

тели T_3 в обеих группах выравнивались (см. таблицу).

Динамика T_4 оказалась более выраженной. В ходе половой перестройки у крыс в возрасте 2—2,5 мес показатели T_4 были выше в группе подопытных животных ($68,84 \pm 0,86$ нмоль/л), чем в контрольной ($60,14 \pm 0,75$ нмоль/л). У половозрелых крыс в возрасте 6 мес соотношения гормона принципиально менялись. В группе андрогенизированных крыс концентрация T_4 составляла $53,37 \pm 2,14$ нмоль/л и была статистически достоверно ниже, чем у нормальных крыс ($63,57 \pm 1,81$ нмоль/л).

Таким образом, работа с системой "Амерлайт" позволила выявить специфические закономерности динамики гормонов при синдроме поликистозных яичников у белых крыс. На фоне значительного дефицита прогестерона, характерного для указанного синдрома, обнаружены различия в концентрациях T_3 и T_4 в зависимости от статуса половозрелости, что можно расценивать как результат компенсаторных перестроек. Конечным итогом явилось достоверное снижение содержания T_4 в сыворотке и плазме крови у андрогенизированных животных с поликистозом яичников в возрасте 6 мес. Этот период онтогенеза у нормальных крыс соответствует репродуктивному расцвету. Отмеченная динамика гормонов логично связана с характером морфологических изменений щитовидной железы, свидетельствующих о переходе к состоянию гипотиреоза при выраженном развитии поликистоза яичников крыс.

Выводы

1. Суммарная оценка данных анализа содержания T_3 и T_4 в сыворотке и плазме крови белых

крыс при моделировании поликистоза яичников, основанная на конкурентном иммунометрическом методе, свидетельствует о формировании гипотиреоза в ходе онтогенеза подопытных животных.

2. Уровень T_3 и T_4 в сыворотке и плазме крови белых крыс с синдромом поликистозных яичников в период, соответствующий пубертату, достоверно превышал аналогичные показатели у нормальных животных. В период половозрелости имело место выравнивание показателей T_3 в опытной и контрольной группах животных и выраженное снижение уровня T_4 у андрогенизированных самок крыс по сравнению с нормальными.

3. Содержание прогестерона у нормальных крыс значительно превышало этот показатель у животных с поликистозом яичников как в период полового созревания, так и в половозрелом состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В. В. Реактивно-деструктивные и репаративные процессы овариальной железы млекопитающих в норме и при применении гомеостаза в системе репродукции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Симферополь, 1992.
2. Гончаров Н. П., Крым В. В. // Пробл. эндокринологии. — 1992. — № 5. — С. 17—19.
3. Королев В. А., Ромашова М. Ф., Лазарев К. Л. Актуальні питання морфології. — Івано-Франківськ, 1994. — С. 88.
4. Резников А. Г., Демкин Л. П., Носенко Н. Д. // Пробл. эндокринологии. — 1976. — № 6. — С. 71—76.
5. Ромашова М. Ф., Королев В. А., Лазарев К. Л. // Конференция морфологов. — Черновцы, 1996. — С. 277—278.
6. Шакаева Ф. В., Коренева Г. П. // Акуш. и гин. — 1986. — № 5. — С. 26—27.
7. Эндокринно-гинекологическая патология в практике терапевта / Под ред. С. А. Шадрин. — Свердловск, 1991.
8. Whitehead T. et al. // Nature. — 1983. — Vol. 305. — P. 158—160.

Поступила 30.04.97

© П. К. Телушкин, 1998

УДК 616.153.915-39+616.153.1]-02:577.175.722]-092.9

П. К. Телушкин

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, АКТИВНОСТЬ НАДФ-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ И ПРОТЕАЗ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ ИНСУЛИНА

Кафедра биоорганической и биологической химии (зав. — доц. Т. М. Лобова) Ярославской государственной медицинской академии

