

На правах рукописи

УДК 577.158.1 + 591.3

Кравченко Юлия Валериевна



**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ НА ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА
ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ И АЛИМЕНТАРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

03.00.04. – биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2005

**Работа выполнена в ГУ Научно-исследовательский
институт питания Российской Академии медицинских наук**

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

ВАСИЛЬЕВ Андрей Валериевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

ЯРОВАЯ Галина Алексеевна

доктор биологических наук,
профессор

КОНИЧЕВ Александр Сергеевич

Ведущая организация:

ГУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
РАМН им. В.Н. Ореховича

Защита состоится «21» ноября 2005 г. в 14 ч. на
заседании Диссертационного Совета Д001.002.01 в ГУ НИИ питания
РАМН по адресу: 109240 Москва, Устьинский проезд, д.2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ питания
РАМН

Автореферат разослан «10» октября 2005 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук,
профессор

Коденцова В.М.

2006-4
19493

2185769

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Начало использования кислорода в качестве уникального химического источника энергии послужило толчком в эволюции живых организмов, сделало возможным появление эукариот, многоклеточных организмов и освоение ими материковых поверхностей [Скулачев В.П., 2001; Зенков Н.К. и др., 2001]. Параллельно с совершенствованием механизмов дыхания и обмена веществ появилась необходимость нейтрализации продуктов ряда биохимических реакций - активных метаболитов кислорода, то есть необходимость формирования системы антиоксидантной защиты. В процессе эволюции сложилась многоуровневая система антиоксидантной защиты живых организмов с участием ферментных и неферментных механизмов, обеспечивающих возможность сохранения постоянства внутренней среды при использовании в окислительно-восстановительных реакциях химически лабильного и токсичного кислорода.

Как часть живого организма, антиоксидантная система находится в постоянной зависимости от внешней среды (в частности, от поступления микронутриентов, содержащихся в активных центрах антиоксидантных ферментов - железа, цинка, меди, марганца, селена и серы) [Спиричев В.Б., 1996; Тутельян В.А. и др., 2000; Benzie I., 2003], а в настоящее время также подвергается массивному антропогенному влиянию, зачастую критическому для эволюционно сложившихся биохимических систем. Наряду с развитием дефицита микронутриентов, резко возрастает интенсивность внешних прооксидантных воздействий (радиационных и ультрафиолетовых излучений, ксенобиотиков). Поэтому исследование состояния и адаптивных возможностей системы антиоксидантной защиты в онтогенетическом аспекте представляется актуальным, так как нарушения антиоксидантного статуса особенно ярко проявляются в критические периоды онтогенеза: ранний постнатальный и пубертатный периоды [Torres L., 2004; Turgut M., 2004; Cherian S., 2004; Kelly N., 2004; Konduri G., 2004; Harrison C., 2005]. Актуальным является изучение адаптационного потенциала антиоксидантной системы и в старческом возрасте, так как многочисленные исследования подтверждают зависимость развития дегенеративных заболеваний и самого старения от накопления окислительных повреждений [Ланкин В.З., 2000; Скулачев В.П., 2001; Harman D., 1956; Sohal R., 1995; Forsmark-Andree P., 1995; Yu B., 1996; Wells-Knecht M., 1997; Schleicher E., 1997; Leeuwenburgh C., 1997; Linnane A., 1998; Mecocci P., 1999].

Одним из наиболее информативных подходов в исследовании системного антиоксидантного ответа является моделирование состояний окислительного стресса [Beckman K., 1998]. Наиболее уязвимыми в силу своей химической

активности являются сульфгидрильные группы ферментов и неферментных антиоксидантов [Соколовский В.В., 1996; Зенков Н.К. с соавт., 2001; Akerboom T., 1981;], поэтому моделирование окислительного стресса, направленного на инактивацию сульфгидрильных групп, позволит установить молекулярные механизмы нарушений и оценить характер корректирующих воздействий. Достаточно хорошо воспроизводимыми и отвечающими этим условиям являются модели таких распространенных в популяции состояний, как изменение метаболизма цистеина [Lewis C., 1992; Loscalzo J., 1996; Shimakawa T., 1997; Fonseca V., 1999] или воздействие тяжелого металла кадмия [Nordberg G., 2004]. Применение этих моделей на различных этапах онтогенеза создает возможность для изучения и прогнозирования адаптационного потенциала антиоксидантной системы органов и тканей, а также для выявления групп риска и основы корректирующих мероприятий.

В формировании адаптационного ответа на любые виды внешнего воздействия значимую роль играют механизмы долговременной адаптации, представленные в системе антиоксидантной защиты ферментным звеном, в частности, селенопротеином глутатионпероксидазой. Поэтому актуальным является исследование биологической активности соединений селена в качестве средства профилактики развития окислительного стресса. Наиболее целесообразным является применение селенорганических соединений, как низкотоксичных доноров микроэлемента. С этой точки зрения представляет интерес исследование корректирующих свойств селенопирана (9-фенилсимметричного октагидроселеноксанта), так как в модельных экспериментах и исследованиях на животных он оказывал выраженное адаптогенное, иммуномодулирующее и антиоксидантное действие [Боряев Г.И., 2001].

Цель и задачи исследования

Цель работы: изучение системы антиоксидантной защиты различных органов крыс на этапах онтогенеза при алиментарном и токсическом воздействии.

Задачи исследования:

- Изучить онтогенетические особенности ферментного звена системы антиоксидантной защиты крыс раннего неонатального, пубертатного, репродуктивного и старческого периода.
- Изучить адаптационные возможности системы антиоксидантной защиты при направленном алиментарном и токсическом воздействии на каждом онтогенетическом этапе.
- Выявить возрастные группы риска по развитию окислительного стресса при токсическом и алиментарном воздействии.
- Выявить взаимосвязь между изменением параметров ферментного и неферментного звена антиоксидантной системы в онтогенезе при токсическом и алиментарном воздействии.

- Изучить адекватность применения селенопирана и его комплекса с витаминами Е и С для коррекции окислительного стресса, вызванного направленным токсическим и алиментарным воздействием.

