

Особливості стану проокисно-антиоксидантної системи в полях гіпокампу та вміст метаболітів оксиду азоту в плазмі крові щурів різних вікових груп

І.Р.Тимофійчук

Буковинський державний медичний університет
Чернівці, Україна

Стаття присвячена вивченню особливостей стану прооксидантно-антиоксидантної системи в гіпокампі та дослідженню вмісту нітратів та нітритів (NOx) у плазмі крові щурів різних вікових груп. Виявлені вікові та регіонарні особливості довели, що з віком відбувається наростання процесів пероксидації при одночасному зниженні активності антиоксидантних ферментів у тварин найстаршого віку, а також встановлено достовірне зростання вмісту метаболітів оксиду азоту у старих щурів. Зростання вільнорадикальних процесів і збільшення рівня метаболітів оксиду азоту у щурів старшої вікової групи вказують на можливі причини нейродегенерації з віком.

Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист, метаболіти оксиду азоту.

ВСТУП

Характерною тенденцією розвитку сучасного суспільства в більшості країн світу є збільшення тривалості життя і пов'язане із цим підвищення в структурі населення долі людей похилого і старечого віку.

За результатами наукових досліджень Інституту геронтології АМН України, однією з найважливіших характеристик здоров'я людей похилого віку є високий рівень захворюваності та зниження фізичних можливостей. Зменшення тривалості життя прямо пов'язано зі зростанням числа нейродегенеративних захворювань (синильна деменція, паркінсонізм, хвороба

Альцгеймера). Вивчення когнітивних порушень набуває сьогодні все більшої актуальності у зв'язку із підвищенням вимог до ефективної інтелектуальної діяльності у всіх сферах функціонування суспільства. Старіння є тим важливим чинником, який модифікує нейрохімічний статус головного мозку [8, 9]. Крім того, із віком змінюється характер вільнорадикальних процесів, стан судин головного мозку, що, безумовно, впливає на зростання процесів перекисного окиснення та зниження активності ферментів антиоксидантного захисту [7, 8, 9].

Дослідження останніх років встановили, що одним із найважливіших біологічних медіаторів в організмі людини є монооксид нітрогену (NO), який розглядається нині як тканинний гормон, що підтримує активну вазодилатацію. За нормальних умов монооксид нітрогену постійно утворюється в головному мозку та спричиняє певні фізіологічні ефекти [3, 4, 11].

Дослідження останніх десятиліть встановили, що однією з ланок патогенезу нейродеструкції є гіперпродукція активних форм кисню (АФК) біоенергетичними і нейрохімічними системами головного мозку, яка приводить до окислювальної модифікації і деструкції білків, ліпідів, нуклеїнових кислот. Подібні порушення змінюють білкові, ліпідні фрагменти мембран нейроцитів, погіршують чутливість і специфічність рецепторів, генерацію, утворення і проведення нервового імпульсу, порушують синаптичну передачу [1, 2, 7, 8]. Про ступінь вираженості окисного стресу можна судити по збільшенню вмісту продуктів ліпопероксидації [1, 4, 7, 6, 8]. Зростання вільнорадикальних процесів може стати причиною нейротоксичних ефектів NO. Гіперпродукція NO внаслідок активації NOS є одним із пускових моментів роз-

витку не лише оксидантного стресу, а й індукції апоптозу нейронів, що і є одним із ключових моментів нейротоксичності NO [2, 4, 9, 11].

Особливо важливими є вікові особливості стану проокисно-антиоксидантної системи лімбіко-гіпоталамічних структур головного мозку, а також рівень метаболітів (NOx) у плазмі крові щурів різних вікових груп, адже при старінні різко зростає ризик розвитку нейродегенеративних захворювань.

