

© Гнатюк В.В., Кононенко Н.М.

УДК: 612.128:616-092.19:616-008.63

Гнатюк В.В., Кононенко Н.М.

Національний фармацевтичний університет, кафедра патологічної фізіології (вул. Мельникова, 12, м. Харків, Україна, 61002)

ГЕНДЕРНІ ТА ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПРИ ДЕСИНХРОНОЗІ

Резюме. Досліджено стан вільнорадикальних процесів та ферментів антиоксидантного захисту в крові щурів різного віку та статі на тлі цілодобового освітлення (десинхроноз). Встановлені вікові та гендерні відмінності показників продуктів перекисного окиснення ліпідів (ДК, МДА), окисної модифікації білків, рівня кінцевих продуктів метаболізму NO. Проведено порівняння активності основних ферментів антиоксидантного захисту у щурів різної статі та віку. Виявлений більш високий рівень ферментів системи антиоксидантного захисту у самиць порівняно з самцями відповідних вікових груп.

Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист, десинхроноз.

Вступ

Мелатонін - універсальний адаптоген, який регулює функцію багатьох систем організму. Як нейромедіатор, він підтримує цикл сон-неспанья, швидкість проведення імпульсу, температуру тіла; як гормон, він впливає на проліферацію - гальмує мітози на рівні метафази майже всіх клітин, впливає на синтез регуляторних пептидів гіпоталамуса; як імуномодулятор, він активує мітози стоволових клітин червоного кісткового мозку, функції тімуса і лімфоцитів [Анисимов, 2007]. Кількість мелатоніну, що синтезується в організмі, залежить від режиму освітлення. В раніше проведених дослідженнях було встановлено, що порушення світового режиму призводить до зниження кількості мелатоніну та розвитку десинхронозу, який є причиною онкологічних, серцево-судинних захворювань, виразкової хвороби тощо [Комаров, Рапопорт, 2000]. Також відомо, що не останнє місце в патогенезі цих та багатьох інших хвороб відіграє і окиснювальний стрес [Гейвандова и др., 2008; Меньшикова и др., 2008]. В нормальних умовах життєдіяльності в клітині постійно присутній певний рівень перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), який індукований утворенням активних форм кисню. ПОЛ в клітині підтримується на постійному рівні завдяки багаторівневій антиоксидантній системі захисту. Баланс між перекисним окисненням з однієї сторони та антиоксидантною системою (АОС) з другої є необхідною умовою для підтримки нормальної життєдіяльності клітини [Курганова, 2001]. Порушення регуляторних систем призводить до надлишкового утворення активних форм кисню, пригнічення антиоксидантного захисту з розвитком окиснювального стресу, наслідком якого є складні зміни клітинного метаболізму та пошкодження клітинних мембран, виникнення окисної модифікації білків, при якій знижується або зовсім зникає їх функціональна активність. Крім того, продукти ПОЛ, наприклад малоновий діальдегід, є мутагенними та цитотоксичними сполуками [Корж, 2003; Щербатых и др., 2005].

На сьогодні питання впливу порушень синтезу мелатоніну та ПОЛ на розвиток різноманітних захворювань широко вивчаються, але відомостей про те, як

змінюються показники вільнорадикального окиснення при порушеннях синтезу мелатоніну в залежності від віку та статі в сучасній науковій літературі недостатньо.

Тому метою нашого дослідження стало вивчення показників ПОЛ та АОС у щурів різного віку та статі при десинхронозі.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 48 білих нелінійних щурах різної статі віком 9 та 20 місяців. Дослідні тварини були розділені на 8 груп по 6 тварин у кожній: контрольні групи № 1 - 4 - щури-самці та щури-самки віком 9 і 20 місяців, які знаходилися в умовах природного світлового режиму "день - ніч"; дослідні групи № 5 - 8 - щури - самці та щури - самки віком 9 і 20 місяців, які на протязі 2 тижнів знаходилися при цілодобовому освітленні (десинхроноз). Протягом експерименту щурі знаходилися в віварії при 20-25 °С, вологості не більш 50%, у стандартних пластикових клітках, на стандартному харчовому раціоні.

