

ORIGINAL ARTICLE

Quantitative Alterations in the Products of Lipid Peroxidation under Stress

N.I. Koshoridze, K.O. Menabde, Z.T. Kuchukashvili, M.V.Chachua, M.D. Chipashvili

Faculty of Exact and Natural Sciences, Iv. Javakishvili Tbilisi State University. Georgia, 0128, Tbilisi, University St. 13

E-mail: ketimenabde@yahoo.com Tel.: + 995 32 303 997 (Menabde K.)

E-mail: tebr50@yahoo.com (Chachua M.)

Received February 25, 2010

Development of changes in the content of nitrogen oxide (NO) in the mitochondrial and cytosolic fractions of the brain and cardiomyocytes as well as in the blood plasma of white rats under the conditions of isolation of the animals and disturbances in their circadian cycles were studied. It was found out that the amount of NO under stress changes in various ways. Simultaneously, the quantitative changes in concentration of general lipids and intensity of peroxidation were also revealed.

key words: nitrogen oxide / lipids / malonic dialdehyde / peroxidation

ORIGINAL ARTICLE

**Количественные изменения продуктов перекисного окисления
липидов в условиях стресса**

Кошоридзе Н.И., Менабде К.О., Кучукашвили З.Т., Чачуа М.В.,
Чипашвили М.Д.

*Тбилисский Государственный Университет им. И. Джавахишвили, Факультет точных и
естественных наук, Грузия, 0128, Тбилиси, университетская 13*

E-mail: ketimenabde@yahoo.com Tel.: + 995 32 303 997 (Менабде К.)

E-mail: tebr50@yahoo.com (Чачуа М.)

Поступила в редакцию 25 февраля 2010 г.

Изучена динамика изменения количественного содержания оксида азота (NO) в митохондриальной и цитозольной фракциях головного мозга и кардиомиоцитов, а также в плазме крови белых крыс, в условиях изоляции животных и нарушения циркадного цикла. Установлено, что количество NO в процессе стресса неоднозначно меняется. Параллельно, выявлены количественные изменения концентрации общих липидов и интенсивности перекисного окисления.

Ключевые слова: оксид азота / липиды / малоновый диальдегид / перекисное окисление

Известно, что любые изменения окружающей среды в организме вызывают стресс-реакцию. Последнее выражается изменением клеточного метаболизма, активности генетического аппарата и т.д. (Левицкий Е., 1998,). При кратковременном действии стресс-факторов происходит усиление функционирования клеток и мобилизация организма в целом. Однако, при продлении стресс-реакции, организм отвечает на стресс-факторы необратимыми процессами, которые ведут к гибели клетки. К таким процессам относятся свободно-радикальное окисление, изменение количества внутриклеточного Ca²⁺, угнетение энергетического метаболизма, снижение синтеза белков и др. (Zhuravliova E. et

al., 2009, Салей А.П., Рецкий М.И. 2003, Cernak et al., 2000).

Одним из основных изменений клеточного метаболизма является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ). В нормальных условиях количество продуктов ПОЛ в тканях держится на определенном уровне, так как они необходимы для нормального функционирования организма. Они способствуют уничтожению разрушенных компонентов дыхательной цепи в митохондриях, активируют процессы пролиферации и дифференциации клеток, транспорт ионов, участвуют в регуляции проницаемости клеточных мембран, разрушении поврежденных хромосом и т.д. ПОЛ в клетке

осуществляется активной формой кислорода. Постоянный уровень продуктов ПОЛ поддерживается с помощью антиоксидантной системы клетки.

В нормальных условиях молекулярный кислород является компонентом реакции образования молекул воды. Катализатором реакции является цитохромоксидаза, которая способствует присоединению к молекуле кислорода четырех электронов. В процессе функционирования клетки O_2 может присоединять один электрон, вследствие чего образуется супероксид-анионный радикал (O_2^-). Последний, взаимодействуя с разными молекулами, индуцирует в мембранах и липопротеинах сыворотки крови ПОЛ (Radi et al., 1991). Также, одним из активированных форм O_2 является оксид азота - NO. NO способен проходить через клеточные мембраны и взаимодействуя с супероксид-радикалом, превращается в пероксиднитрит - (ONOOH), который обладает высокой реакционной способностью, разрушает клеточные структуры и вызывает смерть клеток. В кислой среде пероксиднитрит способствует высвобождению гидроксид-радикала, окисляет сульфгидрильные группы белков и участвует в нитрировании тирозиновых радикалов белков, что сопровождается изменением их свойств. Процесс разрушения клеток продолжается до включения клеточной антиоксидантной системы. ПОЛ вызывает нарушение упаковки мембранных слоев и возможное последующее нарушение целостности клеточной мембраны, что сопровождается различными патологическими процессами. В частности, воспалением, нейродегенеративными заболеваниями и т.д.