Метою дослідження було провести порівняльний аналіз стану проокисно-антиоксидантної системи у щурів різних вікових груп у полях гіпокампу та визначити рівень метаболітів (NOx) у плазмі крові тварин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на нелінійних лабораторних самцях щурів одно (молоді тварини), п'ятимісячного (дорослі тварини) та п'ятнадцятимісячного (старі тварини) віку. Для цього головний мозок швидко виймали на холоді, фіксували в рідкому азоті. Керуючись атласом стереотаксичних координат для щурів, проводили забір матеріалу: полів гіпокампу CA1, CA2, CA3. Наважки гомогенізували в охолодженому Трис-НСІ буфері (рН 7,4). В отриманих гомогенатах визначали досліджувані показники. Вивчення процесів оксидації проводили за визначенням вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) — дієнових кон'югатів (ДК) та малонового альдегіду (МА). Активність ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) оцінювали за активністю ферментів: супероксиддисмутази (СОД), каталази (КТ), глутатіонпероксидази (ГПО) [8]. Активність NO-синтаз визначали за концентрацією в біологічних рідинах стабільних метаболітів NO — нітратів і нітритів. Тварин декапітували з дотриманням правил евтаназії. Кров збирали в центрифужні пробірки. Проводили центрифугування протягом 20 хвилин. Вміст нітратів та нітритів (NOx) визначали з використанням реактиву Гріса в плазмі крові. Оскільки ця реакція є специфічною тільки для нітритів, нітрати відновлювали до нітритів гранулами кадмія. Попередньо проби депротейнізували за допомогою NaOH із сульфатом цинку [1, 4, 5]. Кількість нітратів/нітритів виражали в мкмоль/л. Експериментальні втручання та евтаназія тварин проводилися з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей

(Страсбург, 1985), ухвали І Національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили за допомогою прикладних програм «Statistica 6.0» та «SPSS 13». Проводили розрахунок наступних статистичних показників: середню арифметичну, середньоквадратичне відхилення, стандартну похибку середньої арифметичної. Для оцінки відмінностей середніх величин при нормальному характері розподілу вибірових сукупностей використовували параметричний t-критерій Стьюдента. Статистично вірогідними вважали зміни при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз стану інтенсивності ліпопероксидації та антиоксидантного захисту в ділянках гіпокампу та вміст метаболітів (NOx) в плазмі крові тварин різних вікових груп наведений на рисунках.

У дорослих та у старих щурів у полі гіпокампу CA1 (рис. 1) відмічено достовірне зростання продуктів ПОЛ. Так, рівень ДК зростав в 1,4 разу у дорослих та 2,8 разу у старих тварин відповідно до показників у молодих тварин. Малоновий альдегід мав тенденцію до зростання в полі гіпокампу CA1 у дорослих щурів, але ці значення не набували вірогідності в порівнянні з молодими тваринами, наростання вмісту МА зберігалось. Так, у старих щурів в порівнянні з молодими і дорослими цей показник зростав у 2,3 разу і набував достовірних значень.

Наростання рівня продуктів ПОЛ супроводжувалось одночасним зниженням активності

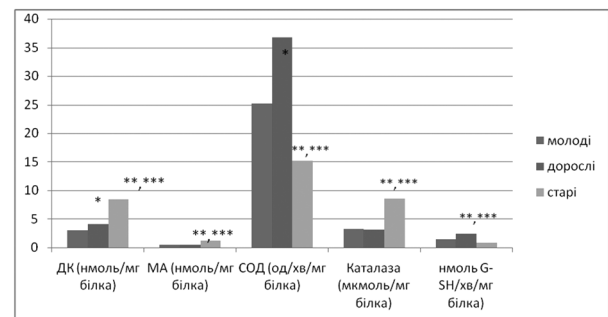


Рис. 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у полі гіпокампу CA1 щурів різного віку ($M \pm m, n=8$).

Примітка: достовірність показників у дорослих щурів відносно показників у молодих тварин * — p_1 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у молодих тварин ** — p_2 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у дорослих тварин *** — p_3 .

