

УДК: 616.441-008.64:612.66

Особенности формирования оксидативного стресса у крыс разного возраста с тиреоидной недостаточностью
Хаддад Аїхам Алі, В.В.Давыдов

Харьковская медицинская академия последипломного образования (Харьков, Украина)

Целью работы было исследование возрастных особенностей проявления оксидативного стресса в субклеточных фракциях полушарий головного мозга крыс с экспериментальной недостаточностью щитовидной железы. Установлено, что у взрослых крыс и животных пубертатного возраста при экспериментальном гипотиреозе в мозге возникает состояние оксидативного стресса, проявлением которого служит накопление в митохондриальной и микросомальной фракции мозга продуктов свободнорадикального окисления липидов и карбонилированных белков. При гипотиреозе у животных обеих исследованных возрастных групп ограничивается эффективность реализации прооксидантного действия физической нагрузки на митохондрии мозга.

Ключевые слова: *мозг, гипотиреоз, оксидативный стресс, перекисное окисление липидов, свободнорадикальное окисление белков.*

Введение

Из литературы известно, что недостаточность щитовидной железы сопровождается появлением нарушений со стороны ЦНС (Зефирова, 1999). Механизм их возникновения до настоящего времени не изучен. Анализируя данные литературы по этому вопросу, можно предположить существование определенной взаимосвязи между формированием сдвигов в функционировании головного мозга и возникновением оксидативного стресса в организме при гипотиреозе (Das, Chaiy, 2004), к повреждающему действию которого мозг проявляет высокую чувствительность. Вместе с тем, до настоящего времени в литературе все еще отсутствуют представления о состоянии свободнорадикальных процессов в головном мозге при недостаточности функции щитовидной железы. Принимая во внимание современные представления о физиологической роли оксидативного стресса (Schoneich, Sharov, 2006), следует обратить внимание на то, что существенно больший интерес, чем просто определение базального уровня процессов свободнорадикального окисления, представляет изучение особенностей реализации в мозге при гипотиреозе эффекта прооксидантных факторов. Подобные факторы появляются в организме под воздействием различных стрессоров и, в том числе, при интенсивной физической нагрузке (Urso, Clarkson, 2003; Джазаэрли, Давыдов, 2006а).

Ввиду существования особенностей в проявлении гипотиреоза у детей и подростков и их значения в возникновении тяжелых осложнений этого заболевания в более зрелом возрасте (Браверман, 2000), большой интерес представляет изучение возрастных аспектов данной проблемы. Учитывая все вышеизложенное, в настоящей работе были изучены возрастные особенности изменения свободнорадикального окисления белков и липидов в субклеточных фракциях полушарий головного мозга крыс при экспериментальном гипотиреозе в норме и в условиях интенсивной физической нагрузки (ИФН).

Методика

Работа выполнена на 28 крысах-самцах линии Вистар. Использовали животных пубертатного (1,5-месячные) возраста, а также взрослых половозрелых крыс (12-месячные). Животных обеих возрастных групп делили на 4 подгруппы: 1 – интактные, 2 – крысы, которых подвергали плаванию «до отказа», 3 – животные, у которых воспроизводили экспериментальный гипотиреоз, путем ежедневного в течение 15 дней внутрибрюшинного введения мерказолила из расчета 1 мг на 100 г массы (Krasilnikova et al., 2002), и 4 – крысы с гипотиреозом, которых подвергали плаванию «до отказа».

Эффективность воспроизведения гипотиреоза на использованной модели подтверждали результатами исследования концентрации ТТГ (тиреотропного гормона), тироксина и трийодтиронина в крови (Джазаэрли, Давыдов, 2006б).

