

**УДК: [612.66+616-092]: 577.15**

## **ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В МОЗГЕ И ПЕЧЕНИ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМУ СТРЕССУ**

*Волкова Ю.В.*

*ГУ “Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины”, Симферополь,  
Украина  
E-mail: volkova1804@mail.ru*

Исследования показали, что при иммобилизационном стрессе у 12- и 24-месячных животных не изменяется концентрация мочевины, мочевой кислоты и билирубина в постмитохондриальной фракции печени, у 2-месячных крыс происходит повышение концентрации мочевой кислоты и билирубина, а у 1,5-месячных крыс - накопление мочевой кислоты. В постмитохондриальной фракции мозга 1,5-месячных иммобилизованных крыс повышается концентрация мочевины. Тогда как для других исследованных возрастных групп не характерно изменение концентрации мочевины и мочевой кислоты при стрессе.

**Ключевые слова:** иммобилизационный стресс, мозг, печень, низкомолекулярные антиоксиданты.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Ранее нами было установлено, что в процессе онтогенеза происходит изменение чувствительности мозга к эффекту прооксидантных факторов стресса [1–3]. Следствием возникновения подобного сдвига может быть появление возрастных особенностей в устойчивости организма к действию повреждающих факторов стресса [2, 3]. Принимая во внимание роль эндогенных низкомолекулярных антиоксидантов в обеспечении устойчивости клеток к прооксидантным воздействиям [4, 5], в работе было предпринято изучение уровня некоторых метаболитов, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами, в мозге и печени крыс разного возраста при стрессе.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали крыс самцов линии Вистар четырех возрастных групп: I – 1,5-месячные (ранний пубертат), II – 2-месячные (поздний пубертат), III – 12-месячные (взрослые половозрелые) и IV – 24-месячные (старые). Животных всех этих возрастных групп, делили на 2 подгруппы: 1 – интактные и 2 – крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу. Для моделирования иммобилизационного стресса их привязывали к неподвижной опоре по 5 часов в день в течение 2 дней. Возникновение стресса контролировали по уровню 11 – оксикортикостероидов в крови.

Немедленно после иммобилизации крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Извлекали мозг и помещали в охлажденный до 4°C физиологический раствор. Навеску мозга гомогенизировали со средой выделения, содержащей 320 мМ сахарозы, 10 мМ Tris и 1 мМ ЭДТА (рН 7,4), в гомогенизаторе Поттера – Эльвегейма в соотношении 1:10. Для гомогенизирования печени использовали среду выделения, содержащую 250 мМ сахарозы, 10 мМ Tris и 1 мМ ЭДТА (рН 7,2). Гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли в центрифужные пробирки и центрифугировали при 20 минут при 10000g. Полученную надосадочную жидкость использовали для определения содержания мочевины и мочевой кислоты, с помощью коммерческих наборов реактивов для их энзимологического определения, а в печени еще и для определения содержания общего билирубина.

Содержание белка определяли по методу Лоури [6].

Полученные результаты подвергали статистической обработке при помощи непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Whitney.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что содержание мочевой кислоты и мочевины в постмитохондриальной фракции мозга на протяжении всего исследованного периода онтогенеза не изменяется и находится на одинаковом уровне (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в постмитохондриальной фракции мозга крыс при иммобилизации ( $M \pm m$ ;  $n = 5-6$ )**

Показатели	1,5 мес		2 мес		12 мес		24 мес	
	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс
Мочевая кислота, нмоль/мг белка	184,50±30,66	120,57±43,43	212,09±24,56	176,26±33,05	149,72±26,34	144,51±37,09	209,24±17,45	184,44±14,10
Мочевина, мкмоль/мг белка	4,40±0,84	8,87±0,98*	3,66±0,61	3,10±0,17	2,61±0,27	4,48±1,65	2,33±0,39	2,51±0,44

Примечание: \* -  $p < 0,05$  к интактным

В печени крыс обнаружены возраст-зависимые изменения в содержании этих продуктов метаболизма (табл. 2). Так, содержание мочевины в постмитохондриальной фракции данного органа с возрастом прогрессивно уменьшается. Максимальная ее концентрация выявляется у 1,5-месячных, а минимальная – у 24-месячных животных. Возрастная динамика содержания мочевой кислоты в печени имеет сложный характер. В 2-месячном возрасте ее концентрация существенно ниже, чем в 1,5- и 12-месячном возрасте. Причем содержание мочевой кислоты у 12-месячных животных на 33% выше, чем у 1,5-

месячных. Аналогичным образом концентрация билирубина в печени оказывается минимальной у 2-месячных, а максимальной – у 24-месячных крыс.