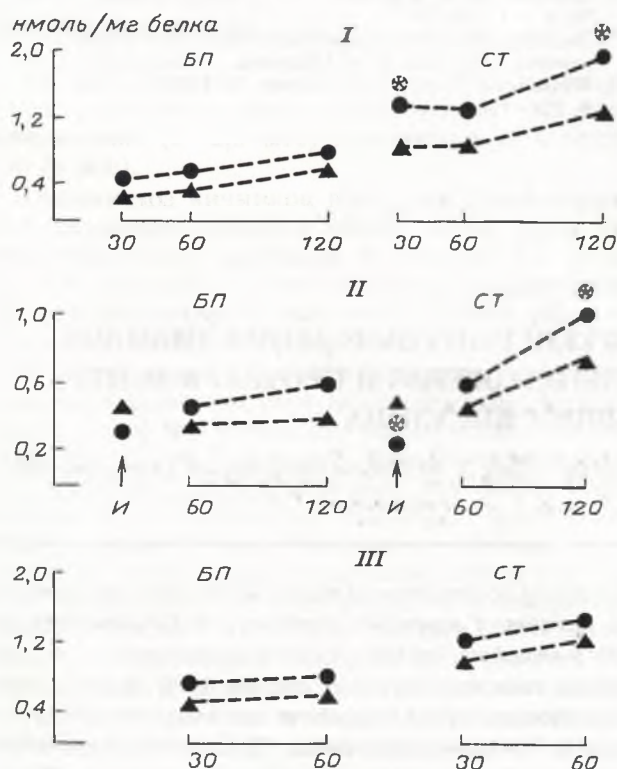
В больших полушариях и стволе мозга крыс, перенесших 7—9 гипогликемических ком, выявлено увеличение скорости накопления малонового диальдегида, уменьшение активности супероксиддисмутазы, НАДФ-зависимых глюкозо-6-фосфат-, малат-, изоцитратдегидрогеназ и глутатионредуктазы, а также снижение уровня диеновых конъюгатов. В структурах ствола мозга найдено увеличение активности нейтральных и кислых протеаз. Обнаруженные изменения являются свидетельством окислительного стресса, развивающегося в нервной ткани при неоднократном воздействии гипогликемии, возникают в восстановительном периоде после купирования гипогликемической комы глюкозой и могут иметь значение в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии.

The rate of accumulation of malonic dialdehyde was increased, the activities of superoxide dismutase, NADP-dependent glucose-6-phosphate, malate, isocitrate dehydrogenases and glutathione reductase decreased, and the levels of diene conjugates decreased in the hemispheres and brain stem of rats subjected to 7-9 hypoglycemic comas. The activities of neutral and acid proteases were increased in the stem structures. The detected changes indicate an oxidative stress developing in the nerve tissue after repeated hypoglycemic exposures. Such changes appear after glucose arrest of hypoglycemic coma and can be important in the pathogenesis of posthypoglycemic encephalopathy.

Лечение сахарного диабета, инсулинома поджелудочной железы, ряд заболеваний печени и желудочно-кишечного тракта сопровождаются неоднократно возникающей гипогликемией, которая может служить причиной необратимого повреждения нейронов и приводить к нарушению функций мозга — постгипогликемической энцефалопатии [2, 4, 9, 13]. Кроме того, интенсивная терапия сахарного диабета предполагает использование высоких доз инсулина и как следствие большую вероятность возникновения гипогликемии [10]. Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) является механизмом, приводящим к повреждению клеток независимо от природы патогенного воздействия [11, 12], поэтому в работе исследована интенсивность ПОЛ и связанных с ним реакций в мозге крыс при многократном введении гипогликемических доз инсулина.

Материалы и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой тела 180—220 г. Все животные находились на обычном пищевом рационе и перед опытом голодали в течение 18—24 ч, воду получали без ограничения. Гипогликемическую кому (концентрация глюкозы в крови около 1 мМ/л, утрата постуральных рефлексов) вызывали внутримышечной инъекцией 40 ЕД инсулина на 1 кг массы тела. Купирование комы осуществляли введением 3 мл 40% раствора глюкозы в желудок.



Интенсивность накопления МДА в гомогенатах мозга крыс, перенесших 7—9 гипогликемических ком, при добавлении Fe^{2+} и аскорбата (I) и в отсутствие Fe^{2+} и аскорбата (II), а также у крыс в состоянии гипогликемической комы в присутствии Fe^{2+} и аскорбата (III).

И — исходный уровень; 30, 60, 120 — время инкубации (в мин). Треугольник — контроль; кружок — опыт. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ($p < 0,05$).

Таблица 1

Уровень ДК (в $E_{232} \cdot 1000/\text{мг}$ ткани), активность СОД (в ЕД/мг белка) и НАДФ-зависимых дегидрогеназ (в нмоль/мин/мг белка) в мозге крыс в состоянии гипогликемической комы и через 30 мин после купирования ее глюкозой ($M \pm m$)

