

УДК 616-092.9(23.03):612.12

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ОКСИДАНТОВ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ
И ГИПОКСИЧЕСКУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ЖИВОТНЫХ
ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

Л.С. Костюченко

Рассмотрено антиоксидантстимулирующее действие горной адаптации сердечной мышцы как залог положительной биохимической модуляции его болезней и их излечения.

Ключевые слова: экзогенные антиоксиданты; перекисное окисление липидов (ПОЛ); гипоксическая устойчивость (ГУ).

**THE INFLUENCE OF EXOGENOUS ANTIOXIDANTS ON LIPID PEROXIDATION
AND HYPOXIC STABILITY OF ANIMALS IN THE HYPOXIC STRESS**

L.S. Kostyuchenko

The article regards the antioksidantstimulated action of mining adaptation of the cardiac muscle as guarantee of positive biochemical modulation of its diseases and its treatment.

Keywords: exogenous antioxidants; lipid peroxidation; hypoxic resistance.

Введение. Изучение процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ферментативных антиоксидантов при адаптации животных к среднегорью указывает на строгий контроль над ПОЛ со стороны антиоксидантной системы. Повышение антирадикальной защиты организма в условиях адаптации его к среднегорью, где доминирующим фактором воздействия на него является гипоксемия и интенсивная природная УФЛ – радиация, связано с усилением СОД-синтезирующих систем, особенно белковой части этого антиоксидантного фермента [1], а также повышением активности каталазы – ингибитора перекиси.

Наследственно направленная и возрастающая под влиянием воздействий мощность АО систем клеток и организма [2] является важнейшим фактором устойчивости последней к стрессам различной природы, которые в условиях горной экологии (1600 м) подвергаются торможению [2], т. е. стресс-протективному эффекту горной адаптации [3–5]. Предварительная адаптация предупреждала реализацию ключевого звена патогенеза стрессорного повреждения сердца, а именно: возникновение активации ПОЛ на 20 %, уменьшала степень концентрации гликогена в миокарде при стрессе [6].

Об активности ферментов, участвующих в перекисном метаболизме при длительной адаптации

к гипоксии, свидетельствуют работы сотрудников Института физиологии и экспериментальной патологии высокогорья АН Кыргызстана [3, 7–13].

К антиоксидантам, способным взаимодействовать со свободными радикалами, относятся токоферолы, которые являются липидными компонентами биомембран [14]. Уменьшение токоферолов в биологических мембранах приводит к биохимическим изменениям [15], а также к активации ПОЛ [14]. Д.Н. Яхнина [16] выдвинула концепцию о механизме защитного влияния α -ТФ при гипоксическом стрессе, опосредованном через изменение функциональной активности надпочечников, сопровождающемся значительным уменьшением в них адреналина, что является основным звеном в механизме его влияния в качестве протектора при стрессе, вызванном острой гипоксемией. Автор приписывает α -ТФ роль адаптогена, так как он снижает интенсивность стрессорной реакции, а факт накопления α -ТФ в ткани надпочечника – явление положительное [16]. В этой связи целесообразно исследовать состояние адаптированности организма к горному климату с обновленными и приобретенными свойствами, так как механизмы этих явлений до конца не ясны из-за недостаточной изученности биохимических перестроек, развивающихся

Таблица 1 – Влияние глутатиона на систему ПОЛ – АО при ГС в условиях среднегорья, n = 8–10

Серия	ДК н. моль. мг. ⁻¹ липидов	АОАл н. экв. мг. ⁻¹ липидов	СОД ед. акт. г. ⁻¹ сыр. ткани	КТ ед. актив. ⁻¹ г. мин	РВ, мин
<i>1-е сутки адаптации</i>					
Норма	0,38 ± 0,01	10,8 ± 1,4	554 ± 51	31 ± 5	-
ГС	0,87 ± 0,18	19,4 ± 4,1	413 ± 37*	25 ± 2	3,5 ± 0,4
GSH + ГС	0,40 ± 0,20	22,0 ± 3,6	424 ± 48*	40 ± 7	7,2 ± 0,3***
<i>20-е сутки адаптации</i>					
Норма	0,52 ± 0,01	15,5 ± 1,9	955 ± 234	38 ± 3	-
ГС	0,53 ± 0,1	12,4 ± 1,3	2230 ± 480*	53 ± 2**	3,0 ± 0,7
GSH + ГС	0,32 ± 0,02	14,1 ± 1,6	1540 ± 176*	61 ± 9*	1,5 ± 0,4
<i>40-е сутки адаптации</i>					
Норма	0,23 ± 0,02	22,8 ± 4,2	1964 ± 142	25 ± 7	-
ГС	0,24 ± 0,03	12,2 ± 2,8	1169 ± 334*	32 ± 1	16,6 ± 5,0
GSH + ГС	0,43 ± 0,06	14,8 ± 2,4	1628 ± 121	49 ± 8*	8,4 ± 2,0

Примечание. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ по сравнению с контролем.