Показники вільнорадикального окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту оцінювали в крові тварин на 15 добу експерименту. Визначали за загальноприйнятими методами: дієнові кон'югати (ДК) [Гаврилов и др., 1988], малоновий діальдегід (МДА) [Стальная, Гаришвили, 1977], окиснювальну модифікацію білків Дубинина и др., 1995 кінцеві продукти метаболізму NO [Метельская, Гуманова, 2005]. Досліджували активність каталази [Королюк и др., 1988], супероксиддисмутази (СОД) Чевари и др., 1985, глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонтрансферази (ГТ) [Власов, 1990; Mennervik, 1985], вміст відновленого глутатіону (GSH) [Ellman, 1959].

Усі втручання та евтаназію тварин проводили згідно з вимогами комісії з біоетики НФаУ та "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах", що узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей" (Страсбург, 1986 р.) та першого Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Отримані дані статистично обробляли

з використанням *t* - критерію Стьюдента [Кочетов і др., 2012].

Результати. Обговорення

Рівень вільнорадикальних процесів оцінювали за показниками ПОЛ (ДК, МДА), окиснювальної модифікації білка та рівнем кінцевих продуктів NO (табл. 1). При порівнянні показників пероксидації ліпідів на тлі десинхронозу встановлено, що відбулося збільшення показників як первинних (ДК), так і вторинних (МДА) продуктів ПОЛ у щурів різної статі. Показники пероксидації більш збільшувалися у молодих щурів, порівняно зі старими, більш у самців, ніж у самок: дієнові кон'югати збільшувалися у молодих самців на 30%, у старих - на 25%; малоновий діальдегід - на 40% у молодих, на 26% - у старих щурів ($p < 0,05$). При цьому встановлені статеві відмінності між показниками МДА на тлі десинхронозу: у молодих самців підвищення було більш виражено ніж у самок - 40% і 37% відповідно, і 26% та 20% - у старих тварин ($p < 0,05$).

Достовірно підвищувалися показники окиснювальної модифікації білка при десинхронозі у молодих самців і самок - на 44% і 37% відповідно. При цьому встановлено і достовірні ($p < 0,05$) статеві відмінності цих показників у щурів молодого та старого віку.

Отримані результати свідчили також про наявність гендерних відмінностей в кількості кінцевих продуктів метаболізму NO в плазмі крові молодих тварин як в контрольній, так і в експериментальній групах. Суттєву різницю ($p < 0,05$) між показниками метаболізму NO у молодих тварин різної статі в контрольній групі можливо пояснити стимулюючим впливом естрогенів на синтез та секрецію NO. З віком відбувається зменшення вмісту кінцевих метаболітів NO у самок і збільшення у самців, що пов'язано зі зниженням впливу статевих гормонів, в тому числі і естрогенів [Семячкина-Глушкова і др., 2008]. При десинхронозі зберігалася достовірна різниця між показниками: у самок рівень кінцевих продуктів метаболізму NO перевищував показники самців в 1,3 рази. Але у молодих самців кількість продуктів окиснення монооксида азоту збільшувалася в 1,8 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$), в той час як у самок це підвищення було тільки в 1,2 рази. З віком картина змінювалася на протилежну: в плазмі старих самців вміст кінцевих продуктів окиснення монооксида азоту при патології незначно перевищував (5%) цей показник у самок ($p > 0,05$).

Антиоксидантна система організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їхньої ініціації та закінчуючи утворенням гідроперекисів та МДА [Калінін та ін., 2013]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження основних ферментів антиоксидантного захисту. Отримані результати свідчать про наявність вікових та статевих відмінностей в системі антиоксидантного захисту (табл. 2). Встановлено, що при десинхронозі відбувається зниження ак-

Таблиця 1. Показники вільнорадикальних процесів в плазмі крові щурів різного віку та статі при десинхронозі ($M \pm m$, $n=6$).

