

УДК 611.36:577.124/.125:616-001.1/3

НАРУШЕНИЕ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТРЕССА*С.Е. Фоменко¹, Н.Ф. Кушнерова^{1,2}, В.Г. Спрыгин¹, Т.В. Момот³*

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43) ²Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), ³Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Ключевые слова: стресс, печень, липидный обмен, углеводный обмен.

Исследовано влияние острого стресса на углеводно-липидный обмен и состояние антиоксидантного статуса печени крыс. Стресс моделировали путем вертикальной фиксации животных за дорзальную шейную складку на 22 часа. Острый стресс сопровождался снижением интенсивности аэробного гликолиза, пентозофосфатного цикла, глюконеогенеза, активацией липолиза, а также напряжением системы антиоксидантной защиты и усилением процессов перекисного окисления липидов. Нарушалась этерифицирующая функция печени, преобладающими энергосубстратами становились липиды.

Как известно, стресс является неспецифической реакцией организма на любое сильное воздействие (физическое или психологическое), нарушающее его гомеостаз. Всеобщая подверженность стрессовым воздействиям (тяжелая физическая нагрузка, переохлаждение, перегревание, эмоциональный стресс и др.) является одной из главных проблем современного общества. В результате этого воздействия формируется общий адаптационный синдром или устойчивость организма стрессу [3]. Однако по мере истощения адаптационных возможностей происходит срыв регуляторных систем организма (дизадаптация) и необратимые патологические изменения. Множество проводимых в последнее время исследований явно демонстрируют связь между стрессом и развитием различных заболеваний (язвы желудочно-кишечного тракта, гипертоническая болезнь, сердечно-сосудистые заболевания, опухоли, диабет и др.) [6]. В то же время биохимический механизм, объясняющий возникновение патологических состояний под действием стрессогенных факторов различной природы, до конца не изучен. Известно, что интенсивный стресс приводит к увеличению продукции реактивных окислительных радикалов, что сопровождается перекисидацией липидов клеточных мембран, и ведет впоследствии к тканевым повреждениям [12]. При этом по сравнению с другими органами наиболее уязвима печень, которая играет ключевую роль в жизненных процессах организма, таких как детоксикация, углеводный, липидный, энергетический обмен др. [11]. Это делает актуальным изучение биохимических механизмов, которые лежат в основе нарушений обменных процессов в данном органе под действием стресса, и возможности разработки их фармакологической регуляции.

Целью исследования явился анализ состояния углеводно-липидного обмена и антиоксидантной системы в печени крыс при остром стрессе.

Материал и методы. Эксперимент проводили на 40 крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г, содержащихся на стандартном рационе питания. Острый стресс моделировали на 20 животных путем вертикальной фиксации за дорзальную шейную складку на 22 часа (остальные крысы – контрольная группа). Животных выводили из опыта декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено комиссией по вопросам этики ТОИ ДВО РАН.

После повреждающего воздействия измеряли массу надпочечников и количество изъязвлений на слизистой оболочке желудка. О состоянии углеводного обмена судили по содержанию в гомогенате печени пировата, лактата, глицерол-3-фосфата, диоксиацетонфосфата, малата, окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺), по активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [10], а также по уровню глюкозы крови (стандартный биохимический набор «Биомед»). Соотношение между окисленной и восстановленной формами НАД (коэффициент НАД⁺/НАДН) рассчитывали по соотношению метаболитов в реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой (пироват/лактат) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназой (диоксиацетонфосфат/глицерол-3-фосфат) [1]. Состояние антиоксидантного статуса оценивали по величине антирадикальной активности [13], уровню восстановленного глутатиона и малонового диальдегида в печени и плазме крови крыс [4]. Экстракты общих липидов из ткани печени готовили по методу J. Folch et al. [9]. Хроматографическое распределение нейтральных липидов и фосфолипидов проводили методом одно- и двумерной тонкослойной хроматографии на силикагеле [8, 14]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно. Полученные данные обрабатывали по параметрическому критерию Стьюдента с предварительной оценкой на нормальность распределения в рядах.