в условиях недостаточной обеспеченности тканей кислородом в условиях среднегорья.

Цель данной работы – выяснение влияния α -токоферола (α -ТФ) и восстановленного глутатиона (GSH) на ПОЛ и антиоксидантную систему при гипоксическом стрессе (ГС) в условиях среднегорья.

Материал и методы. Работа выполнена на 150 белых беспородных крысах-самцах массой 140–200 г. По мере адаптации к среднегорью (1600 м) животных забивали на 1-е, 10-е, 20-е, 30-е и 40-е сутки после моделирования ГС и введения им α -ТФ в дозе 0,15 г/кг веса, и GSH – 0,5 г/кг веса. Гипоксический стресс воспроизводили путем “подъема” крыс в барокамере [17] объемом 60 см³ на высоту 12000 м со скоростью 25 м/сек¹. Температуру в барокамере поддерживали в пределах 20 °С. Резервное время (в мин) регистрировалось с момента достижения “площадки” после второго агонального вдоха.

В миокарде крыс определялась активность супероксиддисмутазы (СОД) [18], каталазы (КТ) [19] антиоксидантная активность липидов (АО-А_л) [20], содержание диеновых конъюгатов (ДК) [21], липоподобных ферментов (ЛФПП) [22], в крови определяли фермент аспартатамино-трансферазу (АСАТ) [23]. Гистологические срезы миокарда окрашивались гематоксилин-эозином и гематоксилин-основным фуксином – пикриновой кислотой [24].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследований, проведенных в условиях среднегорья (таблица 1) показали, что животные, адаптированные к нему в течение 40 суток, приобретают устойчивость к ГС (16,6 ± 5

против 3,5 ± 0,4 мин). Таким образом, после 40 суток адаптации к среднегорью РВ увеличилось в 4,7 раза ($p < 0,05$) в сравнении с данными первых суток адаптации. Отметим, что введение перед ГС таким адаптированным крысам GSH, приобретенная устойчивость к гипоксии снизилась в 2 раза (см. таблицу 1). Высокое РВ при долговременной (40-суточной) адаптации достигалось полным торможением образования ДК за счет снижения АОА липидов ткани сердца (до 53,5 %) и СОД (до 59,5 %) при сохранении активности каталазы. Эту картину моделировал GSH: менее резко снизилось АОАл (до 65 %) и СОД-активность сердца (до 83 %), наиболее интенсивно повысилась активность каталазы (до 196 %). Такой вариант АОЗ сердца, обусловленный GSH, не смог предотвратить генерацию ДК и ЛФПП при ГС; образование ДК увеличивалось до 187 %; $p < 0,01$, а ЛФПП – до 125 %; $p < 0,5$, чего не наблюдалось у контрольных крыс. В связи с этим у них РВ в 2 раза выше, чем у “глутатионовых” крыс (16,6 против 8,4 мин). Таким образом, высокие горноадаптационные уровни ферментативных (СОД и каталазы) и неферментативных (АОАл), достигнутые в сердце, благодаря перестройке его молекулярных механизмов антирадикальной защиты в соответствии с требованиями горноэкологического “стресса” с адаптационным звеном (без перехода в “патогенетическое звено” [16], участвуют в формировании неспецифической устойчивости к гипоксии. Если с целью антиоксидантной поддержки организма в процессе горной адаптации предпринимать одноразовые введения глутатиона перед ГС, то это парадоксальным образом снижает РВ. Следовательно, экзогенный природный антиоксидант – глутатион, по-видимому, не может быть

Таблица 2 – Влияние α -токоферола (ТФ) на показатели системы ПОЛ – АОС при ГС у крыс в условиях среднегорья (1600 м), n = 8–10

