, Россия). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) [9] в гомогенатах печени и мозга. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу Nishikimi в модификации В.Н.Чумакова и Л.П.Осинской [7], активность каталазы – по методу М.А.Королюка и соавт. [3], глутатионредуктазы (ГР) – по модифицированному нами методу Wendell P.Z. [12], глутатионпероксидазы (ГП) – по методу В.М. Моина [4], концентрация белка в тканях определялась по методу Лоури [11]. Статистическая обработка выполнена с помощью программного пакета Statistica 6.0. Данные представлены в таблицах как медиана и 50% интерквартильный размах, а также описываются в тексте в виде относительных величин. Для оценки достоверности различий между группами использовали тест Манна-Уитни (достоверными считались различия при  $P < 0,05$ ).

#### Результаты и обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о значительной выраженности холодового стресса, вызванного путем погружения экспериментальных животных в воду с температурой 100С на 10 мин. Ректальная температура непосредственно после окончания холодового воздействия не достигала 340С. Через 30 мин этот показатель составлял 34,50С (34,0-35,30С). Только через один час после окончания эксперимента температура возвращалась к норме и составляла 36,50С (36,20С-36,80С), что соответствовало ректальной температуре у контрольных животных. Выраженность стресс-реакции оценивали также при помощи теста «открытое поле», в котором было обнаружено снижение на 63,3% ориентировочно-исследовательской активности и возрастание эмоциональности крыс в 6 раз в ответ на холодовое воздействие. Также наблюдалось достоверное увеличение на 18% массы надпочечников и двукратное увеличение уровня кортизола (с 27 (25-36) нмоль/л до 54 (52-56) нмоль/л) в сыворотке крови животных, подвергнутых переохлаждению. Полученные результаты позволили сделать

закключение о том, что создаваемый нами холодовой стресс был достаточно сильным [2].

Экспериментальные данные по изучению процессов ПОЛ в печени лабораторных животных (табл. 1) указывают на то, что холодовой стресс вызывал достоверное снижение активности большинства исследованных ферментов антиоксидантной защиты. Активность СОД, фермента, инактивирующего супероксидный анион-радикал, снижалась на 40%; ГП, катализирующей разложение перекиси водорода и других гидроперекисей – на 77%; ГР, фермента, поддерживающего уровень восстановленного глутатиона в клетке – на 20%. Падение активности ферментов антиоксидантной защиты при переохлаждении закономерно сопровождалось интенсификацией процессов ПОЛ в печени, о чем свидетельствует достоверное повышение уровня МДА на 46% (по сравнению с группой контрольных животных).

Таблица 1

Состояние процессов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты в печени крыс при холодовом стрессе, экспериментальном гипотиреозе и при холодовом стрессе на фоне гипотиреоза

Показатель	Группа животных			
	Контроль	Холодовой стресс	Гипотиреоз	Гипотиреоз + стресс
МДА, мкмоль/г ткани	0,22 (0,20 - 0,23) **	0,33 (0,29 - 0,40) *	0,16 (0,15 - 0,19) ***	0,35 (0,31 - 0,42) *
СОД, ед./ мг белка	51,80 (46,35 - 59,45)	31,30 (29,50 - 35,20) ***	29,43 (24,0 - 36,6) ***	45,44 (39,55 - 48,03)
Каталаза, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / мин мг белка	305,19 (260,82 - 75,01)	405,85 (353,60 - 439,94) **	329,25 (262,36 - 351,70)**	519,225 (448,76 - 552,90)
ГР, ммоль НАДФН·Н <sup>-</sup> / мг белка · ч	42,87 (37,58 - 45,72)	34,37 (30,10 - 37,39) ***	29,70 (27,25 - 32,25) ***	47,59 (41,76 - 51,99)
ГП, мкмоль восст. глут. / мг белка мин	11,36 (10,09 - 12,31)	2,67 (2,09 - 2,86) ***	10,04 (7,40 - 17,70)	10,61 (8,45 - 14,10)

\* Различия достоверны по сравнению с группой контроля (P < 0,05).

\*\* Различия достоверны по сравнению с группой «гипотиреоз + стресс» (P < 0,05).

Оценивая изменения аналогичных показателей в мозге экспериментальных животных (табл. 2) мы обнаружили незначительную (по сравнению с печенью) активацию процессов ПОЛ в ответ на холодовое воздействие: концентрация ТБК-активных продуктов в мозге увеличилась с 0,32 (0,3-0,33) мкмоль/г ткани по 0,35 (0,3-0,33) мкмоль/г ткани. Активность СОД в мозге в ответ на холодовой стресс уменьшалась незначительно по сравнению с изменением аналогичного показателя в печени – лишь на 15%. Однако, наблюдалось достоверное повышение каталитической активности других ферментов антиоксидантной защиты мозга: ГР – на 18%, ГП – на 50% (по сравнению с группой «контроль»). Активность каталазы, главного фермента связанного с расщеплением перекиси водорода, при холодовом стрессе увеличилась с 5,17 (4,51-5,60) до 8,45 (7,37 – 9,52) мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / мин - мг белка (63%). Обнаруженное повышение активности отмеченных выше антиоксидантных ферментов в мозге при стрессовом воздействии, по-видимому, позволило предотвратить значительное повышение интенсивности процессов ПОЛ и, вероятно, свидетельствовало о сохранении регуляторных связей в системе антиоксидантной защиты мозга в целом.