Показники	Інтактний контроль		Десинхроноз	
	9 міс.	20 міс.	9 міс.	20 міс.
Самці				
ДК, ммоль/л	0,87±0,03	0,99±0,05	1,13±0,03*	1,24±0,05*
МДА, мкмоль/л	0,32±0,03	0,43±0,02	0,45±0,02*	0,54±0,03*
Окиснювальна модифікація білків, мМ/мг білка	0,55±0,02	0,82±0,03	0,79±0,04*	0,96±0,02*
Рівень NO метаболітів, мкМ	34,5±1,33	60,5±5,88	62,3±2,06*	68,7±2,06*
Самки				
ДК, ммоль/л	0,78±0,03	0,92±0,02	0,94±0,03*	1,06±0,04*
МДА, мкмоль/л	0,27±0,03	0,35±0,02^	0,37±0,02*/^	0,42±0,03^
Окиснювальна модифікація білків, мМ/мг білка	0,46±0,03	0,67±0,05^	0,63±0,04*/^	0,78±0,03^
Рівень NO метаболітів, мкМ	68,2±3,44*	59,8±1,85	80,5±3,13*/^	66,4±3,34

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з тваринами групи контролю; ^ $p < 0,05$ порівняно з самцями відповідного віку.

Таблиця 2. Активність ферментів антиоксидантного захисту у щурів різного віку та статі при десинхронозі ($M \pm m$, $n=6$).

Показники	Інтактний контроль		Десинхроноз	
	9 міс.	20 міс.	9 міс.	20 міс.
Самці				
СОД, умов. од	1,11±0,04	0,75±0,11	0,69±0,06*	0,40±0,08*
Каталаза, мккат/л	31,1±2,7	34,6±1,5	20,8±2,2*	20,5±1,4*
ГП, ммоль/хв·л	0,28±0,030	0,19±0,010	0,17±0,019*	0,15±0,009*
ГТ, ммоль/хв·л	66,3±2,8	33,2±2,5	52,3±2,6*	22,3±1,6*
GSH, ммоль/л	0,39±0,04	0,26±0,033	0,22±0,03*	0,20±0,03*
Самки				
СОД, умов. од	1,88±0,09	1,43±0,12	1,31±0,08*/^	0,85±0,10*/^
Каталаза, мккат/л	28,5±2,5	33,0±1,8	20,3±1,9*	23,2±2,3*
ГП, ммоль/хв·л	0,26±0,020	0,18±0,014	0,18±0,02*	0,16±0,017
ГТ, ммоль/хв·л	78,0±2,7	39,8±4,0	62,8±3,1*/^	33,0±3,1*/^
GSH, ммоль/л	0,37±0,03	0,26±0,03	0,18±0,02*	0,19±0,04

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з тваринами групи контролю; ^ $p < 0,05$ порівняно з самцями відповідного віку.

тивності антиоксидантних ферментів плазми. При цьому у щурів молодого віку більш знижуються показники у самців ніж у самок порівняно з контролем ($p < 0,05$): СОД - 38% і 30%, каталаза - 33% і 29%, ГП - 39% і 31%, ГТ - 21% і 19% відповідно. У тварин похилого віку також відбувається зниження активності ферментів на тлі порушення режиму освітлення, що підтверджується зниженням показників СОД на 47% і 40%, каталази - на 40% і 30% у самців і самок відповідно ($p < 0,05$).

Менш виражені порушення спостерігалися в сис-

темі ферментів метаболізму глутатіону при десинхронозі у старих самців і самок (зниження на 11% і 21% - ГП, на 17% і 23% - ГТ відповідно), що, на нашу думку, пов'язано з вже існуючим фізіологічним зниженням активності цих ферментів при старіння.

Гендерні відмінності при десинхронозі встановлені як у молодих, так і старих тварин за показниками СОД та ГТ з переважанням високої активності цих ферментів у самок ніж у самців, що ймовірно пов'язано з участю естрогенів у антиоксидантному захисті організму. Рівень відновленого глутатіону при десинхронозі має достовірні відмінності тільки в групах молодих тварин, знижуючись у самців в 2 рази, у самок - в 1,8 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$). У старих тварин зниження має менш виражений характер у 1,3 і 1,4 рази відповідно ($p > 0,05$). Гендерних особливостей в рівнях відновленого глутатіону не встановлено.