Серия	ДК н. моль. мг ⁻¹ липидов	ЛФПП отн. ед. флуорес.	АОАл н. экв. мг ⁻¹ липидов	СОД ед. акт. г ⁻¹ сыр. ткани	КТ ед. акт. г ⁻¹ г. мин	РВ, мин
1-е сутки адаптации						
Норма	0,38 ± 0,08	4,1 ± 0,8	10,8 ± 1,4	554 ± 51	31 ± 5	-
ГС	0,87 ± 0,1*	5,5 ± 1,0	19,4 ± 4,1*	413 ± 37*	25 ± 2	3,5 ± 0,7
ТФ + С	0,26 ± 0,1	6,0 ± 0,9	27,2 ± 4,1***	410 ± 28*	35 ± 5	8,6 ± 1,1**
30-е сутки адаптации						
Норма	0,43 ± 0,06	5,4 ± 0,3	17,2 ± 3,0	1244 ± 274	52 ± 6	-
ГС	0,38 ± 0,06	6,6 ± 0,9	21,7 ± 2,7	1864 ± 386	33 ± 1	5,5 ± 0,1
ТФ + С	следы	6,5 ± 0,6	40,8 ± 6,4***	417 ± 38***	31 ± 3***	8,4 ± 1,0*

Примечание. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ по сравнению с контролем.

дополнительным стимулятором (при долгосрочной горной адаптации) феномена гипоксической устойчивости (ГУ) организма.

Введение мембранного антиоксиданта α -токоферола, как видно из таблицы 2, после 30-суточной горной адаптации более чем в 1,5 раза увеличивает РВ. ГУ носит умеренный характер.

В первые сутки адаптации к 1600 м (ТФ + гипоксия) животные оказались устойчивыми к ГС благодаря α -токоферолу (в 2,4 раза), что было отмечено и при введении глутатиона. 30-суточная “чистая” горная адаптация почти в 2 раза увеличивала РВ, а вклад ТФ заключался в повышении ГУ в 1,5 раза на 52,7 %. Такого эффекта глутатион при ГС на 30-е сутки не имел. Из таблицы 2 видно, что в 1-е сутки адаптации к 1600 м стресс эффективно лимитировался ТФ; прежде всего образование ДК в сердце было в 2 раза больше, чем в норме.

Введение α -токоферола снизило концентрацию ДК ниже нормы.

Результаты и обсуждение. За счет каких стимуляций антиоксидантов ингибировались первичные продукты ПОЛ в сердце? Во-первых, АОА липидов ткани сердца усилилась под влиянием ТФ (до 251,8) в сравнении с данными контроля. Во-вторых, ТФ сохранил доадаптационный уровень каталазы в сердце после ГС. Низкая гипоксическая устойчивость, отмечавшаяся после ТФ + ГС на первые сутки пребывания крыс на 1600 м, сопровождалась снижением (до 74,5 %) СОД-активности сердца.

Мембранный антиоксидант α -токоферол не смог предотвратить такое снижение активности СОД при ГС. Однако выживание крыс с увеличением РВ компенсировалось вкладом ТФ в суммарную неферментативную антиоксидантную систему, которая в сердце тестируется определением АОА липидов его ткани. Общий вклад ТФ состоит в увеличении АОА липидов в сердце (до

251,8 %). Это имело место при стрессорном снижении СОД-активности сердца при ТФ + ГС до наступления горной адаптации. А когда началась долгосрочная адаптация к среднегорью (на 30-е сутки), что характеризовалось новым состоянием системы ПОЛ – АОС сердца (увеличением выше нормы АОАл до 237,2 %; т. е. в 1,7 раза; СОД-активности – более чем в 2 раза, активности каталазы – в 1,5 раза, ЛФПП – в 1,2 раза сам по себе ГС (теперь уже без ТФ) протекал благополучно (с увеличением РВ в 1,6 раза и сохранением высокого уровня СОД-активности). ТФ, который умеренно увеличивал РВ (8,4 – против 5,5 мин) парадоксальным образом повлиял на СОД-активность сердца; она снизилась до уровня ГС первых суток. А ведь чистый ГС в этот день увеличил активность СОД в сердце на 33,8 % по сравнению с увеличенной ее активностью под влиянием горной адаптации (до 149,2 %; выше нормы низкогорья). Отсюда вся нагрузка падала на долю неферментной системы АОА липидов ткани сердца. Выживание (дольше на 2,9 мин) на 12 км под влиянием ТФ перенапрягло АОА липидов сердца (до 237,2 % по сравнению с “горноадаптационной” нормой тридцатых суток). Такое перенапряжение АОА липидов сердца при глутатионовой профилактике ГС (на 30-е сутки) не наблюдалось, и выживание (на 12 км) было в 2 раза меньше. Отсюда, все же профилактика ГС – ТФ более эффективна, чем глутатионом, хотя она достигается ценой ингибирования СОД-активности сердца. “Подъем” животных в барокамере на высоту 12 км в условиях низкогорья (760 м) вызывает развитие в миокарде структурных изменений. Они проявляются отеком кардиомиоцитов и гипоксическими изменениями в последних. Такие кардиомиоциты располагаются небольшими группами в кардиальных слоях миокарда.