Результаты исследования. Вертикальная фиксация крыс за шейную складку вызвала формирование типичной картины стресса с характерными геморрагическими деструкциями желудка и гипертрофией надпочечников, масса которых повышалась на 42 % ($8,4 \pm 0,3$ против $5,9 \pm 0,6$ мг/100 г массы в контроле). Количество изъязвлений на слизистой желудка составило $2,7 \pm 0,1$ шт./животное (в контроле – 0). При изучении показателей углеводного обмена в печени стрессированных животных отмечалось достоверное уменьшение содержания малата (на 67 %), глицерол-3-фосфата (на 35 %) и диоксиацетонфосфата (на 44 %) при одновременном повышении уровня лактата (на 40 %) относительно контрольной группы (табл.1). Содержание глюкозы в крови при этом понизилось на 53 % по отношению к контролю. Отмечалось снижение количества окисленной формы кофермента НАД⁺ на 30 %. Коэффициент НАД⁺/НАДН, рассчитанный по соотношению исследуемых метаболитов, снизился на 25 %, что указывало на факт смещения окислительно-восстановительного равновесия. Также отмечалось снижение (на 45 %) активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – ключевого фермента пентозофосфатного цикла.

Состояние липидного обмена печени крыс под действием стресса характеризовалось увеличением содержания свободных жирных кислот, что связано с активацией периферического липолиза в жировой ткани в ответ на выброс в кровь катехоламинов [6]. Уровень триацилглицеринов и холестерина повысился в среднем на 10 %, одновременно уменьшилось содержание эфиров жирных кислот (на 24 %) и эфиров холестерина

Таблица 1

Влияние стресса на биохимические показатели в печени и плазме крови крыс ($M \pm m$)

Показатель ¹	Контроль	Стресс
Глюкоза, ммоль/л	$4,92 \pm 0,14$	$2,31 \pm 0,17^2$
Лактат, мкмоль/г	$1,62 \pm 0,09$	$2,26 \pm 0,08^2$
Пируват, мкмоль/г	$0,125 \pm 0,006$	$0,131 \pm 0,008$
Малат, мкмоль/г	$0,70 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,03^2$
Г-3-Ф, мкмоль/г	$0,272 \pm 0,010$	$0,202 \pm 0,006^2$
ДАФ, мкмоль/г	$0,025 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,001^2$
Г-6-ФДГ, мкмоль/мин/г	$1,78 \pm 0,12$	$0,98 \pm 0,08^2$
НАД ⁺ , мкмоль/г	$0,230 \pm 0,015$	$0,161 \pm 0,012^2$
НАД ⁺ /НАДН (ДАФ/Г-3-Ф)	1024	770
НАД ⁺ /НАДН (пируват/лактат)	695	522
ГВ, мкМ/г ткани	$4,43 \pm 0,52$	$1,97 \pm 0,27^2$
АРА в печени, мкМ тролокса/г	$5,75 \pm 0,21$	$3,10 \pm 0,32^2$
АРА в плазме, мкМ тролокса/мл	$3,80 \pm 0,30$	$1,8 \pm 0,25^2$
МДА, нм/г ткани	$33,03 \pm 1,78$	$61,33 \pm 1,85^2$

¹ Г-3-Ф – глицерол-3-фосфат, ДАФ – диоксиацетонфосфат, Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, ГВ – глутатион восстановленный, АРА – антирадикальная активность, МДА – малоновый диальдегид.

² Различие с контролем статистически значимо.

Таблица 2

Влияние стресса на содержание нейтральных липидов и фосфолипидов в печени крыс ($M \pm m$)

Фракции липидов	Контроль	Стресс
<i>Нейтральные липиды</i>		
Триацилглицерины	$18,61 \pm 0,55$	$20,36 \pm 0,44^1$
Свободные жирные кислоты	$17,96 \pm 0,61$	$19,66 \pm 0,27^1$
Эфиры жирных кислот	$17,04 \pm 0,14$	$13,00 \pm 0,25^1$
Холестерин	$18,61 \pm 0,55$	$20,36 \pm 0,44^1$
Эфиры холестерина	$16,83 \pm 0,13$	$14,40 \pm 0,39^1$
Остаточная фракция	$11,00 \pm 0,42$	$11,45 \pm 0,14$
<i>Фосфолипиды</i>		
Фосфатидилхолин	$38,80 \pm 1,29$	$33,01 \pm 0,94^1$
Лизофосфатидилхолин	$5,30 \pm 0,19$	$8,72 \pm 0,14^1$
Сфингомиелин	$10,53 \pm 0,76$	$12,06 \pm 0,20^1$
Фосфатидилэтаноламин	$22,86 \pm 0,55$	$19,44 \pm 0,38^1$
Лизофосфатидилэтаноламин	$4,99 \pm 0,23$	$7,90 \pm 0,35^1$
Фосфатидилсерин	$3,10 \pm 0,46$	$4,64 \pm 0,16$
Фосфатидилинозит	$6,29 \pm 0,39$	$8,14 \pm 0,40$
Фосфатидная кислота	$2,70 \pm 0,15$	$2,16 \pm 0,24$
Дифосфатидилглицерин	$5,43 \pm 0,52$	$3,93 \pm 0,25^1$