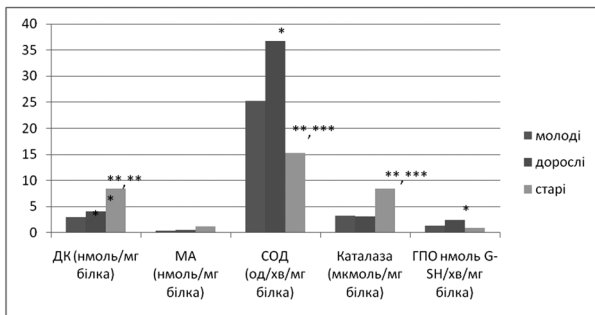


Рис. 2. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у полі гіпокампу СА2 щурів різного віку ($M \pm t$, $n=8$).

Примітка: достовірність показників у дорослих щурів відносно показників у молодих тварин * – p_1 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у молодих тварин ** – p_2 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у дорослих тварин *** – p_3 .

ферментів антиоксидантного захисту у старих щурів. Так, у полі СА1 гіпокампу ці показники мали відповідну тенденцію, особливих змін зазнавав показник активності СОД – її рівень знижувався: у старих щурів – у 2,5 разу відповідно до дорослих тварин, а у дорослих щурів рівень активності СОД зростав в порівнянні з відповідними показниками у молодих тварин в 1,4 разу. Схожі тенденції зберігала активність ГПО, вона вірогідно зростала у дорослих щурів в порівнянні з показниками у молодих та знижувалась у старих щурів у 2,7 разу відповідно до показників у дорослих щурів. Рівень активності каталази в полі гіпокампу СА1 не зазнавав змін між дорослими і молодими щурами, але різко зростав у старих щурів у 2,8 разу відповідно до показників у молодих і дорослих тварин.

У полі гіпокампу СА2 зберігались тенденції, подібні до показників поля СА1 щодо продуктів ПОЛ та системи АОЗ (рис. 2). Так, рівень ДК та МА зростав у дорослих та у старих щурів відносно показників у молодих у 2,0 разу. Активність СОД зростала у дорослих у порівнянні з молодими в 1,4 разу, а у старих тварин знижувалась у порівнянні з дорослими тваринами в 2,5 разу та в 1,8 разу в порівнянні з молодими тваринами. Рівень каталази зростав у старих тварин у 2,3 разу, а активність ГПО мала тенденцію до зниження, але ці показники не набували достовірних значень.

У полі СА3 гіпокампу рівень показників ПОЛ і ферментів АОЗ мав свої регіонарні особливості (рис. 3). Підвищення рівня ДК у дорослих тварин у порівнянні з рівнем цих показників у молодих тварин набувало достовірного зростання в 1,4 разу, у старих щурів ця тенденція

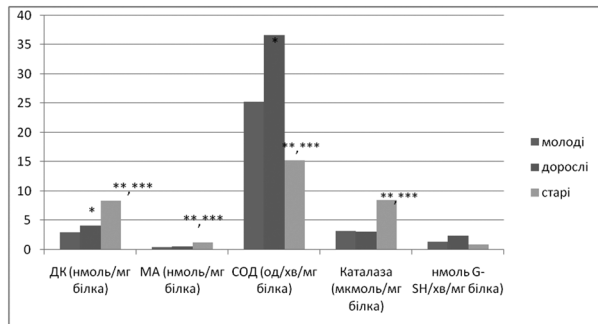


Рис. 3. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у полі гіпокампу СА3 щурів різного віку ($M \pm t$, $n=8$).

Примітка: достовірність показників у дорослих щурів відносно показників у молодих тварин * – p_1 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у молодих тварин ** – p_2 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у дорослих тварин *** – p_3 .

зберігалась і зростання рівня ДК перевищувало такі показники у дорослих тварин у 2,5 разу. Рівень МА в досліджуваній ділянці мав тенденцію до зростання, але ці показники не набували вірогідних значень. Рівень СОД у полі СА3 гіпокампу виявився найвищим у порівнянні з такими показниками в полях СА1 і СА2. Показники активності СОД зростали у дорослих тварин відносно до показників у молодих тварин в 1,5 разу, а у старих тварин рівень СОД знижувався в 2,5 разу відносно показників у дорослих щурів, але залишався вищим рівня даних показників в інших ділянках гіпокампу. Показники активності КТ та ГПО не зазнавали суттєвих вікових змін, їх рівень залишався нижчим рівня в ділянках СА1, СА2.