При суточной адаптации и действии барокамерной гипоксии появляются аналогичные

изменения миокарда, однако топография их более обширна, захватывает все слои миокарда. Наиболее выраженные изменения сердца выявляются на 10-е и 20-е сутки адаптации. Они проявляются гипоксическими изменениями кардиомиоцитов во всех слоях миокарда, выраженным периваскулярным отеком и полнокровием преимущественно крупных сосудов.

В последующие сроки адаптации (30–40-е сутки) изменения миокарда морфологически аналогичные, но встречаются лишь на ограниченных участках, преимущественно субэпикардального слоя. Сравнивая результаты введения перед ГС двух экзогенных природных антиоксидантов и без них, т. е. “чистой” горной адаптации, мы пришли к следующим **выводам**:

1. Горная адаптация инициирует перестройку ферментных и неферментных антиоксидантов (СОД, КТ и АОАл ткани) сердца, что положительно влияет на формирование интегрального феномена гипоксической устойчивости, выражающееся в постепенном и, особенно, максимальном увеличении его после долгосрочной адаптации к среднегорью;

2. Экзогенные природные антиоксиданты – глутатион и α -токоферол, примененные однократно перед ГС в начальных и поздних сроках среднегорной адаптации, неоднозначно влияют на ГУ и систему ПОЛ – АОС; α -токоферол в сочетании с долговременной адаптацией умеренно повышает гипоксическую устойчивость “ценой” ингибирования высокой “горноадаптационной” СОД-активности сердца, с переключением антирадикальной защиты с ферментной в неферментную, что реализуется увеличением более чем в 3 раза суммарной активности АОА липидов ткани сердца. Глутатион, наоборот, снижает АОАл, сохраняя высокий горноадаптационный уровень СОД-активности сердца, не обеспечивая, однако, ГУ (снижает ее в 2 раза).

3. Все это указывает на эффективность “чистой” горноадаптационной профилактики гипоксии, в основе которой лежит торможение процессов ПОЛ высокой антиоксидантной активностью сердца. Применение экзогенных антиоксидантов, пусть даже природных и мембранных, должно вызывать осторожность, так как собственные антиоксиданты адаптированных к горному климату организмов адекватно формируют ГУ, без молекулярно-клеточных механизмов антирадикальной защиты организма при действии острой гипоксии.

4. “Горноадаптированное” сердце приобретает свойства стрессоустойчивости и стабильности клеточных мембран, обладающее “калийсберегающим” эффектом и тормозящее выход в кровь маркера повреждения кардиомиоцитов – аспар-

татаминотрансферазы [2], оказались устойчивы и к некрозу миокарда адренергического генеза. Меньшая степень повреждаемости “горноадаптированного” сердца при стрессе и высокий уровень в нем антиоксидантных ферментов фундаментально обосновывают ранее установленные клинические факты о низкой частоте и доброкачественном течении ряда сердечно-сосудистых заболеваний в горных условиях и, самое главное, указывает на перспективность первичной и вторичной профилактики “стрессорных заболеваний” сердца и сосудов, в генезе которых ключевую роль играет снижение активности антиоксидантной системы и антирадикального окисления липидов.

Литература

1. Зуев И.В. Влияние антиоксидантов на перекисное окисление липидов, вызванное актиномицином / И.В. Зуев // Биохим., биофиз. и молекулярная биология. 1985. № 1. С. 3–6.
2. Барабой В.А. Роль и место перекисного окисления в механизме стресса / В.А. Барабой // Стресс и иммунитет: тез. докл. Всесоюз. конф. по проблеме психонейроиммунологии. 31 августа 1989. Ростов н/Д; Л., 1989. С. 221–222.
3. Алиев М.А. Стресспротективный эффект горной адаптации / М.А. Алиев, В.А. Лемешенко, Л.С. Костюченко и др. Фрунзе: Илим, 1989. С. 216.
4. Костюченко Л.С. Влияние α -токоферола и глутатиона на перекисное окисление липидов и антиоксидантные ферменты сердца при гипоксическом стрессе в условиях низко- и среднегорья (760, 1600 м) / Л.С. Костюченко, М.А. Алиев // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний: тез. докл. 1-й Всесоюзной конф. М., 1988. С. 68–69.
5. Костюченко Л.С. Горноадаптационное повышение АО резерва сердца и его резистентности к стрессу / Л.С. Костюченко // Материалы Всесоюзной науч. конф. 1990. С. 71–73.
6. Меерсон Ф.З. Предупреждение нарушения метаболизма и функции сердечной мышцы при иммобилизационном стрессе с помощью предварительной адаптации к коротким стрессорным воздействиям / Ф.З. Меерсон, В.Т. Долгих, В.Н. Смоленцева и др. // Вопр. мед. химии. 1985. Т. 31. Вып. 3. С. 41–45.
7. Алиев М.А. Роль антиоксидантных ферментов и антиокислительной активности в защите сердца от стрессорных повреждений в условиях Иссык-Кульского горного климата (1600 м) / М.А. Алиев, Л.С. Костюченко // Кровообращение в условиях высокогорной и экспериментальной гипоксии: тез. III Всесоюз. симпозиум. Фрунзе, 1986. С. 9.