**Таблица 2**  
**Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в постмитохондриальной фракции печени крыс при иммобилизации ( $M \pm m$ ;  $n = 5-6$ )**

Показатели	1,5 мес		2 мес		12 мес		24 мес	
	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс
Билирубин, мкг/мг белка	0,56± 0,04	0,65± 0,06	**0,36± 0,05	0,59± 0,02*	0,58± 0,05	1,05± 0,25	1,12± 0,37	0,51± 0,10
Мочевая кислота, нмоль/мг белка	65,65± 5,42	95,49± 4,62*	**28,63± 2,45	58,64± 9,38*	**93,50± 7,65	105,32± 8,41	**46,57± 5,64	57,91± 1,35
Мочевина, мкмоль/мг белка	1,56± 0,20	1,91± 0,25	1,13± 0,16	0,58± 0,08*	0,94± 0,24	1,36± 0,15	0,89± 0,21	1,06± 0,32

Примечание: \* -  $p < 0,05$  к интактным; \*\* -  $p < 0,05$  к интактным 1,5 месячным

Иммобилизация животных не сопровождается изменением содержания мочевой кислоты в постмитохондриальной фракции мозга крыс всех исследованных возрастных групп. В тоже время у 1,5-месячных иммобилизованных животных происходит увеличение содержания мочевины на 78%, по сравнению с ее исходным уровнем, что, не характерно для крыс всех остальных исследованных возрастных групп.

В отличие от мозга, печень проявляет высокую лабильность в отношении содержания исследованных метаболитов при стрессе. Так в постмитохондриальной фракции этого органа 1,5- и 2-месячных животных происходит увеличение содержания мочевой кислоты на 44% и 155 % соответственно, по сравнению с ее исходным уровнем. У крыс старших возрастных групп выявляется всего лишь тенденция к формированию подобного сдвига. Аналогичным образом у 1,5-, 12- и 24-месячных животных возникает тенденция и к увеличению содержания мочевины. В тоже время у 2-месячных крыс после иммобилизации происходит уменьшение ее концентрации на 36%, по сравнению с ее исходной величиной. Одновременно с этим у них возрастает содержание билирубина на 44%, по сравнению с таковым у 2-месячных интактных животных, хотя у крыс других возрастных групп оно остается на исходном уровне.

Проведенные исследования показали, что в процессе восходящего онтогенеза в постмитохондриальной фракции мозга крыс поддерживается постоянная концентрация мочевой кислоты и мочевины. В тоже время в печени происходит зависящая от возраста модуляция уровня этих продуктов метаболизма.

Возрастные сдвиги в концентрации мочевины, мочевой кислоты и билирубина в постмитохондриальной фракции печени не имеют однонаправленного характера. Вместе с тем, анализ полученных результатов свидетельствует о выраженном уменьшении их содержания в печени у крыс позднего пубертатного возраста. У старых животных выявляется существенное понижение уровня мочевины и мочевой кислоты, которое, тем не менее, сопровождается параллельным увеличением концентрации билирубина, по сравнению с таковым в 1,5-месячном возрасте.

Принимая во внимание результаты проведенных исследований, а также выраженную антиоксидантную активность у всех исследованных продуктов метаболизма [4, 5], можно прийти к заключению о том, что у крыс позднего пубертатного возраста возникают предпосылки для понижения мощности системы антиоксидантной защиты цитозоля гепатоцитов. Следствием того становится повышение базального уровня ПОЛ в клетках печени на данном этапе онтогенеза. Предрасположенность к возникновению сдвига подобной направленности, по всей вероятности, возникает и при старении.

В отличие от печени, мозг проявляет высокую устойчивость к изменению содержания мочевины и мочевой кислоты в его постмитохондриальной фракции. Это отражает высокую резистентность нервной ткани к изменению ее гомеостаза [7]. Характерно, что устойчивость мозга к изменению концентрации исследованных конечных продуктов азотистого обмена сохраняется и в условиях иммобилизационного стресса. Единственный возникающий при этом сдвиг, связанный с повышением концентрации мочевины в мозге у 1,5-месячных иммобилизованных крыс, по всей вероятности, не оказывает влияния на суммарную мощность антиоксидантной системы нервных клеток. Очевидно, он всего лишь отражает возрастное увеличение скорости распада белков и аминокислот в нервной ткани при иммобилизации.

В печени крыс при стрессе, в отличие от мозга, происходит значительное изменение концентрации мочевины, мочевой кислоты и билирубина. Однако оно характерно только для крыс пубертатного возраста (1,5 и 2 месяца). Его проявлением у 2-месячных животных становится выраженное увеличение содержания мочевой кислоты и билирубина. Несмотря на одновременное понижение у них концентрации мочевины, можно предположить, что суммарным эффектом возникающих сдвигов при этом будет повышение мощности антиоксидантной системы в цитозоле гепатоцитов. В условиях исходно сниженного содержания данных метаболитов в постмитохондриальной фракции печени 2-месячных крыс, при стрессе это, несомненно, приобретает характер компенсаторного сдвига.

У 1,5-месячных животных при иммобилизации выявляется всего лишь тенденция к накоплению исследованных продуктов метаболизма в печени, которая реализуется в существенный сдвиг только в отношении мочевой кислоты. В то же время у взрослых и старых животных при стрессе не происходит существенных изменений в содержании мочевины, мочевой кислоты и билирубина в постмитохондриальной фракции печени.