Показатель	Отдел мозга	Контроль	Кома	Через 30 мин после купирования комы глюкозой
ДК	БП	$1,28 \pm 0,03$	$1,30 \pm 0,03$	$1,22 \pm 0,06$
	СТ	$1,96 \pm 0,06$	$1,86 \pm 0,13$	$2,18 \pm 0,05^*$
СОД	БП	223 ± 5	228 ± 12	214 ± 8
	СТ	229 ± 5	$180 \pm 6^*$	196 ± 18
Г-6-ФДГ	БП	$11,0 \pm 0,8$	$4,74 \pm 1,10^*$	$11,1 \pm 0,45$
	СТ	$18,3 \pm 0,6$	$11,9 \pm 1,50^*$	$17,1 \pm 0,50$
ГР	БП	$8,8 \pm 0,76$	$7,6 \pm 0,85$	$7,0 \pm 0,62$
	СТ	$12,6 \pm 1,07$	$14,0 \pm 0,98$	$15,0 \pm 1,07$

Примечание. В табл. 1 и 2 звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ($p < 0,05$); в каждой серии по 5—6 опытов.

Исследовали ткани больших полушарий (БП) и ствола мозга (СТ) крыс, находящихся в состоянии гипогликемической комы, через 30 мин после купирования однократной комы и животных, перенесших 7—9 гипогликемических ком с интервалом 2 дня, на 2-е сутки после последней комы. Контролем служили интактные животные.

Скорость накопления малонового диальдегида (МДА) оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой после инкубации 10% гомогенатов мозга в среде (в мМ): $NaCl$ — 132; KCl — 5; NaH_2PO_4 — 1,2; $MgCl_2$ — 1,3; $CaCl_2$ — 1,2; глюкоза — 10,0; pH 7,4 при $37^\circ C$ как без добавления Fe^{2+} и аскорбата, так и в их присутствии в конечных концентрациях соответственно 10^{-5} и $2 \cdot 10^{-4}$ М [4]. Уровень диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрически [1]. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) оценивали по торможению восстановления нитросинего тетразолия [3].

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49), НАДФ-малатдегидрогеназы (НАДФ-МДГ, КФ 1.1.1.40), НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИЦДГ, КФ 1.1.1.42) и глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) в цитоплазматической фракции исследовали спектрофотометрически [5].

Активность нейтральных и кислых протеаз определяли при pH 7,6 и 3,2 соответственно по накоплению тирозина, инкубируя гомогенаты мозга в присутствии денатурированного мочевиной гемоглобина [6]. Количество белка определяли по Лоури. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с применением t -критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

У крыс, находящихся в состоянии гипогликемической комы, изменений скорости накопления МДА не обнаружено как при добавлении Fe^{2+} и аскорбата, так и в их отсутствие (см. рисунок). Изменений уровня ДК и активности ГР не выявлено. Обнаружено уменьшение активности Г-6-ФДГ на 35—53% ($p < 0,01$) в исследованных отделах мозга и СОД в СТ на 19% ($p < 0,01$) (табл. 1).

Через 30 мин после купирования гипогликемической комы изменений активности дегидрогеназ и СОД не наблюдалось, при этом увеличивался уровень ДК в СТ на 11% ($p < 0,05$).

У подопытных животных, перенесших 7–9 ком, на 2-е сутки после купирования последней комы в БП наблюдалось уменьшение активности Г-6-ФДГ на 9% ($p < 0,05$), НАДФ-ИЦДГ на 9% ($p < 0,05$) и ГР на 11% ($p < 0,05$), а в СТ — уменьшение активности НАДФ-МДГ на 21% ($p < 0,05$). Активность СОД оказалась сниженной в БП и СТ соответственно на 52 и 37% ($p < 0,05$) (табл. 2). При этом наблюдали увеличение продукции МДА в СТ как стимулируемой Fe^{2+} и аскорбатом (25–30%), так и нестимулируемой (27%; $p < 0,05$).

Уровень ДК у крыс, подвергнутых неоднократной гиперинсулинизации, оказался сниженным в БП и СТ соответственно на 22 и 39% (в обоих случаях $p < 0,05$). У животных, перенесших серию гипогликемических ком, обнаружено увеличение активности нейтральных и кислых протеаз в структурах ствола мозга соответственно на 20 и 28% (в обоих случаях $p < 0,05$).

Увеличение скорости накопления МДА свидетельствует о стимуляции процессов ПОЛ в мозге крыс, подвергнутых многократной гиперинсулинизации. Уменьшение активности СОД и НАДФ-дегидрогеназ может быть связано с окислением сульфгидрильных групп белковой части молекул ферментов образующимися активными формами кислорода и азота [11], что в свою очередь снижает емкость антиоксидантных систем. Выявленное в данном эксперименте увеличение активности протеаз также, по-видимому, является свидетельством возникновения окислительного стресса, поскольку действие на геном продуктов ПОЛ приводит к индукции протеаз [12].