Таблица 2

Состояние процессов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты в мозге крыс при холододовом стрессе, экспериментальном гипотиреозе и при холододовом стрессе на фоне гипотиреоза

Показатель	Группа животных			
	Контроль	Холододовый стресс	Гипотиреоз	Гипотиреоз + стресс
МДА, мкмоль/г ткани	0,32 (0,3 - 0,33)	0,35 (0,3 - 0,33) *	0,37 (0,35 - 0,39) *	0,35 (0,32 - 0,38) *
СОД, ед./ мг белка	4,11 (4,03 - 4,32)	3,48 (3,39 - 3,59) ***	3,65 (3,40 - 3,68) **	4,1 (3,99 - 4,37)
Каталаза, мкмоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> / мин мг белка	5,17 (4,51 - 5,6)	8,45 (7,37 - 9,52) *	5,96 (4,1 - 6,5) **	9,16 (7,7 - 9,18) *
ГР, ммоль НАДФН·Н <sup>-</sup> / мг белка · ч	56,9 (50,8 - 60,4)	67,1 (63,5 - 70,1) *	64,5 (59,9 - 69,1)	62,2 (57,5 - 70,3)
ГП, мкмоль восст. глут. / мг белка мин	8,7 (7,1 - 10,1)	13,1 (11,5 - 15,1) *	6,96 (5,12 - 8,8) **	11,6 (10,1 - 13,2) *

\* Различия достоверны по сравнению с группой контроля ( $P < 0,05$ ).

\*\* Различия достоверны по сравнению с группой «гипотиреоз + стресс» ( $P < 0,05$ ).

Для создания экспериментального гипотиреоза использовалась пропилтиоурациловая модель, отработанная на кафедре биоорганической химии совместно с лабораторией экспериментальной медицины, фармакологии и токсикологии ЦНИЛ БГМУ. К 14-м суткам приема 0,02%-го раствора ПТУ развивался выраженный гипотиреоз, что подтверждалось достоверным снижением уровня тироксина на 79%, трийодтиронина на 54%, а также увеличением массы щитовидной железы у крыс в 1,8 раза. Гипотиреоидное состояние, характеризующееся, как известно, снижением скорости обменных процессов, сопровождалось достоверным уменьшением интенсивности процессов ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной защиты печени экспериментальных животных (табл. 1). Уровень МДА в печени крыс при гипотиреозе снижался на 27%, активность СОД, ГП и ГР уменьшалась соответственно на 43%, 12% и 31%. Однако, в мозге крыс с гипофункцией щитовидной железы каталитическая активность антиоксидантных ферментов изменялась разнонаправленно (табл. 2). Снижалась активность СОД и ГП (на 11% и 20% соответственно), увеличивалась активность каталазы на 15% и ГР на 13%.

У животных с экспериментальным гипотиреозом холододовый стресс вызвал выраженную активацию процессов ПОЛ в печени (табл. 1): уровень МДА увеличился в 2,2 раза. При этом обнаружено повышение активности

ферментов антиоксидантной защиты (активность СОД повышалась на 54%, каталазы на 58%, ГР на 60% и ГП на 6% (по сравнению с группой «гипотиреоз»). В мозге гипотиреоидных крыс подвергнутых переохлаждению (табл. 2) наблюдалось возрастание активности СОД с 3,65 до 4,1 ед./ мг белка, каталазы – на 54% и ГП в 1,7 раза (по сравнению с группой «гипотиреоз»). Последнее, вероятно, обусловило отсутствие достоверных изменений интенсивности процессов ПОЛ (по уровню МДА) в мозге крыс, что свидетельствует об определенной автономии ферментативных антиоксидантных систем мозга и их меньшей чувствительности к недостатку тиреоидных гормонов.

#### Выводы

1. Выраженная стресс-реакция организма экспериментальных животных на холодовое воздействие сопровождалась снижением активности ферментов антиоксидантной защиты печени и повышением активности ферментов антиоксидантной защиты мозга.

2. При холодовом стрессе на фоне гипотиреоза наблюдалось повышение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в печени (по уровню ТБК-активных продуктов) несмотря на возрастание активности ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза и глутатионпероксидаза.

3. Холодовое воздействие на гипотиреоидных животных приводило к активации ферментов антиоксидантной защиты мозга, что, по-видимому, предотвращало увеличение интенсивности свободно-радикальных процессов.

#### Литература

1. Бородин, П.М., Шюлер, Л.Н., Беляев, Д.К. Проблемы генетики стресса. Сообщение 1. Генетический анализ поведения мышей в стрессирующей ситуации // Генетика.-1976.-Т.12.-С. 62-70.

2. Глинник, С. В., Романовский, И. В., Ринейская, О. Н., Картун, Л.В., Ходосовская, Е.В. Гормональный статус и состояние системы перекисного окисления липидов в ткани мозга крыс при холодовом стрессе на фоне экспериментального гипотиреоза. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук.-2007.-№ 2. С. 55-59.

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

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

5. Селье, Г. Стресс без дистресса. М.: Прогресс.-1982.-122 с.

6. Хоч, Н.С., Лопухова, В.В., Грацианова, А.Д. // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1994.-Т. 118.-№ 11.-С. 523-528.

7. 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.

8. Щитовидная железа / Под ред. А.И. Кубарко.-Минск – Нагасаки.-1998.-С. 112-132.

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

10. Langer, P., Foldes, O., Kvetnansky, R. // *Exp. Clin. Endocrinol.* 1983.-Vol. 82.-N 3.-P. 51-60.

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

12. Wendell, P.Z. Distribution of glutathione reductase and detection of glutathione-cystine transhydrogenase in rat tissues // *Biochim. Biophys. Acta.*-1968.-V. 159.-N. 1.-P. 179-181.