Целью представленной работы является установление взаимосвязи между изменением количества NO, общих липидов и ПОЛ в условиях воздействия таких факторов

эмоционального стресса, как изоляция животных и нарушение циркадного цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на половозрелых белых лабораторных крысах, которые подвергались социальной изоляции (в индивидуальных клетках) в условиях темноты (соотношение темнота/свет 23,5/0,5 час) в течение 10-, 20- и 30 дней. Контрольная группа находилась в естественных условиях (темнота/свет 10,00/14,00 час). После эксперимента животные декапитировались. Митохондриальные и цитозольные фракции получали методом дифференциального центрифугирования (De Robertis, 1969).

Об интенсивности синтеза NO судили по количеству продукта реакции ($NaNO_2$) взаимодействия NO с молекулярным кислородом. С этой целью к 0,4 мл исследуемой смеси добавляли 0,2 мл реактива Гриса. Раствор инкубировали в течение 15 мин. и колориметрировали при $\lambda = 540\text{nm}$ (Pahan K. et al., 2000).

Количество общих липидов определяли с помощью фосфованилинового реактива в присутствии концентрированной серной кислоты. Интенсивность красной окраски раствора, образованной вследствие реакции, измеряли колориметрически, при длине волны $\lambda = 530\text{nm}$ (Грибанов Г.А. и др., 1999).

Уровень содержания малонового диальдегида определяли колориметрически, при длине волны $\lambda = 532\text{nm}$. Метод основан на реакции малонового диальдегида с тиобарбитуратом. При высокой температуре, в кислой среде, конечным продуктом реакции является окрашенный триметидиловый комплекс (Грибанов Г.А. и др., 1999).

Определение концентрации белка производилось по методу Лоури (Lowry O.H. et al., 1951).

Таблица 1. Динамика изменения содержания NO (мкмоль/мл) в разных тканях белых крыс во время стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадного цикла

	контроль	10-дневный стресс	20-дневный стресс	30-дневный стресс
Головной мозг				
<i>митохондрии</i>	0,20±0,01	0,15±0,06	0,09±0,02	0,65±0,01
<i>цитозоль</i>	0,39±0,08	0,26±0,09	0,49±0,03	0,80±0,07
Кардиомиоциты				
<i>митохондрии</i>	0,16±0,2	0,14±0,06	0,21±0,03	0,82±0,07
<i>цитозоль</i>	0,35±0,02	0,33±0,06	0,39±0,04	0,98±0,09
Плазма крови	0,88±0,11	0,91±0,13	1,01±0,01	1,98±0,08

Таблица 2. Количественное распределения содержания общих липидов (мг/л) в разных органах белых крыс во время стресса, вызванной изоляцией и нарушением циркадного цикла

Ткани	контроль	10-дневный стресс	20-дневный стресс	30-дневный стресс
Головной мозг	2,64 ± 0,10	2,69 ± 0,19	3,00 ± 0,09	3,20 ± 0,14
Кардиомиоциты	2,04±0,33	2,50 ± 0,21	2,15 ± 0,10	2,20 ± 0,40
Плазма крови	3,42 ± 0,32	3,40 ± 0,14	4,08 ± 0,06	5,64 ± 0,17

Таблица 3. Количественное распределения малонового диальдегида (нм/л) в разных тканях белых крыс во время стресса, вызванного изоляцией и нарушением циркадного цикла

	контроль	10-дневный стресс	20-дневный стресс	30-дневный стресс
Головной мозг				
<i>митохондрии</i>	0,33±0,006	0,35±0,04	0,81±0,01	1,20±0,03
<i>цитозоль</i>	1,80 ± 0,73	1,82±0,08	1,90±0,03	1,78±0,11
Кардиомиоциты				
<i>митохондрии</i>	0,59±0,10	0,88±0,08	3,33±0,16	6,30±0,33
<i>цитозоль</i>	0,98 ± 0,12	1,05±1,03	2,40±0,27	2,47±0,19
Плазма крови	6,6±1,45	5,01±0,09	2,98±0,06	2,08±0,24

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии опытов было изучено количественное изменение содержания оксида

азота (NO) в плазме крови, головном мозгу и сердечной мышце белых крыс при изоляции животных и нарушении циркадного цикла.

Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы, в следствии 10-дневного стресса, по сравнению с контролем, количество NO уменьшается в тканях головного мозга, тогда как в плазме крови этот показатель увеличивается. В кардиомиоцитах отмечается недостоверное уменьшение количества NO. 20-дневный стресс характеризуется повышением концентрации NO в кардиомиоцитах и в плазме крови, то время, как в тканях головного мозга отмечается его количественное увеличение. Вследствие 30-дневного стресса, во всех тканях стрессированных животных, по сравнению с контролем, отмечается повышение содержания NO.