Список літератури

- Анисимов В. Н. Мелатонин: роль в организме и применение в клинике / В. Н. Анисимов. - СПб. : Система, 2007. - 40 с.
- Власов С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С. Н. Власов, Е. И. Шабунина, А. И. Переслгина // Лаб. дело. - 1990. - № 8. - С. 19 - 21.
- Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // Лаб. дело. - 1988. - № 2. - С. 60 - 63.
- Калінін І. В. Антиоксидантна система щурів за умов інтоксикації важкими металами та при застосуванні ?-ліпиевої і фолієвої кислот / І. В. Калінін, Н. М. Данченко, Б. О. Цудзевич // Проблеми харчування. - 2013. - № 1. - С. 55 - 58.
- Комаров Ф. И. Хронобиология и хрономедицина / Ф. И. Комаров, С. И. Рапопорт. - М. : "Триада-X", 2000. - 488 с.
- Курганова Л. Н. Перекисное окисление липидов - одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс / Л. Н. Курганова // СОЖ. - 2001. - № 6. - С. 76 - 78.
- Метельская В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова // Клинич. лабораторная диагностика. - 2005. - № 6. - С. 15 - 18.
- Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванов, М. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16 - 19.
- Методы статистической обработки медицинских данных: метод. рекомендации для ординаторов и аспирантов медицинских учебных заведений, научных работников / [А. Г. Кочетов, О. В. Лянг, В. П. Масенко и др.] - М. : КНПК, 2012. - 42 с.
- Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // Вопросы мед. химии. - 1995. - № 1. - С. 24 - 26.
- Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / [Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин и др.]. - Новосибирск : АРТА, 2008. - 284 с.
- Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система при язвенной болезни желудка, двенадцатиперстной кишки и постгастрорезекционных синдромах / А. В. Щербатых, В. И. Кулинских, А. А. Большешапов [и др.] // Сибирский медицинский журнал. - 2005. - Т. 52, № 3. - С. 9 - 13.
- Перекисное окисление липидов: причина или следствие? / Е. В. Корж, В. В. Мухин, Е. Е. Латышева [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной медицины. - 2003. - Т.4, № 2. - С. 347 - 350.
- Роль половых гормонов в регуляции базальной и стрессорной секреции оксида азота у крыс / О. В. Семьякина-Глушкова, Т. Г. Анищенко, Т. А. Синдякова [и др.] // Астрахан. мед. журнал. - 2008. - Т. 3, № 3. - С. 130 - 133.
- Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Т. Гаришвили // Современные методы в биохимии. - М. : Медицина, 1977. - С. 66 - 68.
- Сывороточные фосфолипиды, показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты как дополнительные неинвазивные маркеры активности хронического вирусного гепатита С / Н. И. Гейвандова, А. В. Ягода, Д. А. Гудзовская [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерол. гепат. колопроктол. - 2008. - № 6 - С. 38 - 42.
- Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й Сокей // Лаб. дело. - 1985. - № 11. - С. 678 - 681.
- Ellman G.L. Tissue sulphhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. - 1959. - Vol. 82, № 1. - P. 70 - 77.
- Mannervik B. Glutathione peroxidase / B. Mannervik // Methods in enzymology. Acad. Press. - 1985. - Vol. 113. - P. 490 - 495.

Гнатюк В.В., Кононенко Н.Н.

ГЕНДЕРНЫЕ И ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ДЕСИНХРОНОЗЕ

Резюме. Проведено исследование свободнорадикальных процессов и ферментов антиоксидантной защиты крови крыс разного возраста и пола на фоне круглосуточного освещения (десинхроноз). Установлены возрастные и гендерные отличия показателей продуктов перекисного окисления липидов (ДК, МДА), окислительной модификации белка, уровня конечных продуктов метаболизма NO. Выполнено сравнение активности основных ферментов антиоксидантной защиты у крыс разного пола и возраста. Выявлено более высокий уровень ферментов системы антиоксидантной защиты у самок в

сравнении с самцами соответствующих возрастных групп.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, десинхроноз.

Hnatiuk V.V., Kononenko N.N.