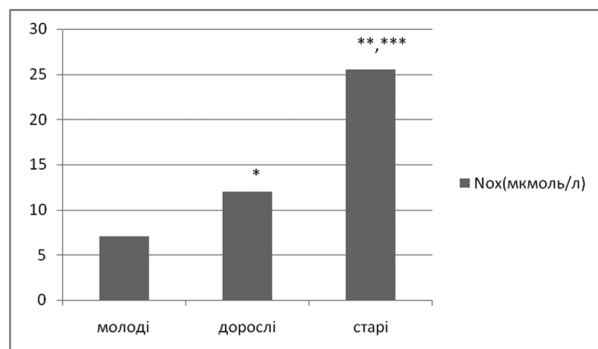


Рис. 4. Вміст метаболітів оксиду азоту (NOx) в плазмі крові щурів різних вікових груп ($M \pm t$; $n=8$).

Примітка: достовірність показників у дорослих щурів відносно показників у молодих тварин * – p_1 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у молодих тварин ** – p_2 ; достовірність показників у старих щурів відносно показників у дорослих тварин *** – p_3 .

Вміст метаболітів оксиду азоту в плазмі крові щурів різних вікових груп мав свої особливості (рис. 4), а саме у щурів найстаршої вікової групи ці показники були найвищими в порівнянні із показниками у молодих у 3,7 разу і з показниками у дорослих тварин у 2,3 разу.

Отримані нами дані вказують на посилення процесів ліпопероксидації з віком, але у дорослих тварин, на підставі отриманих даних можна констатувати рівновагу між процесами ліпопероксидації та АОЗ. У тварин старшої вікової групи відмічається тенденція до наростання процесів пероксидації на фоні різкого зниження активності ферментів АОЗ, особливо знижується активність СОД. Різна інтенсивність перекисного окиснення ліпідів у досліджуваних структурах мозку у тварин різних вікових груп може пояснюватися деякими відмінностями вмісту в них ліпідів і, відповідно, різною схильністю до утворення продуктів їх пероксидації, але в нормальних умовах здійснюється підтримання рівноваги між прооксидантними та антиоксидантними системами. Окисний стрес — основний патогенетичний шлях руйнування нейронів, і NO відіграє тут значну роль [1, 3, 8, 10, 11]. Старіння супроводжується прогресуючими змінами ефективності фізіологічних функцій та підвищенням сприйнятливості до дії несприятливих чинників [9].

ВИСНОВКИ

1. З віком наростають процеси пероксидації при одночасному зниженні активності ферментів антиоксидантного захисту. У тварин найстаршої вікової групи втрачається рівновага між цими процесами в бік переважання процесів пероксидації.

2. Зростання рівня продуктів пероксидації в старшій віковій групі при приєднанні супутньої патології (цукровий діабет, ішемічне, ішемічно-реперфузійне ушкодження) може стати причиною розвитку незворотної нейродегенерації.

3. Зростання рівня метаболітів оксиду азоту у щурів старшої вікової групи вказує на можливу гіперпродукцію оксиду азоту в похилому віці і на участь у процесах ініціації загибелі нейронів.

4. Виявлена регіонарна різниця прооксидно-антиоксидантного рівня в полях гіпокампу, яка обумовлена певними гістологічними особливостями, дає можливість передбачити різну чутливість до гіпоксичних станів, ішемічних ушкоджень та інших патологічних процесів.