Повреждающее воздействие гипогликемии на мозг реализуется путем нарушений кальциевого гомеостаза, активации фосфолипаз и увеличения уровня ненасыщенных свободных жирных кислот [9], которые окисляются с существенно большей скоростью, чем эстерифицированные [7]. Уменьшение уровня ДК в мозге животных, перенесших серию гипогликемических ком, вероятно, обусловлено истощением пула легко мобилизуемых ненасыщенных высших жирных кислот в мозге крыс.

Более выраженные изменения наблюдаются в образованиях СТ. Многократное введение гипогликемических доз инсулина приводит к уменьшению интенсивности гликогенолиза в стволе мозга [8]. Высокая уязвимость структур СТ, по-видимому, связана с большим содержанием в них липидов и соответственно с потенциально большим количеством продуктов ПОЛ, которые способствуют уменьшению активности дегидрогеназ, СОД и индукции протеаз. С другой стороны, отделы СТ более чувствительны к окислительному повреждению, поскольку содержат большие количества ионов железа, накапливаемых меланином допамиnergических нейронов и освобождаемых при неблагоприятных воздействиях на мозг [11], что, возможно, и является причиной накопления МДА в инкубате в отсутствие Fe^{2+} и аскорбата (см. рисунок).

Уровень ДК (в $E_{232} \cdot 1000/\text{мг ткани}$), активность СОД (в ЕД/мг белка), протеаз (в мкг тирозина/ч/г ткани) и НАДФ-зависимых дегидрогеназ (в нмоль/мин/мг белка) в мозге крыс, перенесших серию гипогликемических ком ($M \pm m$)

Показатель	Отдел мозга	Контроль	Опыт
ДК	БП	$1,80 \pm 0,13$	$1,41 \pm 0,11^*$
	СТ	$2,55 \pm 0,05$	$1,57 \pm 0,12^*$
СОД	БП	203 ± 12	$99 \pm 14^*$
	СТ	218 ± 13	$137 \pm 24^*$
Нейтральные протеазы	БП	$85,2 \pm 3,2$	$84,6 \pm 3,6$
	СТ	$65,1 \pm 2,4$	$78,1 \pm 2,3^*$
Кислые протеазы	БП	319 ± 3	314 ± 12
	СТ	337 ± 19	$431 \pm 24^*$
Г-6-ФДГ	БП	$11,1 \pm 0,3$	$10,3 \pm 0,2^*$
	СТ	$15,9 \pm 0,5$	$16,0 \pm 0,5$
НАДФ-МДГ	БП	$2,9 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$
	СТ	$7,7 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,5^*$
НАДФ-ИЦДГ	БП	$4,4 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1^*$
	СТ	$5,5 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,1$
ГР	БП	$9,9 \pm 0,2$	$8,8 \pm 0,4^*$
	СТ	$12,8 \pm 0,8$	$12,9 \pm 0,6$

Таким образом, неоднократное воздействие гипогликемии на мозг *in vivo* приводит к активации процессов ПОЛ, уменьшению активности СОД и НАДФ-дегидрогеназ и индукции протеаз в отделах мозга. Выявленные изменения, по-видимому, имеют значение в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии. Использование препаратов, защищающих нейроны от окислительного стресса, может оказаться полезным в профилактике постгипогликемической энцефалопатии при купировании гипогликемической комы и интенсивной терапии сахарного диабета.

Выводы

1. Многократное воздействие гипогликемических доз инсулина приводит к активации процессов ПОЛ, увеличению активности протеаз и снижению активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в мозге.
2. Выявленные изменения более выражены в стволовых структурах мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
2. Генес С. Н. Гипогликемия. Гипогликемический симптомокомплекс. — М., 1970.
3. Гуревич В. С., Конторщикова К. Н., Шатилина Л. В. // Лаб. дело. — 1990. — № 4. — С. 44–47.
4. Лукьянчиков В. С., Балаболкин М. И. Гипогликемический синдром: (Этиология, патогенез, диагностика, лечение). — Вып. 1. — М., 1987.
5. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 168–176; 181–183.
6. Мурти В., Пракаш Г. С., Субрамания К. и др. // Нейрохимия. — 1985. — № 1. — С. 52–55.
7. Никушкин Е. В., Крыжановский Г. А., Михалева Л. И. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 2. — С. 174–177.
8. Телушкин П. К., Потапов П. П. // Пробл. эндокринол. — 1994. — № 5. — С. 53–54.
9. Auer R. N., Siesjo B. K. // Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. — 1993. — Vol. 7, N 3. — P. 611–625.
10. Chabriet H., Sachon C., Levasseur M., Grimaldi A. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. — 1994. — Vol. 57, N 11. — P. 1360–1365.