¹ Различие с контролем статистически значимо.

(на 15 %), что свидетельствовало о нарушении этерифицирующей функции печени. В составе фракций фосфолипидов печени стресс вызвал достоверное увеличение уровня лизофракций: лизофосфатидилхолина – на 64 % и лизофосфатидилэтаноламина – на 58 %, что обусловлено увеличением активности фосфолипазы А2 под действием стресса [15]. Одновременно отмечалось уменьшение содержания основных структурных фосфолипидов мембран: фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Также на 28 % ниже контроля было зафиксировано количество маркерного фосфолипида митохондрий – дифосфатидилглицерина, колебания которого служат индикатором энергообразовательных процессов в клетке (табл. 2).

При оценке состояния антиоксидантной системы животных под действием стресса выявлено снижение величины антирадикальной активности печени и плазмы крови на 46 и 53 %, соответственно. При этом величина восстановленного глутатиона снизилась на 55 %, а содержание малонового диальдегида в печени крыс при стрессе было почти в 2 раза выше, чем такое в контроле (табл.1).

Обсуждение полученных данных. Действие стресса (вертикальная фиксация) сопровождалось выраженными изменениями в состоянии углеводного и липидного обмена в печени крыс. Анализ никотинамидных показателей и их соотношений указывает на сдвиг баланса окислительно-восстановительной системы в сторону образования восстановленных эквивалентов. Это приводит к снижению активности НАД⁺-зависимых дегидрогеназ, блокированию аэробных процессов

гликолиза и развитию тканевой гипоксии. Подтверждением этому является увеличение содержания лактата, что, с одной стороны, может быть результатом повышенного превращения пирувата в лактат для реокисления НАДН в НАД⁺, а с другой – следствием угнетения глюконеогенеза [5]. Последнее подтверждается снижением содержания глюкозы в крови стрессированных животных и является признаком фазы резистентности стресса [2], протекающей по наименее благоприятному, истощающему типу. Достоверное уменьшение общего содержания малата обусловлено снижением интенсивности реакций цикла Кребса и, как следствие, синтеза аденозинтрифосфата (АТФ). Понижение содержания диоксиацетонфосфата, очевидно, происходит в результате истощения гликогена в условиях стресса и блокирования пентозофосфатного пути окисления глюкозы. В пользу последнего указывает снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Уменьшение содержания глицерол-3-фосфата, вероятно, объясняется его утилизацией в синтезе триацилглицеринов, накопление которых происходит в печени при стрессе и обусловлено их ресинтезом из жирных кислот и глицерина. Поступая в печень, жирные кислоты накапливаются в гепатоцитах и ресинтезируются в триацилглицерины, что обуславливает развитие жировой инфильтрации органа. Увеличение уровня холестерина можно объяснить активацией его синтеза из ацетил-КоА. При стрессе происходит избыточное образование ацетата из жирных кислот в связи с усилением их распада и подавлением синтеза [5], а с другой стороны – ингибируется его окисление до CO₂ и H₂O в цикле Кребса из-за снижения активности НАД⁺-зависимых дегидрогеназ. Кроме того, повышенное образование холестерина из ацетил-КоА является компенсаторной реакцией организма для биосинтеза стероидных гормонов [7].

Полученные данные свидетельствуют о мобилизации липидов, которые транспортируются из жировой ткани в виде свободных жирных кислот как главных источников энергии. При этом их роль в энергетике организма в условиях острого стресса значительно возрастает. Энергетический обмен переключается с «углеводного» типа на «липидный», что характерно для стадии резистентности стресса [5].