Отримані закономірності спрямовують нашу увагу на старшу вікову групу і диктують необхідність подальших досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) / Ю.М.Степанов, И.Н.Кононов, А.И.Журбина и др. // Журнал АМН Украины. — 2004. — Т. 10, №2. — С. 339-351.
2. Возрастная динамика активности моноаминоксидазы и содержание продуктов перекисного окисления липидов в мозге человека / И.А.Волчегорский, С.Е.Шемяков, В.В.Турьгин и др. // Журнал неврологии и психиатрии. — 2003. — №1. — С. 46-48.
3. Возрастная инволюция органов и тканей / В.Х.Хавинсон, И.М.Кветной, И.Е.Ингел и др. // Успехи физиологических наук. — 2003. — Т. 34, №1. — С. 79-91.
4. Кишко Т.О. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота / Т.О.Кишко, С.Г.Шандренко, Н.П.Дмитренко // Журнал АМН Украины. — 2008. — Т. 14, №1. — С. 150-158.
5. Лапша В.И. Изменение активности NO-синтазы, ферментов энергетического обмена и ультраструктуры в нейронах коры большого мозга при моделировании кратковременной ишемии / В.И.Лапша, В.Н.Бочарова, В.Н.Гурин // Морфология. — 2003. — Т. 123, №3. — С. 32-36.
6. Резніков О.Г. Вікові та статеві особливості норадренергічної реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи у пренатально стресованих щурів / О.Г.Резніков, П.В.Сініцин, Л.В.Тарасенко // Доп. НАН України. — 2001. — №1. — С. 177-180.
7. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / В.М.Магальяс, А.О.Міхєєв, Ю.Є.Роговий та ін. — Чернівці, 2001. — 42 с.
8. Ткачук С.С. Вікова залежність нейрогормональних показників стрес-реактивності при неповній глобальній ішемії мозку щурів / С.С.Ткачук, В.П.Пішак, І.Р.Тимофійчук та ін. // «Високогірна гіпоксія і геном»: тези доповідей наукової конф. з між нар. участю. Терскол, Кабардино-Балкарія, Росія. 14-17 серпня 2008 р. // Фізіологічний журнал. — 2008. — Т. 54, №4. — С. 93.
9. Ткачук С.С. Стан перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в окремих структурах головного мозку старих щурів при неповній глобальній ішемії / С.С.Ткачук, Т.І.Бойчук // Клінічна та експериментальна патологія. — 2010. — Т. 9, №3. — С. 109-112.
10. Vannucci S.J. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia / S.J.Vannucci, F.Maher, I.A.Simpson // Glia. — 1997. — Vol. 21. — Is. 1. — P. 2-21.
11. Bolanos J.P. Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide / J.P.Bolanos, A.Almeida // Antioxidants & Redox signaling. — 2006. — Vol. 8, №5-6. — P. 955-965.

И.Р.Тимофійчук. Особенности состояния прооксидантно-антиоксидантной системы в полях гиппокампа и содержание метаболитов оксида азота в плазме крови крыс разных возрастных групп. Черновцы, Украина.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, метаболиты оксида азота.

Статья посвящена изучению особенностей состояния прооксидантно-антиоксидантной системы в гиппокампе крыс и исследованию содержания нитратов и нитритов (NOx) в плазме крови крыс разных возрастных групп. Установленные возрастные и региональные особенности доказали, что с возрастом происходит нарастание процессов пероксидации при одновременном снижении активности антиоксидантных ферментов у животных старшей возрастной группы, а также установили достоверное возрастание содержания метаболитов оксида азота у старых крыс. Возрастание уровня свободнорадикальных процессов и увеличение уровня метаболитов оксида у крыс старшей возрастной группы указывают на возможные причины нейродегенерации с возрастом.

I.R.Tymofiyuchuk. Features of a condition of peroxidation-antioxidant systems in fields of hippocampus and the maintenance the level of the nitric oxide metabolites in plasma of blood of rats of different age groups. Chernivtsy, Ukraine.

Key words: the products of lipid peroxidation, the antioxidant enzymes protection, the nitric oxide metabolites.

The work is dedicated to researching of features of a condition peroxidation-antioxidant systems in the hippocampus of rats and the level of nitrates and nitrites (NOx) in plasma of blood of different age groups. Are established age and the region features have proved, that with the age the products of lipid peroxidation are increased and the antioxidant enzymes protection are decreased at simultaneous at animals of the senior age group and the level of the nitric oxide metabolites at animals of the senior age group tended to increase. Increase of a level of peroxidation processes and increase in a level of the nitric oxide metabolites at rats of the senior age group specify the possible reasons of the degeneration of neurons with years.

Надійшла до редакції 14.06.2013 р.