GENDER AND AGE FEATURES OF FREE RADICAL OXIDATION AND ANTIOXIDANT PROTECTION UNDER DESYNCHRONOSIS

Summary. *The investigation of free radical processes and antioxidant enzymes of protection of blood of rats of different age and sex on the background of 24-hour electric lights (desynchronosis) was performed. Age and gender differences of the indexes of lipid peroxidation products (DK, MDA), oxidative modification of the protein, and level of end product of NO metabolism are installed. Comparison of the activity of antioxidant enzymes in rats of different age and gender was performed. The enzymes of antioxidant protection system rat females have a higher level as compared with males of the same age.*

Key words: *lipid peroxidation, antioxidant protection system, desynchronosis.*

Стаття надійшла до редакції 01.04.2014 р.

Гнатюк Валерія Валеріївна - к.мед.н., асистент кафедри патологічної фізіології НФаУ; +38 057 706-30-66

Кононенко Надія Миколаївна - д.мед.н., професор, завідувач кафедри патологічної фізіології НФаУ; +38 057 706-30-66, +38 066 750-19-07

© Гузь В.А.

УДК: 616.379-008.64.001.4:612.833.001.8-092.4

Гузь В.А.

ДЗ "Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України", кафедра патологічної фізіології (вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, Україна, 49044)

ВИВЧЕННЯ ОРІЄНТОВНО-ДОСЛІДНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ СТАРИХ ЩУРІВ МЕТОДОМ "ВІДКРИТЕ ПОЛЕ" ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Резюме. *Розглянуто стан орієнтовно-дослідницької діяльності щурів в геронтогенезі за умов експериментального цукрового діабету. Аналіз показників локомоторної та дослідницької активності показав значні і достовірні зміни. Зменшення кількості перетнутих квадратів, кількості стійок, обстежених нірок.*

Ключові слова: *алоксан, моделювання ЦД, щурі, поведінка, "відкрите поле".*

Вступ

У здійсненні функцій окремих нейронів, нервових центрів та різних структур головного мозку вирішальне значення мають енергетичні процеси [Андрєєва та ін., 2004; Ткачук та ін., 2006]. Біосинтез білка у нейронах, активний транспорт іонів та складових інших речовин через мембрану; синтез нейромедіаторів та інших біологічно активних речовин потребують енергетичних затрат [Ткачук та ін., 2006]. Крім того, функціональна діяльність нервової системи - перехід від стану спокою до стану підвищеної працездатності потребує адекватного енергетичного забезпечення. Вважається, що саме енергетичний потенціал нейронів, кровонаповнення та енергетичне забезпечення мозку багато в чому можуть обмежувати функціональну активність нервової системи і можуть бути причиною розвитку патологічних станів нервової системи у старості [Васильєв та др., 2008; Емельянов та др., 2005].

Головний мозок характеризується високою інтенсивністю енергетичного обміну [Андрєєва та ін., 2004;]. Разом з тим, вміст у мозку основного енергетичного субстрату - глюкози, невеликий [Васильєв та др., 2008; Емельянов та др., 2005]. Життєдіяльність нервових клітин майже цілком залежить від доставки глюкози з током крові. Глюкоза - основний поставник матеріалу для пла-

стичного обміну, біосинтезу нейромедіаторів, модуляторів нейронної активності. Утилізація глюкози мозком з віком знижується [Емельянов та др., 2005]. Невідомо, в якій мірі вікове зниження використання глюкози нервовою тканиною може бути пов'язано зі змінами кровопостачання мозку. При старінні порушується транспорт глюкози через міжклітинний матрикс [Ahmed, Zahra, 2011]. У процесі старіння енергетичний обмін порушується у різних ланках мозку.

Мета роботи - розглянути закономірності орієнтовно-дослідницької діяльності старих щурів за умов ЦД.

Матеріали та методи

Експерименти проведено на 45 старих щурах (за класифікацією І.П. Западнюка, 1983 р.) - 18 - 22 місяців, вагою 260 - 340 г. Тварини були розділені на інтактних ("контроль") та дослідних (з модельованим ЦД - "ЦД") [Западнюк та др., 1983] та утримувалися в стандартних умовах віварію.

ЦД моделювали шляхом інтраперитонеального введення розчину алоксану моногідрату (120 мг/кг, "Sigma"). Відтворення ЦД контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали за допомогою портативного глюкометра "Bionime". На 10-й день відбирали