Резюмируя выше изложенное, можно прийти к заключению о том, что мозг обладает высокой устойчивостью к возрастному изменению содержания конечных продуктов азотистого обмена (мочевины и мочевой кислоты) даже в условиях выраженного стрессорного воздействия. Печень, в отличие от мозга, проявляет лабильность в отношении уровня этих метаболитов. В большей мере она проявляется в периоде полового созревания и при старении. В позднем пубертатном возрасте в цитозоле клеток печени возникает определенное “напряжение” в азотистом обмене, следствием которого становится понижение мощности антиоксидантной защиты цитозоля, за счет понижения содержания в нем конечных продуктов метаболизма, обладающих выраженной антиоксидантной активностью. Причиной того может быть характерная для этого возраста перестройка в системе гормональной регуляции метаболизма. Уменьшение содержания низкомолекулярных антиоксидантов предопределяет повышение базального уровня процессов свободнорадикального окисления липидов в печени на данном этапе онтогенеза. В условиях стресса в гепатоцитах возникают компенсаторные сдвиги, связанные с накоплением продуктов азотистого обмена, проявляющих антиоксидантные свойства. Однако их реализация в повышение устойчивости печени к стрессорному поражению требует специального изучения.

### **ВЫВОДЫ**

1. В процессе восходящего онтогенеза в постмитохондриальной фракции мозга не происходит изменения содержания мочевины и мочевой кислоты. В постмитохондриальной фракции печени крыс 2 месячного возраста понижается содержание мочевины, мочевой кислоты и билирубина, по сравнению с таковой у 1,5-месячных крыс. Аналогичная ситуация с содержанием мочевой кислоты и мочевины возникает и у старых крыс, однако уровень билирубина у них повышается.
2. При стрессе у 2-месячных крыс происходит повышение концентрации мочевой кислоты и билирубина в постмитохондриальной фракции печени, а у 1,5-месячных крыс – накопление мочевой кислоты. У 12- и 24-месячных животных иммобилизации не сопровождается изменением концентрации исследованных метаболитов в постмитохондриальной фракции печени.
3. В постмитохондриальной фракции мозга 1,5-месячных иммобилизованных крыс повышается концентрация мочевины. Для животных 2-, 12- и 24-месячного возраста не характерно изменение концентрации мочевины и мочевой кислоты при стрессе.

### **Список литературы**

1. Lopez-Torres M., Perez-Campo R., Rojas C. et al. Sensitivity to in vitro lipid peroxidation in liver and brain of aged rats. // *Rev. Esp. Fisiol.* – 1992. -- Vol.48, N3. – P.191--196.
2. Romeo R.D., McEwen B.C. Stress and the adolescent brain // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol.1094. -- P.226--234.
3. Toledo-Rodriguez M., Sandi C. Stress before puberty exerts a sex- and age-related impact on auditory and contextual fear conditioning in the rat // *Neural Plast.* – 2007. – Vol.2007. -- P.71203.

4. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 3. – С. 2–17.
5. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
6. Protein measurement with the Pholin phenol reagent. / O.H. Lowry, K.J. Rosenbrough, A.L. Farr, K.I. Rendall. // J.Biol.Chem. - 1955. – Vol.193, N1. -- P.265--267.
7. Svennerholm L., Bostrum K., Helander C.G. et al. Membrane lipids in the aging human brain // Neurochemistry. – 1990. – Vol.12. – P.547--554.

**Волкова Ю.В. Вікові особливості зміни вмісту низькомолекулярних антиоксидантів у мозку і печінці щурів в умовах іммобілізаційного стресу / Ю.В. Волкова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 91-96.**

Дослідження показали, що при іммобілізаційному стресі у 12- і 24-місячних тварин не змінюється концентрація сечовини, сечової кислоти та білірубину в постмітохондріальній фракції печінки, у 2-місячних щурів відбувається підвищення концентрації сечової кислоти і білірубину, а в 1,5-місячних щурів – накопичення сечової кислоти. В постмітохондріальній фракції мозку 1,5-місячних іммобілізованих щурів підвищується концентрація сечовини. Тоді як для інших досліджених вікових груп не є характерною зміна концентрації сечовини і сечової кислоти при стресі.

**Ключові слова:** іммобілізаційний стрес, мозок, печінка, низькомолекулярні антиоксиданти.

**Volkova Y.V. Age-specific peculiarities of the change in low-molecular antioxidant level in rat brain and liver under conditions of immobilization stress / Y.V. Volkova // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No 2. – P. 91-96.**

It has been shown that immobilization of 12- and 24-month-old rats was not accompanied by a change in urea, uric acid and bilirubin concentrations in postmitochondrial fraction of liver. In 2-month-old rats the immobilization was accompanied by an increase in uric acid and bilirubin concentrations, in 1,5-month-old rats it was accompanied by an increase in uric acid concentration. In brain postmitochondrial fraction of 1,5-month-old rats immobilization was accompanied by an increase in urea concentration, while a change in urea or uric acid concentration wasn't characteristic for the rats of older age groups under conditions of stress.

**Keywords:** immobilization stress, brain, liver, low-molecular antioxidants.

*Поступила в редакцію 19.05.2011 г.*