Животных декапитуировали. Экстирпировали головной мозг, который немедленно помещался в 0,9% раствор хлористого натрия, охлажденный до 4°C. Выделяли большие полушария головного мозга, отмывали от крови и использовали для приготовления 10% гомогенатов на 0,32 М сахарозе (рН 7,4). Гомогенаты центрифугировали в течение 10 минут при 1000 g. Надосадочную жидкость вновь подвергали центрифугированию при 10000 g в течение 20 минут. Надосадочную

(постмитохондриальную) фракцию использовали для получения микросом (Де Пьер, Дальнер, 1979), а осадок суспензировали с 5 мл 0,32 М сахарозы (рН 7,4) и повторно центрифугировали 20 минут при 10000 g. Отмытый осадок суспензировали с 2 мл изотонического раствора хлористого натрия и использовали в работе в качестве грубой митохондриальной фракции.

В пробах митохондриальной, постмитохондриальной и микросомальной фракции определяли содержание карбонилированных белков (Дубинина, 2000), флюоресцирующих соединений типа оснований Шиффа (Rice-Evans et al., 1991) и диеновых конъюгатов (Стальная, 1977). В митохондриальной и микросомальной фракции измеряли скорость индуцированного свободнорадикального окисления белков и липидов (Вьюшина и др., 2002). Расчет интенсивности индуцированного свободнорадикального окисления липидов (ПОЛ) проводили по скорости накопления в реакционной смеси веществ, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой (Muller et al., 1986).

В митохондриальной и постмитохондриальной фракции измеряли активность ферментов первой линии антиоксидантной защиты – каталазы (Барабой и др., 1991) и супероксиддисмутазы (СОД) (Костюк, 1990) и рассчитывали индекс соотношения их активности.

Содержание белка в пробах определяли по методу O.Lowry.

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью непараметрического метода Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в митохондриях мозга взрослых крыс при ИФН и гипотиреозе возникает оксидативный стресс (табл. 1). Он проявляется накоплением в них продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов и шиффовых оснований), а также карбонилированных белков, фенолгидразоны которых имеют максимум светопоглощения, соответствующий 370 нм. Характерно, что уровень накопления продуктов свободнорадикального окисления липидов в митохондриях мозга при гипотиреозе меньше, чем после ИФН.

Таблица 1.

Изменение содержания продуктов свободнорадикального окисления в субклеточных фракциях мозга 12-месячных крыс с гипотиреозом под влиянием физической нагрузки ($M \pm m$; $n=5-6$)

Показатель	Группа животных			
	Интактные	ИФН	Гипотиреоз	Гипотиреоз+ИФН
Митохондриальная фракция				
ДК нмоль/мг белка	** 0,12 ± 0,01	* 0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,04	*** 0,11 ± 0,01
ШО мкмоль/мг белка	** 0,42 ± 0,04	* 0,83 ± 0,04	* 0,65 ± 0,06	0,52 ± 0,04
КБ ₃₆₃ нмоль/мг белка	5,8 ± 0,9	7,6 ± 1,0	4,6 ± 0,4	4,2 ± 0,4
КБ ₃₇₀ нмоль/мг белка	4,6 ± 0,5	* 11,8 ± 1,1	* 8,8 ± 0,8	7,2 ± 1,3
Микросомальная фракция				
ДК нмоль/мг белка	** 1,12 ± 0,01	* 3,9 ± 0,3	* 4,3 ± 0,9	* 3,8 ± 0,3
ШО мкмоль/мг белка	6,7 ± 0,04	7,2 ± 0,3	7,3 ± 0,5	6,2 ± 0,4
КБ ₃₆₃ нмоль/мг белка	** 17,6 ± 1,5	21,2 ± 0,9	24,1 ± 3,0	25,6 ± 6,3
КБ ₃₇₀ нмоль/мг белка	** 16,1 ± 0,7	14,3 ± 1,2	18,4 ± 1,3	* 23,8 ± 3,6

Примечание: ДК – диеновые конъюгаты, ШО – шиффовы основания, КБ₃₆₃ – карбонилированные белки с максимумом светопоглощения фенолгидразонов при 363 нм, КБ₃₇₀ – карбонилированные белки с максимумом светопоглощения фенолгидразонов при 370 нм; * – $P < 0,05$ к интактным; ** – $P < 0,05$ к интактным 1,5-месячным; *** – $P < 0,05$ к животным с гипотиреозом.

