

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пішак В.П., Ломакіна Ю.В.

СТРЕС-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАНУ КРОВІ СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ СИНТЕТИЧНОГО БІОРЕГУЛЯТОРА ЗА РІЗНИХ РЕЖИМІВ ОСВІТЛЕННЯ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

СТРЕС-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАНУ КРОВІ СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ СИНТЕТИЧНОГО БІОРЕГУЛЯТОРА ЗА РІЗНИХ РЕЖИМІВ ОСВІТЛЕННЯ – Вивчено вплив тетрапептиду епіталону (Ала-Глу-Асп-Глі) на показники про- та антиоксидантного стану крові старих щурів (20-24 міс.) за умов зміненого фотоперіоду (12.00С:12.00Т; 24.00С:00Т; 00С:24.00Т) та іммобілізаційного стресу. Показано, що іммобілізаційний стрес за умов зміненого світлового періоду викликає активацію пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків на фоні пригнічення антиоксидантного захисту (пониження активності каталази та вмісту HS-груп). Триденне введення тваринам епіталону на фоні зміненого фотоперіоду та іммобілізаційного стресу викликало нормалізацію показників про- та антиоксидантного стану крові старих щурів.

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОГО СОСТОЯНИЯ КРОВИ СТАРЫХ КРЫС ПРИ УСЛОВИИ ВВЕДЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО БИОРЕГУЛЯТОРА ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ОСВЕЩЕНИЯ – Изучено влияние тетрапептида эпителина (Ала-Глу-Асп-Гли) на показатели про- и антиоксидантного состояния крови старых крыс (20-24 мес.) при измененном фотопериоде (12.00С:12.00Т; 24.00С:00Т; 00С:24.00Т) и иммобилизационном стрессе. Показано, что иммобилизационный стресс при условии измененного фотопериода вызывает активацию пероксидного окисления липидов и окислительной модификации белков на фоне угнетения антиоксидантной защиты (снижение активности каталазы и содержания HS-групп). Трехдневное введение животным эпителина на фоне измененного фотопериода нормализовало показатели про- и антиоксидантной системы крови старых крыс.

INFLUENCE OF SYNTHETIC BIOREGULATOR ON THE PARAMETERS OF THE BLOOD PRO- AND ANTIOXIDANT CONDITION OF OLD RATS UNDER ALTERED PHOTOPERIOD AND IMMOBILIZATION STRESS – The influence of epithalonin on the parameters of the blood pro- and antioxidant condition of old rats under altered photoperiod and immobilization stress were studied. Under altered photoperiod and immobilization stress the lipid peroxidation and protein oxidative modification were activated against a background of inhibited antioxidant defence (a decrease of the catalase activity and the content of the HS-group). A three day administration of epithalon to animals caused a normalization of the parameters of pro- and antioxidant blood state in old rats.

Ключові слова: епіталон, фотоперіод, стрес, про- та антиоксидантний стан, старі щури, кров.

Ключевые слова: эпителин, фотопериод, стресс, про- и антиоксидантное состояние, старые крысы, кровь.

Key words: epithalon, photoperiod, stress, pro- and antioxidant condition, old rats, blood.

ВСТУП Особливістю демографічної ситуації в розвинутих країнах на початку ХХ століття є прогресуюче збільшення середньої тривалості життя людей. Старіння населення посилює навантаження на геронтологічні служби і підрозділи медичних установ. Для розв'язання проблем, які виникають, актуально є розробка та випробування нових лікарських засобів – геропротекторів і, зокрема, препаратів, які затримують процес старіння [1, 8].

На сьогодні найбільш обґрунтованою є вільнорадикальна теорія старіння. Відповідно до цієї теорії, вільні радикали, які утворюються в результаті різноманітних окисних реакцій в організмі, викликають пошкодження ліпідів та біополімерів, що в кінцевому результаті призводить до їх деградації та старіння [1, 4]. Найбільш вивченими є радикали кисню, які утворюються в результаті його одноелектронного відновлення та протонування. Володіючи високою реакційною здатністю, вони отримали назву активних форм кисню (АФК). У клітині існують системи захисту від АФК та інших радикалів, які об'єднані під загальною назвою анти-

оксиданти [2]. Звідси витікає необхідність пошуку серед геропротекторів речовин, які б володіли антиоксидантними властивостями.

За останні роки отримані переконливі дані, які свідчать про присутність в епіфізі мозку пептидів, що здатні здійснювати інформаційний зв'язок між різними клітинними групами і, таким чином, впливати на їх функціональну активність [8, 9]. За даними аналізу амінокислотної послідовності пептидів епіфіза мозку, в Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології ПЗО РАМН синтезований тетрапептид епіталон (Ала-Глу-Асп-Глі). Попереднє вивчення даного пептиду показало, що він має геропротекторну дію, що диктує необхідність більш глибокого вивчення механізмів цієї дії.

Нез'ясованим залишається питання про механізм впливу епіталону на стан про- та антиоксидантної систем у старих щурів за умов зміненого фотоперіоду та іммобілізаційного стресу.