8. *Алиев М.А.* Влияние горной адаптации на степень стрессового повреждения сердца / М.А. Алиев, Л.С. Костюченко // X Всесоюзн. съезд анатомов, гистологов и эмбриологов (Винница, 17–19 сентября, 1986 г.): тез. докл. Полтава, 1986. С. 13.
9. *Алиев М.А.* О роли увеличения внутрисердечного содержания СОД и калия в механизме повышения устойчивости крыс к гипоксическому стрессу в условиях среднегорной адаптации / М.А. Алиев, Л.С. Костюченко. М., 1987. Доп. в ВИНТИ 23.04.87, № 2881 – В 87.
10. *Алиев М.А.* Изменение ПОЛ и антиоксидантной системы миокарда, содержание тромбксана и агрегации тромбоцитов при адреналиновом повреждении сердца / М.А. Алиев, Л.С. Костюченко, А.К. Бекболотова // Кардиология. 1989. Т. 29. № 9. С. 71–81.
11. *Захаров Г.А.* Гипертрофия миокарда в горах / Г.А. Захаров, И.К. Мищенко, Е.Г. Филипченко и др. Бишкек, 2012. 172 с.
12. *Костюченко Л.С.* Изменение перекисного окисления липидов и антиоксидантов при стрессовых состояниях в условиях среднегорья: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.С. Костюченко. Бишкек, 1991. 21 с.
13. *Шаназаров А.С.* Изменение активности супероксиддисмутазы у лиц с различным уровнем устойчивости к гипоксии / А.С. Шаназаров, Г.К. Рыскулова, М.С. Байходжоев // Фармакол. коррекция гипоксич. состояний: тез. 1-й Всесоюзной конф. М., 1988. С. 145.
14. *Хмелевский Ю.Б.* Роль α -токоферола в механизме коррекции гипоксических состояний миокарда / Ю.Б. Хмелевский, В.И. Корницкая, О.И. Толстых и др. // Фармакологич. коррекция гипоксических состояний: тез. докл. 1-й Всесоюз. конф. М., 1988. С. 138–139.
15. *Архипенко Ю.В.* Участие перекисного окисления липидов в регрессии гипертрофированного сердца / Ю.В. Архипенко, М.В. Шимкович // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 1989. Т. 58. № 11. С. 556–558.
16. *Яхнина Д.Н.* Патобиохимические аспекты защитного действия α -токоферола при гипоксии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Д.Н. Яхнина. М., 1980. 40 с.
17. *Рафиков А.М.* Суточные колебания устойчивости организма к стрессорным воздействиям / А.М. Рафиков, Н.А. Агаджанян // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1971. Т. 15. № 1. С. 60–62.
18. *Чумаков В.Н.* Количественный метод определения активности цинк-медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале / В.Н. Чумаков, Л.Ф. Осинская // Вопросы мед. химии. 1977. Т. 23. Вып. 5. С. 712–716.
19. *Hubl P., Bretschneider R.* Die Titanylulfat Methode zur Bestimmung der Katalase in Blutserum und Harn Hoppe Seyler's // Z. Physiol. Chem. 1964. Bd. 335, H. 2–6. 146–155.
20. *Glaving I.* Antioxidants in animal tissue // Acta Chem. Scand. 1963. V. 17. P. 1635–1640.
21. *Plazer Z.* Lipoperoxidationssystem im biologischen Material 2 / Mit Bestimmung der Lipoperoxidation im Sangeeter organismus // Nahrung. 1968. V. 12. P. 679–684.
22. *Fletcher D.L., Dillard C.J., Tappel F.L.* Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues // Analyt. Biochem. 1973. V. 52. P. 1–9.
23. *Reitman S., Frankel S.* A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // Am. J. Clin. Path. 1957. V. 28. № 1. P. 56–59.
24. *New histochemical method for morphological diagnosis of early stages of myocardial ischemia / I.T. Lie, K.F. Holley, W.R. Rampa, J.L. Titus // Proc. Mayo Clin. 1971. V. 46. P. 319–327.*