У гипотиреодных крыс происходит выраженное ограничение эффективности реализации прооксидантного действия ИФН на митохондрии мозга. Как видно из табл. 1, у животных с гипотиреозом после выполнения физической нагрузки содержание всех исследованных продуктов свободнорадикального окисления не отличается от такового у интактных крыс ($P>0,05$). Вместе с тем, концентрация продуктов свободнорадикального окисления в митохондриях мозга оказывается у них значительно ниже, чем у крыс без гипотиреоза, подвергнутых физической нагрузке. Одновременно у крыс с гипотиреозом, подвергнутых ИФН, исчезает обусловленный физической нагрузкой эффект стимуляции индуцированного ПОЛ в митохондриях (рис. 1). Характерно, что формирование подобного сдвига не связано с нарушением функционирования митохондриальных ферментов первой линии антиоксидантной защиты (рис. 2).

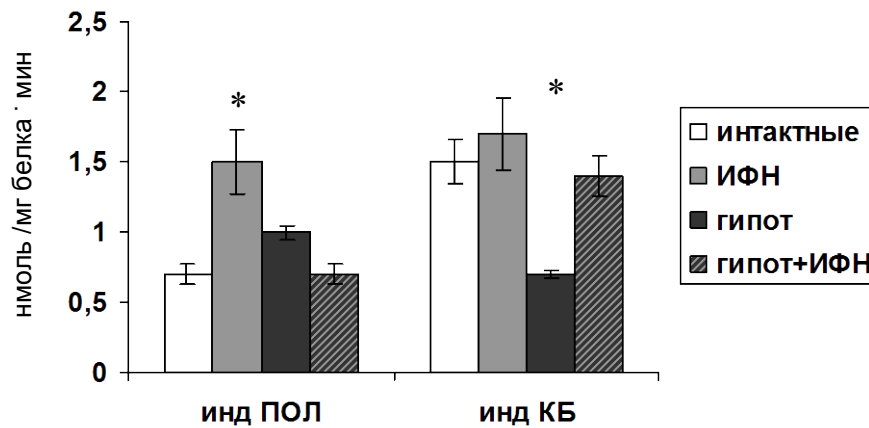


Рис. 1. Скорость индуцированного ПОЛ (инд ПОЛ) и индуцированного накопления карбонилированных белков (инд КБ) в митохондриальной фракции мозга взрослых крыс с гипотиреозом и после ИФН. По результатам экспериментов на 5–6 крысах.

* – $P<0,05$ к интактным;

ИФН – интенсивная физическая нагрузка, гипот – экспериментальный гипотиреоз, гипот+ИФН – интенсивная физическая нагрузка у крыс с гипотиреозом.