Мета наших досліджень – вивчення впливу епіталону на показники про- та антиоксидантного стану крові старих щурів за умов зміненого фотоперіоду та іммобілізаційного стресу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідді виконано на 54 старих (20-24 міс.) нелінійних білих щурах-самцях масою 300 ± 10 г. Впродовж 1 міс. до початку та протягом експерименту тварин утримували у віварію за умов сталої температури (18-21°C), вологості повітря (50-55%) в окремих клітках з вільним доступом до води та їжі. Фотоперіодичні зміни в організмі тварин моделювали впродовж 1 тижня шляхом зміни режимів освітлення за допомогою лампи штучного світла (інтенсивність освітлення не менше 500Лк: 1) 12.00С (світло):12.00Т(темрява); 2) 24.00С:00Т; 3) 00С:24.00Т). Іммобілізаційний стрес моделювали на 8-му добу експерименту шляхом утримування тварин впродовж 1 год у пластикових клітках-пеналах.

Розподіл кількості щурів наведений у таблиці 1.

Для проведення дослідження використовували синтетичний пептид шишкоподібної залози – епіталон у дозі 0,17 мкг/100 г маси тіла внутрішньом'язово, синтезований у Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології ПЗО РАМН (Росія). Декапітацію тваринам проводили о 14.00 год під легким ефірним наркозом згідно з положеннями "Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях" (Страсбург, 1986). За 24 год до експерименту тварин утримували без їжі з вільним доступом до води. Цільну кров стабілізували розчином ЕДТА (1,0 мг/мл крові), розділяли на плазму (центрифугування при 3000 об/хв, 15 хв) і еритроцити (з триразовим промиванням охолодженим фізіологічним розчином натрію хлориду). У плазмі крові визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [5] і HS-груп [6] та ОМБ [7]; в еритроцитах – рівень маломолекулового альдегіду та активність каталази [5]. Отримані результати оброблені методом варіаційної статистики за допомогою програми "BIOSTAT".

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Результати проведених досліджень вказують на те, що одноденний іммобілізаційний стрес у старих щурів за умов

12.00С:12.00Т впродовж семи діб викликав активацію ПОЛ (рівень малонового альдегіду зростає на 46,0 %) та окисної модифікації білків (показник ОМБ зростає вдвічі порівняно з контролем). За цих же умов активність каталази еритроцитів та вміст HS-груп у плазмі крові зменшилися на 51,6 і 42,7 %, відповідно, а рівень церулоплазміну підвищився на 80,8 % (табл. 2).

Уведення стресованим тваринам епіталону наближало рівні в крові МА, ОМБ та активність каталази до норми; рівень ЦП та HS-груп проявляв чітку тенденцію наближення до величин контролю.

Постійне освітлення (тварини четвертої групи) посилює (у 2,5 рази) окисну модифікацію білків плазми крові та активацію каталази (на 24,6%). Відносно інших показників, то вони не відрізнялися від тварин контрольної групи (12.00С:12.00Т). Імобілізаційний стрес на фоні тривалого освітлення призводив до різкого підвищення в крові вмісту МА (на 55,6%) та ОМБ (майже втричі порівняно з контролем) і незначного зростання величини церулоплазміну (на 30,0 %). Активність каталази та рівень HS-груп знижувалися на 38,4 і 32,7 % відповідно. Уведення епіталону на фоні постійного освітлення та імобілізаційного стресу призвело до вираженої тенденції щодо нормалізації вивчених показників: рівні в крові МА (зменшився на 7,3 %), ОМБ (зменшився на 47 %) та церулоплазміну (на 25 %), а активність каталази та вміст HS-груп наближались до рівня контролю.

За умов постійної темряви жоден із досліджуваних показників про- та антиоксидантної системи не зазнава-

ли вірогідних змін порівняно з тваринами контрольної групи.

Імобілізаційний стрес на фоні тижневої темряви викликав, як і у всіх попередніх дослідних групах тварин, підвищення в крові рівня МА, ОМБ, церулоплазміну та зниження активності каталази та вмісту HS-груп. Уведення таким тваринам епіталону нормалізувало показники МА (зменшення на 25 %), ОМБ (зменшення на 42 %), каталази (підвищення на 41 %) та ЦП (зменшення на 18 %), а вміст HS-груп залишався вірогідно нижчим порівняно з тваринами контрольної групи.

Проведені дослідження вказують на те, що гіпофункція (постійне освітлення) та гіперфункція (постійна темрява) епіфіза мозку по-різному впливають на показники про- та антиоксидантного стану крові старих щурів. Так, при гіпофункції шишкоподібної залози має місце активація процесів ліпопероксидації, окиснювальної модифікації білків та пригнічення антиоксидантного захисту, тоді як при гіперфункції не спостерігається вірогідних змін цих показників щодо контролю. Цей факт можна пояснити різною функціональною активністю шишкоподібної залози залежно від світлового періоду доби.