Учитывая литературные данные о количественном изменении содержания NO в условиях стресса и о его значении в перекисном окислении липидов (Fabisiak J P. et al., 2000; O'Donnell V.B., Freeman B.A., 2001), в дальнейшей серии опытов было изучено изменение количественного содержания общих липидов в разных тканях белых крыс вследствие изоляции и нарушения циркадного цикла.

Как видно из данных, приведенных в таблице 2, динамика изменения количественного содержания общих липидов в процессе стресса, неоднозначна. В частности, в плазме крови повышения содержания липидов наблюдается после 10-дневного стресса. В частности, на 20-ый день изоляции животных содержания липидов возрастает приблизительно на 20%, а на 30-ый день этот показатель возрастает до 60%. С наименьшей интенсивности повышение содержания липидов наблюдается также в головном мозге (20%), тогда как в кардиомиоцитах этот показатель практически не меняется.

Полученные данные дают основание предположить, что эмоциональный стресс, вызванный изоляцией и нарушением биоритма

животных, влечет изменения метаболизма липидов, что вероятно обусловлено ответной реакцией организма на стресс.

Как известно, метаболизм липидов тесно связан с перекисным окислением липидов (Чеснокова Н.П. и др., 2006). Исходя из этого, в дальнейших опытах была изучена интенсивность перекисного окисления липидов, что является одним из возможных компонентов быстрой реакции на стресс.

Известно, что в нормальных условиях жизнедеятельности перекисное окисление липидов (ПОЛ) в клетке поддерживается на постоянном уровне с помощью антиоксидантной системы (Bounous G., Molson J.H., 2003). Продукты ПОЛ могут являться как индукторами, так и первичными медиаторами особого состояния клетки при стрессе.

В таблице 3 представлены показатели количества малонового диальдегида (МДА), который, как известно, является одним из наиболее важных конечных продуктов перекисного окисления липидов.

Как видно из таблицы 3 изоляция животных и параллельное нарушение циркадного биоритма влияет на количественное содержание малонового диальдегида (МДА). В частности, при продолжении стресса, во всех исследуемых тканях белых крыс наблюдается достоверное увеличение содержания МДА, что в свою очередь свидетельствует об увеличении вероятности патологических состояний организма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящий проект выполнен при финансовой поддержке Национального Научного Фонда Грузии (Грант № *GNSF/ST08/2-375*). Все идеи в статье принадлежат авторам и могут не совпадать с мнением Национального Научного Фонда Грузии.

ЛИТЕРАТУРА

- Грибанов, Г.А., Костюк, Н.В., Абрамов, Ю.В., Быков, В.А., Ребров, Л.Б., Володина, Т.В. (1999) Липидные показатели кожи, мозжечка и продолговатого мозга при водно-иммерсионном стрессе у крыс. *Вопросы медицинской химии*, 2, 32-36.
- Левицкий, Е.Л. (1998) Пути и механизмы реализации антиоксидантного эффекта в клетке. *Фармакол. вісник*, 2, 68-71.
- Салей, А.П., Рецкий, М.И. (2003) Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения. *Вестник ВГУ. серия химия, биология, фармация*. 1, 75-80.
- Чеснокова, Н.П., Понукалина, Е.В., Бизенкова, М.Н. (2006) Современные наукоемкие технологии, 6, 28-34.
- Bounous, G., Molson, J.H. (2003) Antioxidant System. *Anticancer Research*, 23, 1411-1416.
- Cernak, I., Savic, V., Kotur, J., Prokic, V., Kuljic, B., Grbovic, D., Veljovic, M. (2000) Alterations in magnesium and oxidative status during chronic emotional stress. *Dev. of Research on Magnesium*, 13, 29-36.
- De Robertis, E. (1967) Structural components of the synaptic region. *Handbook of Neurochem.*, 2, 365-372.
- Fabisiak, J.P., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Sedlov, A., Lazo, J.S., Kagan, V.E. (2000) Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress. *Biochemistry*, 39 (1), 127-38.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- O'Donnel, V.B., Freeman, B.A. (2001) Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circulation Research*, 88 (1), 12-21.
- Pahan, K., Liu, X., McKinney, M.J., Wood, C., Sheikh, F.G., Raymond, J.R. (2000) Induction of nitric oxide synthase and activation of nuclear factor- κ B in primary astrocytes. *J. Neurochem.*, 74, 2288-2295.
- Zhuravliova, E., Barbakadze, T., Zaalishvili, E., Chipashvili, M., Koshoridze, N., Mikeladze, D. (2009) Social isolation in rats inhibits oxidative metabolism, decreases the content of mitochondrial K-Ras and activates mitochondrial hexokinase. *Behav Brain Res.* 28, 205(2), 377-383.