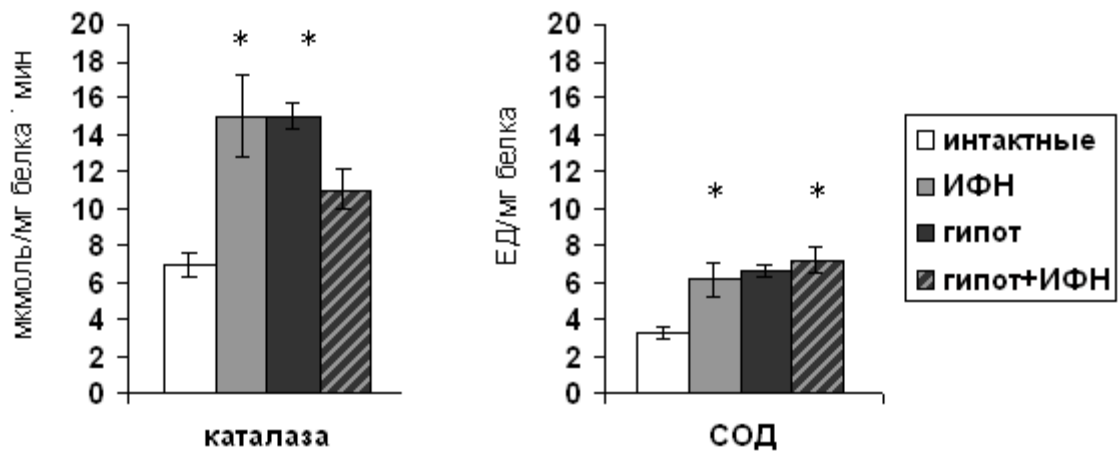


Рис. 2. Активность каталазы (мкмоль/мг белка · мин) и СОД (ЕД/мг белка) в митохондриальной фракции мозга взрослых крыс с гипотиреозом и после ИФН. По результатам экспериментов на 5–6 крысах.

* – $P<0,05$ к интактным;

ИФН – интенсивная физическая нагрузка, гипот – экспериментальный гипотиреоз, гипот+ИФН – интенсивная физическая нагрузка у крыс с гипотиреозом.

Таким образом, при гипотиреозе в митохондриях мозга формируются условия для ограничения проявлений прооксидантного эффекта физической нагрузки. Одной из причин этого может быть

повышение устойчивости митохондрий к действию прооксидантов, отражением чего служит понижение в них скорости индуцированного ПОЛ. Возникновению этого сдвига, в свою очередь, предрасполагает увеличение содержания в митохондриях мозга при гипотиреозе продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов.

Сдвиги аналогичной направленности возникают и у крыс пубертатного возраста (табл. 2). Однако спектр их проявлений значительно меньше, чем у взрослых животных. Установлено, что у крыс этой возрастной группы после ИФН и при экспериментальном гипотиреозе происходит увеличение концентрации карбонилированных белков с максимумом поглощения фенолгидразонов, соответствующим 363 нм. Величина других исследованных показателей у них остается на уровне интактных. Обнаруженный факт подтверждает точку зрения о том, что белки являются более чувствительной мишенью свободных радикалов, чем липиды (Reinheckel et al., 1998). На его основании можно констатировать возникновение оксидативного стресса в митохондриях мозга у крыс пубертатного возраста после ИФН и при экспериментальном гипотиреозе. Как и у взрослых животных, гипотиреоз у 1,5-месячных крыс ограничивает проявление прооксидантного действия физической нагрузки.

Таблица 2.

Изменение содержание продуктов свободнорадикального окисления в субклеточных фракциях мозга 1,5-месячных крыс с гипотиреозом под влиянием физической нагрузки ($M \pm m$; $n=5-6$)

Показатель	Группа животных			
	Интактные	ИФН	Гипотиреоз	Гипотиреоз+ИФН
Митохондриальная фракция				
ДК нмоль/мг белка	0,31 ± 0,03	0,39 ± 0,09	0,22 ± 0,02	0,15 ± 0,03
ШО мкмоль/мг белка	0,84 ± 0,06	0,72 ± 0,07	0,57 ± 0,03	0,50 ± 0,04
КБ ₃₆₃ нмоль/мг белка	4,6 ± 0,5	10,2 ± 0,7	8,1 ± 0,4	7,5 ± 1,4
КБ ₃₇₀ нмоль/мг белка	5,9 ± 0,8	7,5 ± 1,0	4,8 ± 0,5	3,8 ± 0,3
Микросомальная фракция				
ДК нмоль/мг белка	2,3 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,3	4,7 ± 0,7
ШО мкмоль/мг белка	7,4 ± 0,6	7,3 ± 0,3	8,6 ± 0,6	10,9 ± 1,2
КБ ₃₆₃ нмоль/мг белка	24,2 ± 1,8	33,3 ± 7,7	34,5 ± 5,2	39,9 ± 7,3
КБ ₃₇₀ нмоль/мг белка	23,4 ± 1,8	26,0 ± 6,3	29,3 ± 3,4	27,2 ± 2,9

Примечание: Обозначения те же, что и в таблице 1.