Научная новизна

Впервые выявлен специфичный характер изменения активности ферментов на этапах онтогенеза, на основании чего была установлена ведущая роль глутатионпероксидазы в обеспечении адаптационных реакций антиоксидантной защиты клеток. Установлена тканеспецифичность возрастной динамики активности глутатионредуктазы и супероксиддисмутазы. В пубертатном периоде выявлена прямая положительная корреляция активности глутатионпероксидазы и концентрации селена в печени, свидетельствующая о ведущей роли на этом этапе развития алиментарного фактора (обеспеченность селеном). Установлено, что в раннем постнатальном периоде система антиоксидантной защиты зависит от адекватного функционирования антиоксидантной системы кормящей самки. Выявлено, что у особей репродуктивного возраста наряду с высоким адаптационным потенциалом антиоксидантной системы крови, кишечника и печени отмечается функциональная недостаточность механизмов адаптации миокарда и аорты при алиментарно-индуцированном окислительном стрессе. Установлено, что, несмотря на достаточно высокую фоновую активность ферментов в старческом периоде, система антиоксидантной защиты имеет низкие адаптационные возможности в условиях окислительного стресса и зависит от поступления антиоксидантов с пищей.

Практическая значимость работы

Результаты работы позволяют рекомендовать разработанные модели токсического и алиментарного окислительного стресса для научных исследований, так как они предоставляют возможность прогнозировать эффективность и индивидуализировать методы алиментарной антиоксидантной коррекции с учетом онтогенетического этапа. Данные об онтогенетических особенностях антиоксидантной системы могут быть использованы в научно-исследовательской работе, медицинской и педагогической практике, а также при разработке новых видов биологически активных добавок к пище антиоксидантного действия.

Апробация работы

Апробация работы проведена на межлабораторной конференции ГУ НИИ питания РАМН. Материалы диссертационной работы доложены на Международной Конференции «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2003), заочной Конференции молодых ученых «От фундаментальной науки – к новым технологиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии» (Тверь, 2003), Международном Симпозиуме «Second international symposium on trace Elements and minerals in

medicine and biology” (Мюнхен, 2004), 4-й национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2005).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 2 статьи в научных рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, включает 26 таблиц и иллюстрирована 13 рисунками. Указатель литературы включает 43 отечественных и 300 зарубежных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование антиоксидантной системы на этапах онтогенеза проводили на крысах-самцах линии Вистар возраста (на момент начала эксперимента) 7 (ранний постнатальный период), 60 (пубертатный период), 90 (репродуктивный период) дней и 24 месяца (старческий период) [Западнюк В.И., 1971; Дубина Т.Л., 1975; Денисов А.Б., 1994]. Крысы содержались по 5 в клетке и находились на стандартном полусинтетическом рационе.

Для исследования антиоксидантной системы в условиях токсической нагрузки использовали животных 60 (пубертатный период), 90 дней (репродуктивный период) и 24 месяцев (старческий период). В течение 7-дневного эксперимента все животные находились на контрольном полусинтетическом рационе. Первая группа – контрольная (“К”); животным второй группы (“Cd”) в последние 4 дня эксперимента внутрижелудочно вводили водный раствор $CdCl_2$ в дозе 4 мг/кг живой массы [Нурмухамбетов А.Н., 1989]. Животные третьей группы (“Cd+СП”) в течение 7 дней внутрижелудочно получали масляный раствор селенопирана в дозе 0,021 мг/100 г живой массы (5,5 мкг Se/100 г массы), а $CdCl_2$ вводился аналогично второй группе, при этом селенопиран вводили через 6 часов после введения кадмия. На 8 день животных декалцитировали, за 12 часов до забоя их лишали пищи.

Для исследования антиоксидантной системы в условиях алиментарной нагрузки использовали животных 7 (ранний постнатальный период), 60 (пубертатный период), 90 (репродуктивный период) дней и 24 месяцев (старческий период). Для моделирования алиментарного окислительного стресса использовали полусинтетический рацион [Mori N., 2000], с введением 4 г/кг метионина и 50% дефицитом витамина B6 и фолиевой кислоты. Содержание селена в корме составляло 0,04 мг/кг. Животные были разделены на 3 одно-

родные группы - контроль (К) (получали стандартный полусинтетический рацион); первая опытная группа (М) – алиментарная нагрузка метионином; вторая опытная группа (М+ВМК) – алиментарная нагрузка метионином и интрагастральное введение витаминно-минерального комплекса (ВМК) в дозе, содержащей 5,5 мкг органического селена (в составе селенопирана), 1,35 мг витамина Е, 37 мг витамина С на 100 г веса животных в сутки. В экспериментах на крысах раннего постнатального периода крысят после рождения оставляли по 9-11 (нормальное вскармливание), экспериментальный рацион получала кормящая самка с 7-го дня после родов. Длительность эксперимента составила 14 дней. Животных декапитировали на 15-е сутки, за 12 ч до забоя их лишали пищи.

После декапитации у животных собирали кровь, перфузированную печень, сердце, грудную аорту и 13-15 см тонкой кишки, включая двенадцатиперстную. Гемолизаты эритроцитов, гомогенаты органов и плазму замораживали и хранили при -18°C - -20°C до исследования.

В эритроцитах, гомогенатах печени, слизистой тонкой кишки, миокарда и аорты определяли активность глутатионредуктазы (ГР) по методу [Tillotson J., Sauberlich H., 1971] в модификации [Мальцев Г.Ю., Орлова Л.А., 1994], глутатионпероксидазы (ГПО) по методу [Mills G., 1959], супероксиддисмутазы (СОД) по методу [Мальцев Г.Ю., Васильев А.В., 1994], общего и восстановленного глутатиона (GSH) по методу [Akerboom R., Sies H., 1981]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли в эритроцитах по методу Ernster Z., Nordenbrandt K. [1967], плазме по методу Michara M. et al. [1980], гомогенатах печени, кишечника, миокарда и аорты по методу Костюк В.А., Потапович А.И. [1987]. Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли в плазме и эритроцитах по методу Placer в модификации Гаврилова В.Б. [1983], в гомогенатах тканей по методу Ушкаловой В.Н. и др. [1993]. Содержание тиоловых групп определяли в плазме крови по методу [Ellman G., 1959]. Содержание селена определяли в плазме крови, печени и семенниках флуориметрическим методом [Watkinson J., 1966] в модификации [Голубкина Н.А., 1995]. Биохимическое исследование плазмы крови, включающее определение общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, липидного спектра, активности аминотрансфераз проводили на анализаторе «Спектрум» («Abbott», USA).

Для каждой исследуемой группы органов (кровь, миокард и аорта, органы пищеварения) был рассчитан общий антиоксидантный индекс (АОИ) [Мальцев Г.Ю., Васильев А.В., 1999].