В результате стресс-воздействия происходит разбалансировка в соотношении фосфолипидных фракций, при этом немаловажное значение имеет инициируемое стрессом перекисное окисление липидов, о чем свидетельствует повышение содержания малонового диальдегида в ткани печени. В результате образования в больших количествах лизофосфолипидов, оказывающих детергентное действие, снижается вязкость и повышается текучесть мембран [6]. Однако при длительной и чрезмерно интенсивной стрессорной реакции избыточное образование лизоформ фосфолипидов и их перекисное окисление могут впоследствии привести к повреждению мембран гепатоцитов. Система антиоксидантной защиты организма экспериментальных

животных в условиях стресс-воздействия испытывает напряжение, о чем свидетельствует снижение величины антирадикальной активности в плазме крови и печени, а также уровня восстановленного глутатиона.

Выводы

1. Острый стресс сопровождался снижением интенсивности аэробного гликолиза, пентозофосфатного цикла, глюконеогенеза, окислительной активности цикла Кребса и, как следствие, синтеза АТФ. При этом роль углеводов в энергетике организма значительно снижается, преобладающими энергосубстратами становятся липиды.

2. Острый стресс вызвал серию изменений метаболизма липидов в ткани печени и, соответственно, нарушений обменных процессов в организме экспериментальных животных. При этом в основе адаптивных стрессорных изменений лежит переключение метаболизма на расходование энергоемких липидных резервов.

3. В результате стресс-воздействия происходит разбалансировка в соотношении фосфолипидных фракций. Снижение содержания основных структурных фосфолипидов при одновременном накоплении их лизоформ, а также активация перекисного окисления липидов оказывают повреждающее воздействие на мембранные структуры гепатоцитов.

4. Система антиоксидантной защиты организма экспериментальных животных в условиях стресса испытывает существенное напряжение. Повышение содержания малонового диальдегида указывает на активацию процесса перекисного окисления липидов.

Литература

1. Ермолаева Л.П. Регуляция глюконеогенеза в онтогенезе. М.: Наука, 1987. 168 с.
2. Крылова С.Г., Коновалова О.Н., Зуева Е.П. Коррекция экстрактом коры и побегов облепихи крушиновидной нарушений гормонально-метаболического статуса организма крыс в условиях стресса // Эксперим. и клинич. фармакология. 2000. Т. 63, № 4. С. 70–73.
3. Надольник Л.И. Стресс и щитовидная железа // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56, вып. 4. С. 443–456.
4. Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита: руководство по методам исследования параметров системы в биологических жидкостях. Владивосток: Изд-во Дальневосточного государственного ун-та, 2003. 80 с.
5. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск: Наука, 1983. 233 с.
6. Хныченко Л.К., Сапронов Н.С. Стресс и его роль в развитии патологических процессов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2003. Т. 2, № 3. С. 2–15.
7. Agarwal V., Gupta B., Singhal U., Bajpai S.K. Examination stress: changes in serum cholesterol, triglycerides and total lipids // Indian. J. Physiol. Pharmacol. 1997. Vol. 41, No. 4. P. 404–408.
8. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid. Res. 1964. Vol. 5, No. 2. P. 270–272.
9. Folch J., Less M., Sloane Stanley G.H. A simple methods for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
10. Methods of Enzymatic Analysis / ed.: H.U.Bergmeyer. Basel. Verlag Chemie, 1984. Vol. 7, No. 10. 701 p.

11. Sánchez-Valle V., Chávez-Tapia N.C., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review // *Curr. Med. Chem.* 2012. Vol. 19, No. 28. P. 4850–4860.
12. Sahin E., Gümüslü S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold) // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007. Vol. 34, No. 5–6. P. 425–431.
13. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS+ radical cation decolorization assay // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 26, No. 9–10. P. 1231–1237.
14. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. An universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr.* 1975. Vol. 114, No. 1. P. 129–141.
15. Yu M., Jamieson G.A.Jr, Leikauf G.D., Nebert D.W. Phospholipase A2 activation and increases in specific prostaglandins in the oxidatively stressed 14 CoS/14 CoS mouse hepatocyte line // *Biochem Pharmacol.* 1998. Vol. 55, No. 2. P. 193–200.