Оценивая причины понижения чувствительности мозга к действию прооксидантных факторов в периоде полового созревания, можно предполагать особое значение в том возрастных различий в базальном уровне содержания продуктов свободнорадикального окисления в митохондриях. Действительно, как видно из табл. 2, концентрация продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов и шиффовых оснований) в митохондриях мозга крыс пубертатного возраста существенно выше, чем у взрослых животных. Накопление продуктов окисления липидов и белков в митохондриальных мембранах способствует понижению их чувствительности к инициации свободнорадикальных процессов. С подобным предположением согласуются результаты экспериментов, связанных с изучением скорости индуцированного накопления карбонилированных белков, но не данные о состоянии индуцированного ПОЛ (рис. 1). В этой связи, более корректным представляется мнение о том, что обнаруженные возрастные различия в базальном уровне свободнорадикального окисления

липидов в митохондриях обусловлены возрастными различиями в насыщенности липидов митохондрий.

Подобно митохондриям, в микросомальной фракции мозга при ИФН и экспериментальном гипотиреозе тоже усиливаются процессы свободнорадикального окисления (табл. 1 и 2). Однако возникающий в ней сдвиг имеет более ограниченный и не зависимый от возраста характер. Его проявлением при ИФН и экспериментальном гипотиреозе служит накопление первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов). В отличие от митохондрий, накопление диеновых конъюгатов в микросомах происходит в равной мере при ИФН, как у животных с гипотиреозом, так и без него.

Различия в интенсивности стимуляции свободнорадикальных процессов в митохондриях и микросомах мозга могут быть обусловлены их неодинаковой ролью в процессе радикалообразования в нервных клетках. Основное значение в формировании оксидативного стресса в них имеют митохондрии, чему способствует интенсивный аэробный обмен мозга. Более того, усиление ПОЛ в микросомах мозга при гипотиреозе и ИФН может возникать вследствие стимуляции радикалообразования в митохондриях.

Оценивая результаты проведенных исследований, можно придти к заключению о том, что при гипотиреозе в мозге возникает состояние оксидативного стресса, обусловленное усилением процессов радикалообразования в митохондриях нервных клеток. Следствием его возникновения становится накопление в них продуктов свободнорадикального окисления липидов и карбонилированных белков. В результате этого формируются предпосылки для ограничения эффекта прооксидантных факторов, подтверждением чего служат данные об уменьшении проявлений прооксидантных эффектов физической нагрузки.

Ограничение эффекта прооксидантных факторов приобретает важное значение для мозга. Это обусловлено тем, что свободнорадикальные интермедиаты выступают в роли своеобразных посредников, обуславливающих взаимодействие между клеткой и внешней средой, обеспечивающих формирование в них адаптивных реакций (Hensley et al., 2000; Mossan, 2000). Ограничение эффективности их образования в ответ на действие прооксидантов предопределяет нарушение реакции мозга на внешние стимулы, проявлением чего может служить угнетение ВНД при гипотиреозе. Эти сдвиги возникают как у взрослых половозрелых животных, так и у крыс, находящихся в периоде полового созревания. Однако в пубертатном возрасте их выраженность меньше, что может вносить определенный вклад в появлении различий в проявлении сдвигов со стороны центральной нервной системы при гипотиреозе в разные возрастные периоды.