Статистическая обработка: в работе анализировались показатели от 275 животных, для каждого – 59 количественных и 2 качественных признаков. Проверка нормальности выборок проводилась с помощью оценок коэффициентов асимметрии и эксцесса. Проводили вычисление среднего значения,

стандартного (среднеквадратичного) отклонения и стандартной ошибки среднего. Значимость различий между двумя средними оценивалась по критерию Стьюдента (t). Степень связи между изучаемыми признаками определялась с помощью коэффициента корреляции (r) по формуле Пирсона для количественных данных. Различия сравниваемых показателей принимались за статистически значимые при $p < 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное исследование антиоксидантной системы органов и тканей крыс на этапах онтогенеза

Исследование, проведенное у интактных животных, позволило выявить онтогенетические особенности антиоксидантной системы при нормальном развитии. Постнатальный период характеризовался высокой интенсивностью перекисного окисления липидов (ПОЛ) с последующим снижением к пубертатному периоду, а динамика концентрации продуктов ПОЛ с пубертатного до старческого периода была различной. Отмечался рост уровня ДК (который коррелировал со снижением концентрации витамина Е) и снижение уровня МДА (рис.1). Расхождение в изменении содержания промежуточных и конечных продуктов ПОЛ предполагало повышение с возрастом активности ферментов-пероксидаз, что совпало с полученными в эксперименте данными. Возрастное изменение активности глутатионпероксидазы характеризовалось значительно более высокой активностью в раннем постнатальном периоде, что обусловлено высоким уровнем экспрессии фермента для адаптации к началу дыхания, снижением у животных пубертатного возраста и повышением в репродуктивный период. Что важно, активность ГПО почти не изменялась к старческому возрасту (рис.2).

Схожая картина динамики активности ГПО и ее высокие значения в постнатальном онтогенезе подчеркивают высокую значимость фермента в адаптационных реакциях антиоксидантной защиты клеток, независимую от тканевой принадлежности (рис.2). Концентрация селена в плазме, косвенно отражающая количество ГПО плазмы, также увеличивалась с возрастом. В то же время концентрация селена в печени повышалась к пубертатному периоду, что происходило в связи с изменением характера питания (переход от молочного вскармливания к твердым кормам) (рис.2).

В отношении активности СОД была установлена тканеспецифичность. В печени и миокарде пик активности приходился на пубертатный период, в эритроцитах наблюдался рост с максимумом активности у взрослых, а в кишечнике - возрастное падение активности СОД.

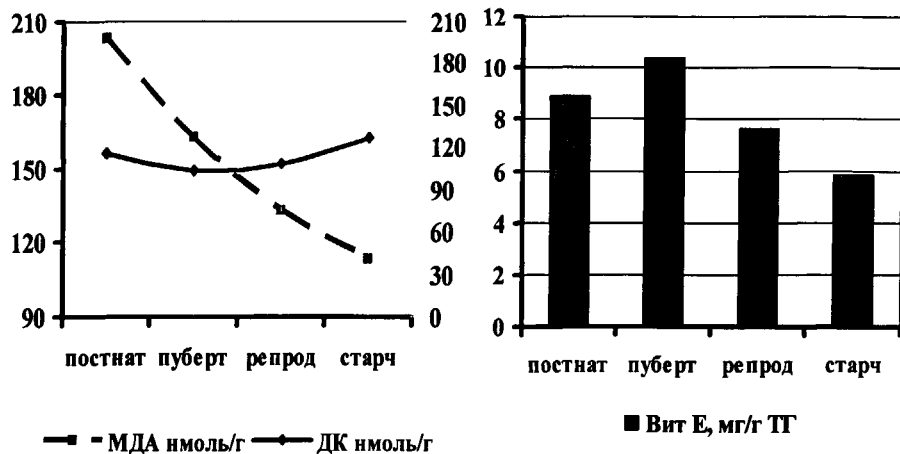


Рис.1. Возрастная динамика концентрации продуктов ПОЛ в тканях и витамина Е в плазме

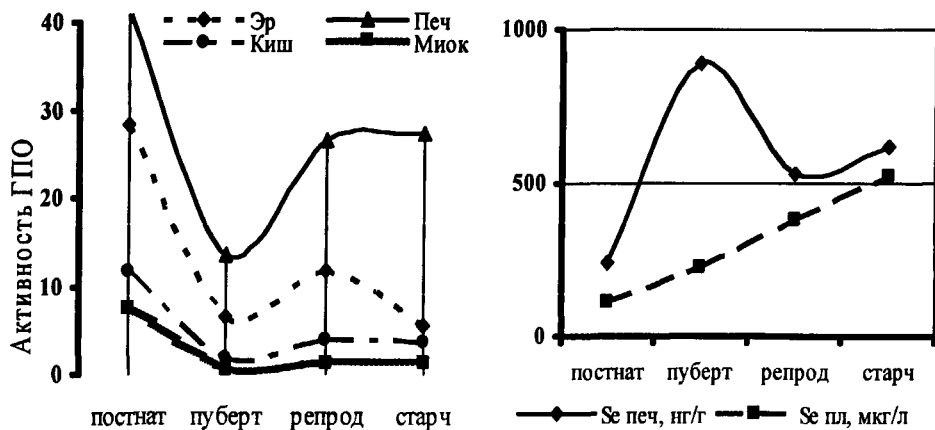


Рис 2. Возрастная динамика активности ГПО и концентрации Se

Динамика активности ГР (рис.3) характеризовалась органоспецифичностью: в миокарде и аорте высокие показатели отмечались в пубертатный пе-

риод и далее следовал спад до минимума у старых крыс. В печени и кишечнике кривые активности ГР характеризовались минимальным исходным значением, наивысшей активностью в репродуктивный период и снижением в старческом возрасте. Тем не менее, была установлена тенденция к повышению содержания восстановленного глутатиона в старческом периоде (рис.3).

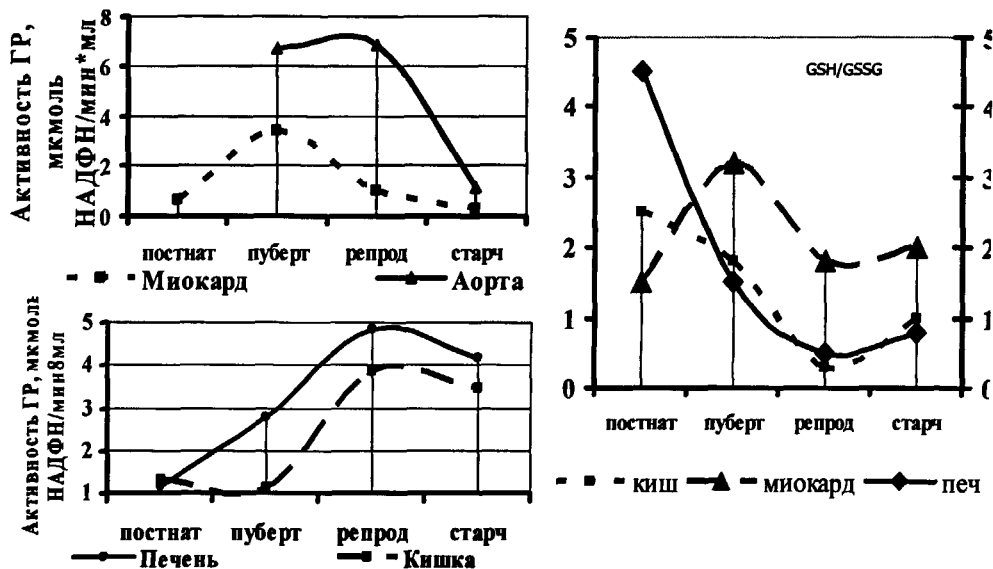


Рис.3. Возрастная динамика активности ГР и индекса GSH/GSSG

Таким образом, исследование позволило выявить онтогенетические особенности антиоксидантной защиты: общую закономерность изменения активности ГПО для всех исследуемых тканей; тканеспецифичность изменения активности СОД и ГР; высокую интенсивность ПОЛ и высокую активность ГПО в раннем постнатальном периоде; связанное с изменением характера питания повышение концентрации селена в пубертатный период; повышение содержания восстановленного глутатиона в тканях в старческий период.

Онтогенетические аспекты толерантности к развитию окислительного стресса при токсическом воздействии кадмия

Токсический окислительный стресс вызывали введением кадмия. Кадмий относится к тяжелым металлам, способным быстро реагировать с сульфгидрильными группами и замещать металлы (цинк) в активных центрах ферментов. Введение кадмия было направлено на инактивацию ферментного звена

антиоксидантной системы клеток и свободных тиолов, определяющих антиоксидантную емкость плазмы. Введение кадмия в течение 4 дней позволило выявить особенности краткосрочной адаптации антиоксидантной системы на этапах онтогенеза. Одновременно изучали протекторные свойства селенопирана.

При внутрижелудочном способе введения кадмия печень оказалась морфологически более уязвимой, что выражалось в повышении содержания продуктов ПОЛ на 20-120% по отношению к контролю. В системном кровотоке повышение концентрации ДК по отношению к контролю обнаруживали в плазме, куда они поступали в составе липопротеидов из печени. Была выявлена прямая корреляция с концентрацией ДК печени ($r=0.907$, $p<0.001$).

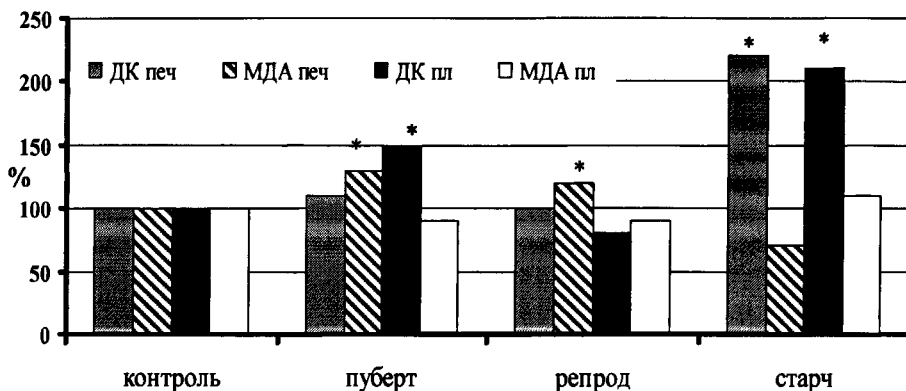


Рис.4. Изменение концентрации продуктов ПОЛ печени и плазмы при введении кадмия, * - $p<0.05$ по сравнению с контролем

Снижение активности антиоксидантных ферментов у крыс пубертатного периода свидетельствовало о высокой подверженности их прооксидантным воздействиям (рис.5). В то же время у животных репродуктивного и старческого периодов отмечалось повышение активности ГПО по отношению к контролю в печени и кишечнике, и снижение активности ГПО в эритроцитах (рис.5). Активность цистеин-содержащей ГР снижалась у крыс пубертатного и репродуктивного периода и повышалась у старых животных (рис.5).

В миокарде и аорте повышалось содержание продуктов ПОЛ, что также могло быть связано с их поступлением из плазмы, так как была выявлена положительная корреляция между этими показателями. Изменение активности ферментов в этих органах было незначительным.

Данные расчета интегрального антиоксидантного индекса свидетельствовали о развитии окислительного стресса при введении кадмия в крови у жи-

вотных репродуктивного и старческого возраста, в органах пищеварения у животных пубертатного периода (рис.6).

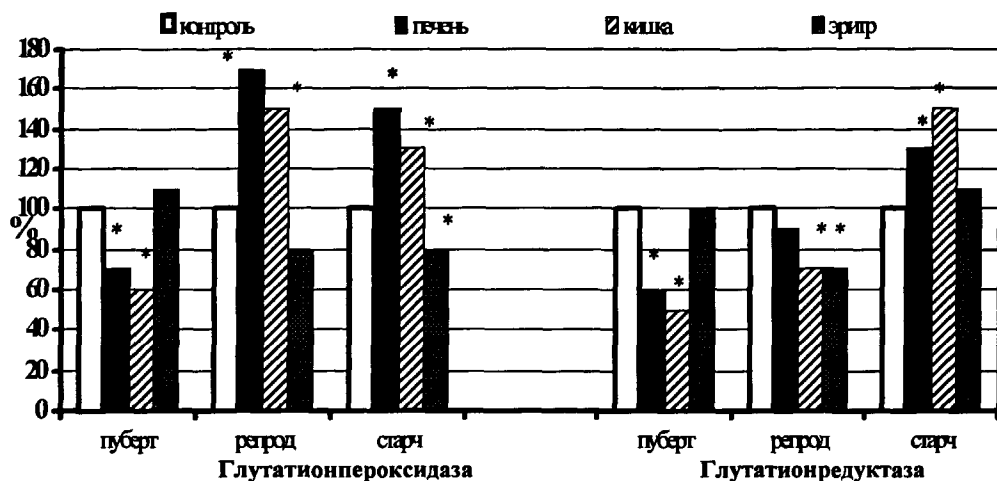


Рис.5. Изменение активности антиоксидантных ферментов при введении кадмия * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Введение селенопирана приводило к повышению АОИ на 30-60% у старых животных (рис.6), повышению концентрации восстановленных тиолов в плазме на 30%, снижению активности аминотрансфераз и концентрации креатинина в плазме. Это в большей степени свидетельствовало об антиоксидантных свойствах соединения, так как на активность ГПО введение селенопирана не влияло.

В то же время концентрация селена в тканях заметно возрастала (рис.7), а распределение селенопирана на начальных этапах метаболизма свидетельствовало о способности тканей к его накоплению, обусловленной скоростью обновления и зависящей от возраста. В условиях интенсивного роста у молодых крыс накопление селена в составе соединения составляло около 40 нг/г ткани, у взрослых 80 нг/г, а у старых - 60-100 нг/г и появлялись различия между тканями.

Результаты этой серии экспериментов показали, что адаптация антиоксидантной системы к токсическому воздействию в процессе онтогенеза изменяется, и более успешно протекает у крыс репродуктивного возраста. Введение селенопирана в значительной степени уменьшает проявления окислительного стресса у старых крыс и приводит к повышению концентрации Se в тканях.

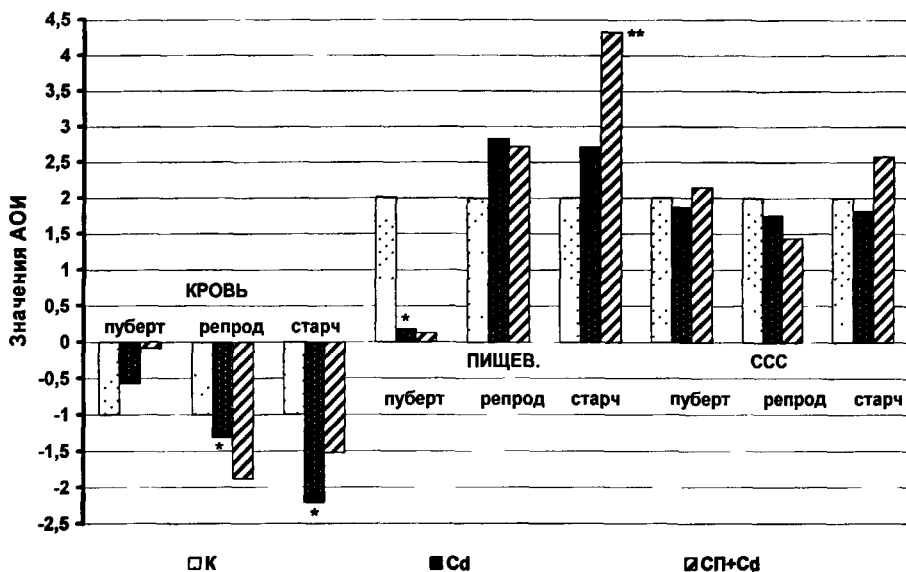


Рис.6. Изменение значений АОИ в тканях крыс при токсическом воздействии. ПИЩЕВ. – органы системы пищеварения, ССС – органы сердечно-сосудистой системы, * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем; ** - $p < 0.05$ по сравнению с группой «Cd»

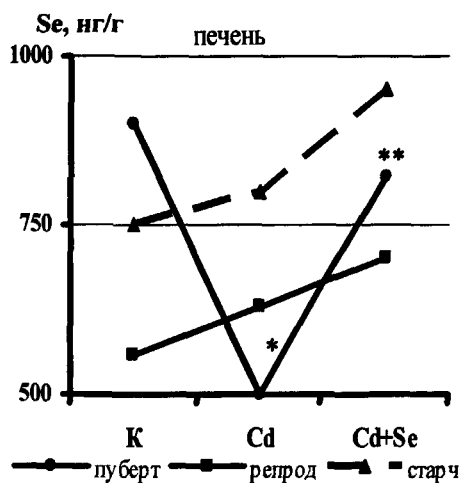
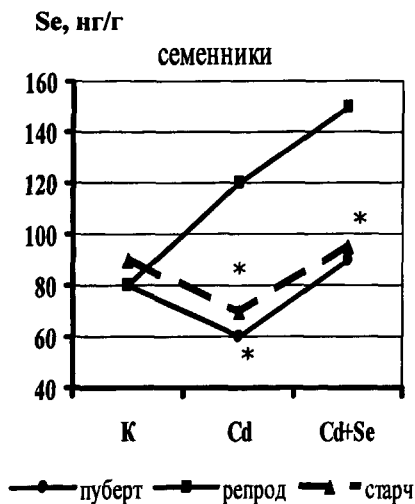


Рис.7. Изменение концентрации селена в тканях крыс при токсическом воздействии. * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем; ** - $p < 0.05$ по сравнению с группой «Cd»

Экспериментальное исследование антиоксидантной системы различных органов крыс на этапах онтогенеза при алиментарном воздействии

Алиментарный окислительный стресс моделировали введением повышенного количества метионина с ограничением поступления пиридоксина и фолиевой кислоты. Модель была выбрана с учетом ее предполагаемого влияния на основные этапы синтеза цистеина и на создание условий для повышения уровня прооксиданта гомоцистеина.

Алиментарная нагрузка привела к заметным прооксидантным изменениям в органах пищеварения. В кишечнике наблюдалось значительное увеличение концентрации ДК (рис.8), понижение активности ГР в раннем постнатальном периоде и у старых крыс, и снижение активности ГПО в 1,5-2 раза по сравнению с контролем (рис.9). Уровень восстановленного глутатиона в кишечнике значительно снижался у всех животных, кроме крыс репродуктивного периода (рис.10).

В печени у крыс раннего постнатального периода снижение концентрации продуктов ПОЛ (рис.8) сочеталось с повышением содержания восстановленного глутатиона (рис.10). Наблюдали также снижение активности ГР и ГПО печени в раннем постнатальном и пубертатном периоде по сравнению с контрольным уровнем (рис.9).

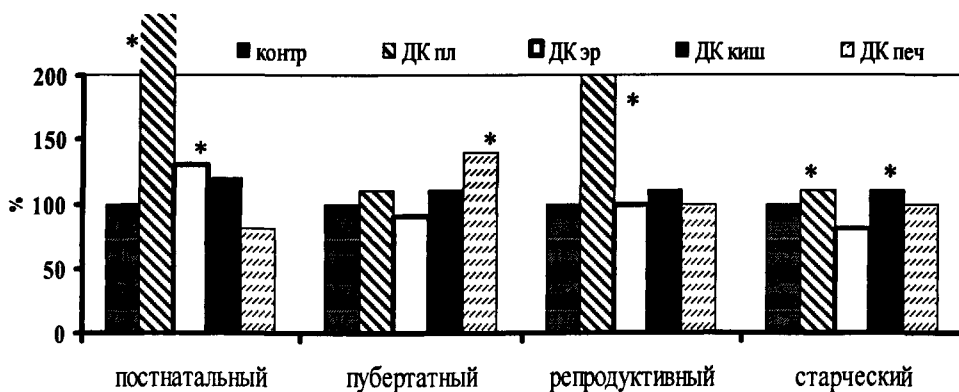


Рис.8. Изменение концентрации продуктов ПОЛ при алиментарном воздействии, * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Применение экспериментальной модели выявило разницу в изменении изучаемых показателей между тканями. Предполагаемое повышение концентрации гомоцистеина оказывало наиболее выраженное влияние на антиокси-

дантную систему крови. Вследствие этого наблюдали повышение содержания ДК и МДА эритроцитов и плазмы по отношению к контрольным данным (рис.8) и снижение концентрации тиоловых групп в плазме (рис. 11). Наиболее заметными изменения были в раннем постнатальном и пубертатном периоде, и сопровождались снижением активности ферментов эритроцитов по сравнению с контрольными значениями (рис.9).

Расчет АОИ для печени и кишечника показал (рис.12), что наиболее устойчивыми к изменению рациона были животные репродуктивного и постнатального периода. В пубертатный и старческий период наблюдалось состояние окислительного стресса. Введение витаминно-минерального комплекса приводило к увеличению значений АОИ у всех крыс, за счет повышения активности ферментов и снижения концентрации продуктов ПОЛ.

Расчет АОИ для миокарда и аорты (рис.12) выявил развитие окислительного стресса у крыс репродуктивного возраста (за счет значительного повышения в крови концентрации продуктов ПОЛ), и это состояние не купировалось введением витаминно-минерального комплекса. У старых крыс введение антиоксидантов способствовало достоверному повышению АОИ миокарда и аорты (рис.12) (за счет повышения активности ГПО и снижения концентрации ДК миокарда).

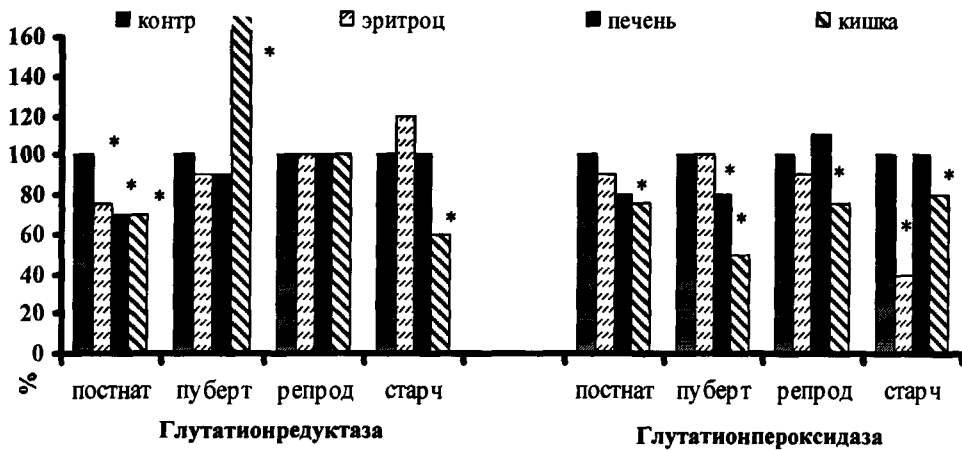


Рис.9. Изменение активности антиоксидантных ферментов при алиментарном воздействии, * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

По результатам расчета АОИ крови (рис.12), состояние окислительного стресса наблюдали в постнатальном, пубертатном и репродуктивном периоде. Введение витаминно-минерального комплекса повышало значение индек-

са у животных пубертатного, репродуктивного и старческого периода благодаря снижению концентрации МДА в крови. Результаты данной серии экспериментов выявили, что алиментарная нагрузка метионином приводит к окислительному стрессу с угнетением активности ГР и ГПО и снижением содержания восстановленного глутатиона тканей и тиоловых групп плазмы. Антиоксидантная система животных в раннем постнатальном и пубертатном периоде отличается низкой устойчивостью к развитию окислительного стресса. Введение исследуемого витаминно-минерального комплекса повышает активность ферментов, концентрацию восстановленного глутатиона, концентрацию селена в тканях и снижает содержание продуктов ПОЛ, что наиболее ярко проявилось в постнатальном периоде и у старых крыс.

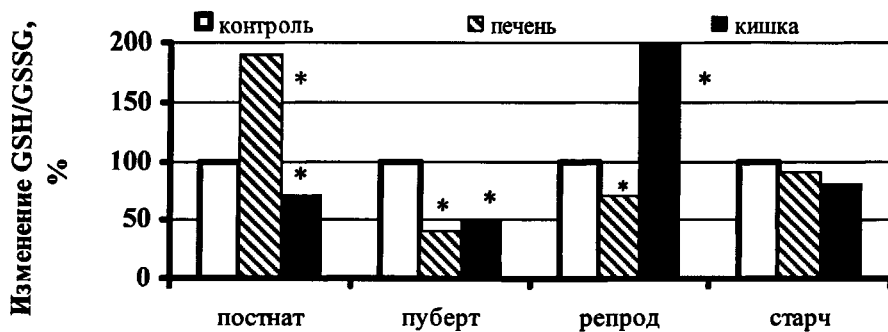


Рис.10. Изменение концентрации восстановленного глутатиона в органах пищеварения при алиментарном воздействии, * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

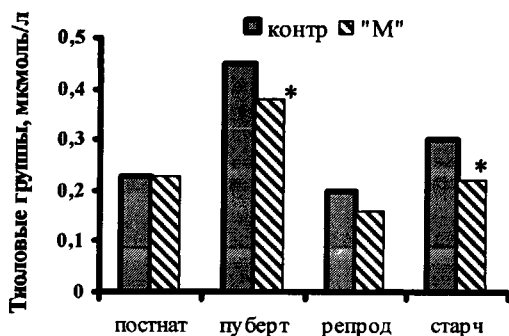


Рис.11. Изменение Концентрации тиоловых групп в плазме при алиментарном воздействии * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

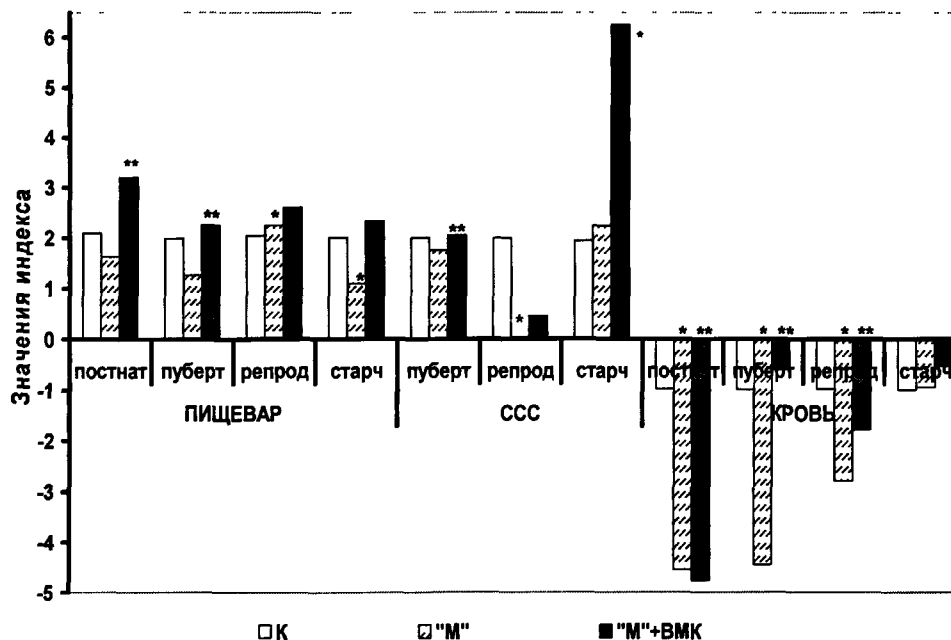


Рис.12. Изменение индекса АОИ при алиментарном воздействии,

*- $p < 0.05$ по сравнению с контролем;

** - $p < 0.05$ по сравнению с группой «М»

Оценка адаптации системы антиоксидантной защиты к алиментарному и токсическому воздействию

Для оценки адаптации антиоксидантной системы к токсическому и алиментарному воздействию применяли метод системного анализа [Дмитриева Н.В., Глазачев О.С., 2000]. Параметрами для оценки адаптации антиоксидантной системы к воздействию считали активность ГПО и величину ДК и МДА. Проводили оценку изменения параметров, для этого рассчитывали интегральные интенсивные (сумма всех относительных изменений параметров ($\sum \Delta P$)) и экстенсивные показатели ($T = \frac{\sum \Delta P}{n}$), где (n) - общее нормированное

число измененных параметров). При этом значение T более 0,15 (выше 15%) принимали как существенное изменение комплекса параметров, выходящее за рамки удовлетворительной адаптации.

На рис.13 представлена динамика показателей T и $\sum \Delta P$ при различных методах воздействия в онтогенезе. Обращает на себя внимание сходство кривых на этапе пубертатный период – репродуктивный период и различие их на этапе старения. Возможно, что механизмы краткосрочной адаптации (к токсическому воздействию) у старых животных работают уже менее эффективно ($T > 0,15$), а более длительная по времени адаптация (к алиментарному воздействию) протекает у них достаточно успешно ($T < 0,15$). У животных в пубертатном периоде оба вида адаптации АОС были одинаково неудовлетворительными (значение показателя T значительно отличалось от 0,15).

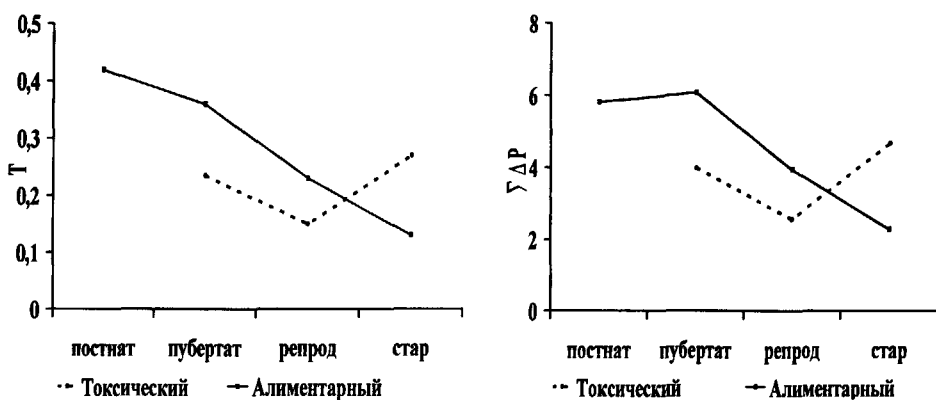


Рис.13. Онтогенетическая динамика показателей T и $\sum \Delta P$ при токсическом и алиментарном воздействии.

Таким образом, применение моделей токсического и алиментарно-индуцированного окислительного стресса позволило в комплексе оценить способность антиоксидантной системы животных к поддержанию равновесия в системе антиоксидантная система – перекисное окисление липидов. Результаты этой оценки выявили, что животные репродуктивного периода обладают широкими возможностями для поддержания системы на уровне удовлетворительной адаптации. В старческом периоде наблюдается выход за рамки удовлетворительной адаптации при краткосрочном воздействии, а в пубертатном и раннем постнатальном периодах – как при краткосрочном, так и при длительном воздействии.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено системное исследование активности ферментов антиоксидантной защиты различных органов крыс в процессе онтогенеза. Установлено тканеспецифическое изменение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в зависимости от уровня онтогенетического развития: активность супероксиддисмутазы в органах пищеварительной системы снижалась к репродуктивному периоду в 1,3-2,2 раза, в миокарде и аорте повышалась к пубертатному и репродуктивному периоду в 3,5-8,6 раз. Активность глутатионредуктазы характеризовалась возрастным повышением в эритроцитах, печени и кишечнике, и снижением – в аорте и миокарде.

2. Установлена общая закономерность изменения активности глутатионпероксидазы на этапах онтогенеза, характерная для всех исследуемых тканей и органов, что может свидетельствовать о ключевой роли глутатионпероксидазы в общем звене ферментной системы антиоксидантной защиты. Впервые установлена обратная зависимость между содержанием селена и активностью глутатионпероксидазы печени в ранний постнатальный ($r=-0.749$; $p<0.01$) и репродуктивный ($r=-0.913$; $p<0.001$) период и прямая в пубертатный период ($r=0.480$; $p<0.05$). Полученные результаты дают основание считать, что в пубертатный период функциональное состояние ферментного звена антиоксидантной защиты в значительной степени определяется алиментарным фактором, связанным с обеспеченностью селеном.

3. В старческом периоде выявлено повышение уровня восстановленных тиолов в исследуемых тканях (в 3,5-10 раз по сравнению с репродуктивным периодом), повышение содержания диеновых конъюгатов и тотальное снижение активности антиоксидантных ферментов в аорте (в 4-6 раз).

4. На модели токсического окислительного стресса установлено повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов в органах животных всех возрастных групп на 20-110% на фоне снижения концентрации восстановленных тиолов и активности глутатионредуктазы на 30-50% в пубертатном и репродуктивном периоде. Выявлено снижение значений интегрального антиоксидантного индекса крови у животных репродуктивного и старческого периодов, пищеварительной системы в пубертатном периоде, что указывает на развитие окислительного стресса.

5. Дополнительное введение в рацион метионина при детерминированной недостаточности пиридоксина и фолиевой кислоты, предполагающей развитие гипергомоцистемии, приводит к снижению активности глутатионпероксидазы кишки, печени и аорты в 1,2-1,9 раза у животных всех возрастных групп и повышению содержания диеновых конъюгатов на 15-380%, преимущественно в печени, кишке и плазме крови. Установлена декомпенсация антиоксидантной защиты по интегральному антиоксидантному индексу в

органах пищеварения у животных старческого периода, в крови и сердечно-сосудистой системе у крыс репродуктивного периода.

6. Введение селенопирана при токсическом окислительном стрессе повышает концентрацию восстановленных тиолов (в среднем на 25%) с одновременным повышением значений антиоксидантного индекса у крыс старческого периода во всех исследуемых органах (на 30-60%). Защитное действие селенопирана выражается в уменьшении активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы (на 12-60%) и концентрации креатинина (на 30-60%), что свидетельствует об антиоксидантных и мембранопротекторных свойствах селенопирана. Введение селенопирана приводит к увеличению концентрации селена в семенниках на 11-80% и печени на 24-55 %.

7. Введение селенопирана в комплексе с α -токоферолом и аскорбиновой кислотой при нагрузке метионином повышает содержание восстановленного глутатиона (на 20-70%), активность антиоксидантных ферментов (на 20-50%) и снижает содержание продуктов перекисного окисления липидов (на 10-60%) в раннем постнатальном и старческом периоде.

8. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о целесообразности комплексного использования антиоксидантов различного происхождения как механизма алиментарной коррекции функционального состояния системы антиоксидантной защиты с учетом онтогенетических особенностей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Кравченко Ю.В., Мальцев Г.Ю., Васильев А.В.* Применение БАД «Селенес» для алиментарной коррекции окислительного стресса // Материалы конференции «Актуальные вопросы нутрициологии. Роль БАД в обеспечении здоровья населения». – Днепрпетровск, 2003. – С. 253

2. *Кравченко Ю.В., Мальцев Г.Ю., Васильев А.В.* Биохимическое обоснование алиментарной коррекции окислительного стресса // Вестник РУДН. Медицина. – 2003. – № 4 (23). – С.201-205

3. *Кравченко Ю.В., Мальцев Г.Ю., Васильев А.В.* Алиментарная коррекция экспериментального окислительного стресса. // Материалы конференции «От фундаментальной науки – к новым технологиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии». – Тверь, 2003. – С.215-218.

4. *Кравченко Ю.В., Мальцев Г.Ю., Васильев А.В.* Применение селеносодержащего антиоксидантного комплекса для алиментарной коррекции окислительного стресса. // Материалы докладов научно-практической конферен-

ции «Актуальные проблемы профилактики неинфекционных заболеваний». – Москва, 2003. – С.114

5. *Kravchenko Y.V., Blinochvatov A.F., Boryaev G.I., Chijzhov V.P.* Selenopiran as effective antioxidant. // Work collection “Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and human health”. – Smolensk. – 2003. – p.55

6. *Kravchenko J.V., Maltzev G.J., Vasiliev A.V.* Application of antioxidant complex “Selenes” for oxidative stress alimentary correction. // Work collection “Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and human health” – Smolensk. – 2003. – p.185

7. *Кравченко Ю.В., Блинохватов А.Ф., Боряев Г.И., Остапчук А.В.* Протекторный эффект селенопирана при токсикозе, вызванном соединениями кадмия. // В сб.: Актуальные вопросы ветеринарии и зоотехнии в XXI веке. – Самара, 2004. – с.115-118

8. *Kravchenko Y.V., Vasiliev A.V., Maltzev G.Y., Blinochvatov A.F., Boryaev G.I* Protective activity of selenopiran under Cd-induced oxidative stress condition. // Work collection “Second international symposium on trace Elements and minerals in medicine and biology”. – Munich. – 2004. – p.56-57

9. *Кравченко Ю.В., Мальцев Г.Ю., Васильев А.В.* Исследование системы антиокислительной защиты в условиях алиментарно индуцированного окислительного стресса. // Журнал Биомедицинской химии. – 2004. – Т.50. – №5. – с.477-483.

10. *Кравченко Ю.В., Мальцев Г.Ю., Васильев А.В., Боряев Г.И.* Онтогенетические аспекты развития окислительного стресса при токсическом воздействии кадмия хлорида // Микроэлементы в медицине. – 2005. – Т.6. – вып.1. – С.11-13.

11. *Кравченко Ю.В., Остапчук А.В.* Особенности адаптации антиоксидантной системы крыс к введению кадмия на различных этапах онтогенеза. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье». – Суздаль, 2005. – С.357-359.

12. *Кравченко Ю.В., Васильев А.В., Мальцев Г.Ю., Боряев Г.И.* Коррекция селенопираном токсигенного окислительного стресса. // Материалы национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». – Смоленск, 2005. – С.48-50.

13. *Кравченко Ю.В., Боряев Г.И., Васильев А.В., Мальцев Г.Ю.* Экспериментальное исследование антиоксидантной системы на этапах онтогенеза. // Материалы национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». – Смоленск, 2005. – С.50-52.

Типография «KVINTA» Подписано в печать 10.11.2005
Заказ № 287 Тираж 150 экз.

18618

РНБ Русский фонд

2006-4

19793