Імобілізаційний стрес за умов зміненого фотоперіоду викликає різку активацію вільнорадикальних процесів на фоні зниження антиоксидантного захисту крові старих щурів. Уведення тваринам епіталону за цих умов призводить до нормалізації досліджуваних показників, що може вказувати на його безпосередню (як месенджера вільних радикалів)

Таблиця 1. Розподіл кількості щурів згідно з умовами експерименту

№	Серії досліджень	К-ть тварин
1	12.00С:12.00Т (контроль)	6
2	24.00Т:0С	6
3	24.00С:00Т	6
4	12.00С:12.00Т+ імобілізаційний стрес	6
5	24.00Т:0С+імобілізаційний стрес	6
6	24.00С:00Т+імобілізаційний стрес	6
7	12.00С:12.00Т+імобілізаційний стрес+епіталон	6
8	24.00Т:0С+імобілізаційний стрес+епіталон	6
9	24.00С:00Т	6

Таблиця 2. Вплив епіталону на показники про- та антиоксидантного стану крові старих щурів за умов зміненого фотоперіоду та імобілізаційного стресу (M ± m; n=6)

Умови дослідю	Показники, що вивчалися				
	Малоновый альдегід, мкмоль/мл	ОМБ, мкмоль/г білка	Церулоплазмін, мг/л	Каталаза, мкмоль/хв-л	HS-групи, мкмоль/мл
Контроль (12С:12Т)	18,0±0,84	0,68±0,04	298±4,21	12,6±0,85	0,75±0,01
12С:12Т+С	26,2±0,46 *	1,38±0,08 *	539±4,35 *	6,10±0,12 *	0,43±0,03 *
12С:12Т+С+ епіталон	21,6±1,39	0,90±0,23	353±4,57 *	13,2±0,12	0,56±0,02 *
24С:0Т	17,9±0,48	1,74±0,03 *	311±5,05	15,7±0,26 *	0,72±0,02
24С:0Т+С	28,8±0,52 *	1,99±0,03 *	388±4,41 *	7,68±0,14 *	0,43±0,02 *
24С:0Т+С+ епіталон	26,7±0,54	1,05±0,18	292±7,44	14,9±1,17 *	0,52±0,02 *
24Т:0С	17,9±0,39	0,73±0,02	275±4,76	14,2±1,17	0,74±0,05
24Т:0С+С	23,3±0,36 *	1,16±0,03 *	354±5,68 *	8,6±0,17 *	0,50±0,03 *
24Т:0С+С+ епіталон	17,4±0,33	0,67±0,04	290±4,27 *	14,6±1,18	0,55±0,02 *

Примітка: * – достовірна різниця (p<0,05) порівняно з контролем (12С:12Т); С – світло; Т – темрява; ІС – імобілізаційний стрес; ОМБ – окиснювальна модифікація білків.

чи посередню (через продукцію мелатоніну шишкоподібною залозою) антиоксидантну дію.

ВИСНОВКИ 1. Постійне освітлення інтенсивністю 500Лк викликало у старих щурів активацію процесів ліпопероксидації, окиснювальної модифікації білків крові та пригнічення антиоксидантного захисту. Гіперфункція шишкоподібною залозою не істотно впливала на показники про- та антиоксидантного стану.

2. Одногодинний іммобілізаційний стрес за умов зміненого фотоперіоду (12.00С:12.00Т; 24.00С:00Т; 00С:24.00Т) викликав різку активацію пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків на фоні зниження антиоксидантного захисту (зменшення активності каталази та вмісту HS-груп).

3. Уведення старим щурам епіталону впродовж 3-х днів на фоні іммобілізаційного стресу та зміненого фотоперіоду спричинило нормалізацію показників про- та антиоксидантного захисту крові.

Література

1. Анисимов В.Н. Средства профилактики преждевременного старения (геропротекторы) // Успехи геронтологии. – 2000. – № 4. – С. 55-74.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-восстановительный го-

меостаз в норме и патологии / Под общ. ред. Ю.А. Зозули. – К.: Наук. думка, 1997. – 208 с.

3. Зезюлин П.Н. Геропротекторное действие эпиталона на эндокринную и иммунную системы крыс: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – СПб., 2003. – 19 с.

4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. – М., 2004. – 215 с.

5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. – Мн.: Интерпрессервис, 2003. – Т. 2. – С. 74-75.

6. Мецишен І.Ф., Григор'єва Н.П. Метод кількісного визначення HS-груп у крові // Бук. мед. вісник. – 2002. – Т. 6, № 2. – С. 190-192.

7. Мецишен І.Ф. Метод визначення окисно-модифікованих білків плазми (сироватки) крові // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156-158.

8. Мецишен І.Ф., Пішак В.П., Заморський І.І. Мелатонін: обмін та механізм дії // Бук. мед. вісник. – 2001. – Т. 5, № 2. – С. 3-15.

9. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. – СПб.: Наука, 2003. – 223 с.

10. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. Свободнорадикальное окисление и старение. – СПб., 2003. – 96 с.

11. Dipeptide vilon as immunomodulator in radiation model of premature aging / I. Knyazkin, P. Zezulin, N. Bykov, A. Trofimov // VI European Congress on Clinical Gerontology. – Moscow, 2002. – P. 126-127.

12. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance // Exp. Gerontol. – 2001. – Vol. 89, № 1. – P. 103-107.