Поступила в редакцию 31.01.2013.

DISTURBANCES IN METABOLIC PROCESSES IN LIVER OF RATS EXPOSED TO STRESS

S.E. Fomenko¹, N.F. Kushnerova^{1,2}, V.G. Spryigin¹, T.V. Momot³

¹ Pacific Oceanological Institute, FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russian Federation), ² School of Biomedicine of the Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), ³ A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690059 Russian Federation)

Summary – The authors have studied effects of acute stress on the carbohydrate and lipid metabolisms and the state of antioxidative status of liver in rats. The stress was modelled by vertically fixing the animals over dorsal nuchal fold during 22 hours. The acute stress caused a decrease in the intensity of aerobic glycolysis, pentose phosphate cycle, glycogenesis, activation of lipolysis, and tension of antioxidant protection system and enhancement of lipid peroxidation. The etherifying function of liver was disturbed, and the lipids were prevailing energetic substrates.

Key words: stress, liver, lipid metabolism, carbohydrate metabolism.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 2, p. 67–70.

УДК 581.794.2:612.433.62:615.256.51

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БОРЩЕВИКОВ

Д.М. Черняк

Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова Дальневосточного отделения Российской академии наук (692533, Приморский край, Уссурийский район, с. Горнотаежное, ул. Солнечная, 26)

Ключевые слова: борщевик Сосновского, борщевик Меллендорфа, токсичность, гонадотропное действие.

В эксперименте на белых мышах изучена биологическая активность борщевика Сосновского (интродуцент) и борщевика Меллендорфа (представитель местной флоры юга Приморского края) на токсичность и гонадотропное действие. Показано, что токсичность водного извлечения из борщевика Сосновского составляет 1,07 мл / 20 г мыши, а из борщевика Меллендорфа – 1,83 мл / 20 г мыши. Извлечение из борщевика Сосновского обладает андрогенным действием.

Одним из главных вопросов нейроэндокринных взаимоотношений является вопрос о механизмах формирования и функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадотропной системы. К гонадотропным гормонам относятся фоллитропин (фолликулостимулирующий гормон) и лютеотропный гормон, которые вырабатываются у животных в аденогипофизе, но количественные соотношения их и ритм секреции имеют половые различия [9, 12].

Гонадотропная функция гипофиза начинает формироваться на ранних стадиях внутриутробного развития. До наступления полового созревания гонадотропины секретируются тонически, то есть без выраженной цикличности. Цикличность секреции гонадотропных гормонов гипофиза определяется закономерностью половых циклов. У взрослых особей гипоталамическая регуляция их секреции осуществляется по-разному в зависимости от пола. Если у самок секреция гонадотропинов происходит циклически, то у самцов поддерживается на относительно постоянном уровне [7, 9].

Одним из важнейших физиологически активных веществ, вовлеченных в регуляцию секреции гормонов гипофиза, считается серотонин. В последние годы появились работы, свидетельствующие о его прямом влиянии на железистые клетки аденогипофиза. Важным показателем этого является специфический захват серотодина клетками аденогипофиза, в частности, гонадотропоцитами [15].

Фурукумарины, содержащиеся в соке борщевиков, обладают эстрогенной активностью. По мнению ряда исследователей, такие соединения в определенных количествах необходимы животным, так как активно участвуют в обмене веществ, стимулируют рост, молочную и мясную продуктивность [4, 5]. Одновременно они повышают половую активность животных, но в случае повышенного содержания их в растениях могут вызывать нарушение функции размножения, т.е. привести к увеличению количества перегулов, к абортам, бесплодию и запоздалой лактации у перволеток [3].

Работы В.Г. Шиманова [13] являются подтверждением этого положения. В них автор обратил внимание на перегулы и бесплодие каракульских овец при выпасе их на пастбищах, покрытых Псоралеей костянковой, и экспериментально доказал, что семена растения и выделенная из них смесь псоралена с ангелицином обладают эстрогенной активностью от 833 до 10000 МЕ на 1 кг сухой массы. Ежедневная подкормка семенами псоралеи белых мышей (0,3 г) и каракульских овец (200 г на голову) в случной период временно нарушала половой цикл, вызывая тем самым стерилизующий эффект и бесплодие.