Список литературы

- Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление липидов и радиация. – Киев: Наукова думка, 1991. – 256с.
- Браверман Л.Е. Болезни щитовидной железы. – М.: Медицина, 2000. – 432с.
- Вьюшина А.В., Герасимова И.Г., Флеров М.А. Перекисное окисление белков сыворотки крови у крыс, селектированных по скорости выработки условного рефлекса активного избегания, в норме и при стрессе // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2002. – Т.133, №3. – С. 286–288.
- Де-Пьер Ж., Дальнер Г. Выделение, субфракционирование и характеристика эндоплазматической сети // Биохимическое исследование мембран. – М.: Мир, 1979. – С. 75–123.
- Джазаэрли Мохамад Салем, Давыдов В.В. Особенности формирования оксидативного стресса в печени крыс с гипотиреозом при интенсивной физической нагрузке в зависимости от возраста животных // Украинский биохимический журнал. – 2006. – Т.78, №5. – С. 81–87. (а)
- Джазаэрли Мохамад Салем, Давыдов В.В. Возрастные особенности изменения концентрации тиреоидных гормонов в крови при интенсивной физической нагрузке у крыс с экспериментальным гипотиреозом // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2006. – Т.4, №2. – С. 78–80. (б)
- Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами // Вопр. мед. химии. – 2000. – №4. – С. 36–47.
- Зефирова Г.С. Заболевания щитовидной железы. – М.: Арт-Бизнес-Центр, 1999. – 215с.
- Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы мед. химии. – 1990. – Т.36, №2. – С. 28–35.
- Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
- Das K., Chainy G.B. Thyroid hormone influences antioxidant defense system in adult rat brain // Neurochem. Res. – 2004. – Vol.29, №9. – P. 1755–1766.
- Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P. et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury // Free Radical. Biol. Med. – 2000. – Vol.28, №10. – P. 1456–1462.

Krasilnikova O.A., Kavok N.S., Babenko N.A. Drug-induced and postnatal hypothyroidism impairs the accumulation of diacylglycerol in liver and liver cells plasma membranes // *BMC Physiology*. – 2002. – Vol.2, №12. – P. 9–11.

Mossan B.T. Signal transduction by oxidants: look who's talking // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol.28, №9. – P. 1315–1316.

Muller G., Fruhant A., Mathias B. Thiobarbiturates-positive substances als Indikatoren der Lipidperoxidation // *Z. Gesamte. um. Med. und Grenzgeb.* – 1986. – Vol.41, №24. – S. 673–676.

Reinheckel T., Noack H., Lorenz S. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria // *Free Radic. Res.* – 1998. – Vol.29, №4. – P. 297–305.

Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. – London, 1991. – 234p.

Schoneich C., Sharov V.S. Mass spectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species // *Free Radical Biol. Med.* – 2006. – Vol.41, №10. – P. 1507–1520.

Urso M.L., Clarkson P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplement // *Toxicology*. – 2003. – Vol.189, № 1–2. – P. 41–54.

Особливості формування оксидативного стресу у щурів різного віку з тиреоїдною недостатністю

Хаддад Аїхам Алі, В.В.Давидов

Метою роботи було вивчення вікових особливостей зміни стану вільнорадикального окислення білків та ліпідів у субклітинних фракціях півкуль головного мозку щурів з експериментальним гіпотиреозом під впливом інтенсивного фізичного навантаження. Встановлено, що у дорослих щурів та тварин пубертатного віку при експериментальному гіпотиреозі та після фізичного навантаження у мозку виникає стан оксидативного стресу. Його проявом слугує накопичення в мітохондріальній та мікросомальній фракціях мозку продуктів вільнорадикального окислення. При гіпотиреозі обмежується ефективність реалізації прооксидантної дії фізичного навантаження на мітохондрії мозку. Обговорюється значення цього здвигу у виникненні центральних порушень при гіпотиреозі.

Ключові слова: *мозок, гіпотиреоз, фізичне навантаження, окислювальний стрес, перекисне окислення ліпідів, вільнорадикальне окислення білків.*

Age peculiarities of oxidative stress appearance in rats with hypothyroidism

Khaddad Aikham Ali, V.V.Davydov

The objective of the present experiment was to study age peculiarities of free radical protein oxidation and lipid peroxidation in brain of 1,5-months-old and 12-months-old rats with drug-induced hypothyroidism by exercises. It has been shown that hypothyroidism at both 1,5-months- and 12-months-old rats is accompanied by appear oxidative stress in the brain. It manifests by increase content of lipid peroxidation products and protein carbonyls in mitochondrial and microsomal fraction. Hypothyroidism decreases prooxidant affect of exercises to brain mitochondria.

Key words: *brain, hypothyroidism, exercises, oxidative stress, lipid peroxidation, free radical protein oxidation.*

Представлено В.І.Жуковим

Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко