

## ВПЛИВ СТРЕСУ НА ПЕРЕБІГ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ЩУРІВ ІЗ РІЗНОЮ РУХОВОЮ АКТИВНІСТЮ

Вплив стресу на перебіг пероксидного окиснення ліпідів у щурів із різною руховою активністю

О. В. Денефіль, М. І. Мединський

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

**Резюме.** На сьогодні в Україні й світі особливо гостро постало вивчення проблеми стресу. Перш за все це пов'язано з малорухомим способом життя під час пандемії COVID-19, по-друге, у зв'язку з війною в Україні, в яку залучений весь світ. Обидві причини сприяють розвитку стресу як гострого, так і хронічного, що спричинить у подальшому виникнення захворювань різних органів і систем.

**Мета дослідження** – оцінити розвиток оксидативного стресу в крові щурів-самців із різною руховою активністю при стресі.

**Матеріали і методи.** Досліди виконано на щурах-самцях лінії Вістар масою 150–170 г віком 3,5 місяця. Відбір тварин за руховою активністю здійснювали за допомогою методу «біле відкрите поле». Враховували кількість горизонтально пересічених квадратів і вертикальних стійок. При високих цих показниках тварин відносили до групи високоактивних, при низьких – низькоактивних. Хронічний стрес у щурів викликали з 1,5 до 3-місячного віку, що відповідає віку людини 4–17 років. Протягом цього часу тварин постійно утримували у клітках з обмеженням життєвого простору вдвічі. Забій щурів проводили під тіопентал-натрієвим знеболюванням, забирали кров, де визначали вміст дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-активних продуктів (ТБК-ап), окисно-модифікованих протеїнів (ОМП), супероксиддисмутазу (СОД) і каталазну активність (Кат). Усім тваринам робили гістологічне дослідження серця на рівні обох шлуночків у препаратах, забарвлених за Гендєн-гайном. Апоптоз переважав у тварин із високою руховою активністю як у контрольних щурів, так і тварин, які зазнали стресу. Кількість клітин, які зазнали апоптозу, була значно вищою у високоактивних тварин.

**Результати.** У групі контрольних тварин, у високоактивних самців, порівняно з низькоактивними, переважали продукти пероксидного окиснення ліпідів (ДК, ТБК-ап) і ОМП, також супероксиддисмутазна і каталазна активності. У щурів, які зазнали стресу, зріс вміст ДК, ТБК-ап, ОМП, причому більшою мірою у високоактивних щурів. Отримані дані вказують на розвиток оксидативного стресу. В тварин, які зазнали

Effect of stress on the development of lipid peroxide oxidation in rats with different motor activity

O. V. Denefil, M. I. Medynskiy

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

e-mail: denefil@tdmu.edu.ua

**Summary.** Today in Ukraine and in the world the study of the stress problem has become especially acute. Firstly, it is connected with sedentary lifestyle during the COVID-19 pandemic, and secondly, in connection with the war in Ukraine, in which the whole world is involved. Both causes contribute to the development of stress, which will lead to further diseases of various organs and systems.

**The aim of the study** – to evaluate the development of oxidative stress in the blood of male rats with different motor activity under stress.

**Materials and Methods.** The experiments performed on Wistar male-rats of 150–170 grams, aged 3.5 months. Selection of animals for motor activity carried out using the method of "white open field". The number of horizontally intersected squares and vertical posts taken into account. At high level indicators were referred to were the group of highly active animals, at low – low-active. Chronic stress in rats was from 1.5 to 3 months of age, the animals kept in cages with limited living space twice. Slaughter of rats was performed under thiopental-sodium anesthesia, blood was taken, where the diene conjugates (DC), TBA-active products (TBA-ap), oxidatively modified proteins (OMP), superoxide dismutase (SOD) and catalase activity were determined. All animals underwent histological examination of the heart at the level of both ventricles in Heidenhain-stained preparations. Apoptosis was predominant in animals with high motor activity in both control rats and stressed animals. The number of cells that underwent apoptosis was significantly higher in highly active animals.

**Results.** Products of lipid peroxidation and OMP, SOD and catalase activity were dominated in the group of control animals in highly active males, compared with low-activity. In stressed rats, the DC, TBA-ap, OMP increased, and were more in highly active rats. Antioxidant activity increased in stressed animals. SOD and catalase activity were higher in low-activity rats. The obtained data indicate the development of oxidative stress.

**Conclusion.** The development of stress depends on the motor activity. Stress causes an increase of proteins and lipid peroxidation in rats, which is more in high motor

стресу, зросла антиоксидантна активність. Причому і СОД, і каталазна активності виявилися вищими у низькоактивних самців.

**Висновки.** Розвиток стресу залежить від рухової активності тварини. Хронічний гіподинамічний стрес спричинює зростання пероксидного окиснення протеїнів і ліпідів у щурів-самців, що більше виражено у тварин із високою руховою активністю. Компенсаторно у крові щурів збільшується активність антиоксидантів, більшою мірою таке зростання виявилось серед низькоактивних особин.

**Ключові слова:** пероксидне окиснення протеїнів і ліпідів; антиоксидантна система; стрес; рухова активність.

## ВСТУП

На сьогодні в Україні й світі особливо гостро поставлено вивчення проблеми стресу. Перш за все це пов'язано з малорухомим способом життя під час пандемії COVID-19, по-друге, у зв'язку з війною в Україні, в яку залучений весь світ. Обидві причини сприяють розвитку стресу як гострого, так і хронічного, що може спричинити у подальшому виникнення захворювань різних органів і систем.

При стресі виділяється значна кількість катехоламінів, зростання яких може запустити каскад реакцій, у тому числі вільно радикального окиснення, які зможуть викликати розвиток [1, 2]. При цьому зменшується напруження кисню в органах і тканинах, виникає дефіцит аденозинтрифосфату, іони кальцію накопичуються в клітинах і позаклітинному просторі, що спричинює ушкодження клітин. Також зростає активність фосфорилаз, відбувається роз'єднання процесів окиснення і фосфорилування. При поглибленні, енергодефіциті та накопиченні іонів кальцію настає загибель клітин. При гіпоксії, впливі катехоламінів в організмі зростають процеси пероксидного окиснення ліпідів і протеїнів. Ступінь такого зростання залежить від індивідуальної реактивності організму [3], зокрема початкового рівня метаболізму, ступеня антиоксидантного захисту в тканинах та крові, зокрема антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутаза, каталаза), які сповільнюють швидкість окисних процесів [2, 4, 5], що забезпечує різну резистентність до стресів, холоду, крововтрат, гіпоксії [6], дії різних лікарських засобів. Загальновідомо, що люди мають різну рухову активність. Для визначення серед дрібних лабораторних тварин особин із різною руховою активністю використовують в експерименті тест «відкрите поле» [7]. Тварини у «відкритому полі» знаходяться під впливом стресу, на який вони реагують по-різному, що відображається на їхній руховій активності, стані автономної нервової діяльності [8]. Особливості поведінки у даному тесті дають змогу оцінити рухову, дослідницьку,

activity. The activity of antioxidants, more in low-activity individuals increased compensatory in the blood.

**Key words:** lipid and protein peroxidation; antioxidant system; stress; motor activity.

емоційну реакції, виявити особин із високою і низькою руховою активністю, стійких та нестійких до емоційного стресу тварин, зробити прогноз індивідуальної стійкості до стресу [9].

**Метою дослідження** було оцінити розвиток оксидативного стресу в гомогенаті серця щурів-самців із різною руховою активністю при стресі.

## МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ

Досліди виконано на щурах-самцях лінії Вістар масою 150–170 г віком 3,5 місяця. Тварин поділено на 2 групи – контроль і стрес. Рухову активність визначали за методикою «біле відкрите поле» (кругла арена діаметром 160 см). За однаправленою кількістю пересічених квадратів і вертикальних стійок відбирали щурів із високою і низькою руховою активністю [10].

Групи утримувалися на стандартному харчовому раціоні віварію протягом усього періоду та з вільним доступом до води для пиття. Хронічний стрес у щурів викликали з 1,5 до 3-місячного віку, що відповідає віку людини 4–17 років. Тварин постійно утримували у клітках з обмеженням життєвого простору вдвічі протягом 1,5 місяця [11]. Усім тваринам робили гістологічне дослідження серця на рівні обох шлуночків у препаратах, забарвлених за Генденгайном. У препаратах було виявлено збільшення поодиноких некротизованих клітин, що вказувало на розвиток апоптозу. Апоптоз переважав у тварин із високою руховою активністю як у контрольних щурів, так і тварин, які зазнали стресу. Кількість клітин, які зазнали апоптозу, була значно вищою у високоактивних тварин.

Усі експерименти проводили в першій половині дня в спеціально відведеному приміщенні при температурі 18–22 °С, відносній вологості 40–60 % і освітленості 250 лк. Досліди виконано з дотриманням норм Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Евтаназію щурів проводили шляхом тотального кровопускання з серця після попереднього тіопентал-натрієвого наркозу (60 мг·кг<sup>-1</sup> маси тіла тварини внутрішньочеревно). За загальноприйнятими методиками у гомогенаті серця визначали стан пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) за вмістом дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-активних продуктів (ТБК-ап) та активність антиоксидантної системи, зокрема супероксиддисмутази активність (СОД), каталазну активність [12–15].

Статистичну обробку цифрових даних виконано за допомогою програмного забезпечення Excel (Microsoft, США) та STATISTICA 6.0 (Statsoft, США). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за критерієм Стьюдента, в інших випадках – за допомогою непараметричних методів. Зміни вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ . Відмінності між величинами вважали достовірними за вірогідності альтернативної гіпотези не менше ніж 0,95 [16].

### РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

У контрольних щурів із високою руховою активністю, порівняно з низькою, вміст продуктів перок-

сидного окиснення ліпідів (ПОЛ) був вищим (табл. 1). Так, концентрація ДК була більшою на 10,6 %, а ТБК-ап – на 11,7 %.

Відповідно вищими були показники  $ОМ\text{P}_{370}$  на 20 % і  $ОМ\text{P}_{430}$  – на 24,4 % (табл. 2). Супероксиддисмутазна і каталазна активності також переважали у тварин із високою руховою активністю, відповідно на 34,4 і 58,3 % (табл. 3). Отримані дані вказують на те, що при високій руховій активності оксидативні процеси перебігають на вищому рівні, що спричинює компенсаторно зростання активності антиоксидантів. Статистично достовірної різниці між часткою апоптично змінених клітин не виявлено, що вказує на достатній захист у двох групах щурів.

Стрес викликав наступні зміни показників. Відмічено достовірне зростання практично усіх досліджуваних значень як у самців із високою, так і низькою руховою активністю. Так, концентрація ДК була вищою у самців із високою руховою активністю на 22,4 %, з низькою – на 15,9 %. Причому залишалася статистично достовірною різниця у вищих значеннях ДК у тварин із високою руховою активністю порівняно з низькою. Вона переважала

**Таблиця 1.** Зміни вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів у крові серця щурів при стресі (M±m)

Показник	Група			
	контроль		стрес	
	високоактивні (n=12)	низькоактивні (n=12)	високоактивні (n=12)	низькоактивні (n=12)
ДК, ум. од./г	1,25±0,02	1,13±0,02**	1,53±0,03*	1,31±0,03**
ТБК-активні продукти, мкмоль/кг	1,43±0,04	1,28±0,04**	1,76±0,04*	1,47±0,03**

Примітка. Тут і в наступних таблицях:

1) \* – різниця достовірна порівняно з контролем;

2) \*\* – різниця достовірна порівняно з тваринами із високою руховою активністю.

**Таблиця 2.** Зміни вмісту окисно-модифікованих протеїнів у крові щурів при стресі (M±m)

Показник	Група			
	контроль		стрес	
	високоактивні (n=12)	низькоактивні (n=12)	високоактивні (n=12)	низькоактивні (n=12)
$ОМ\text{P}_{370}$ ммоль/г протеїну	0,42±0,02	0,35±0,02**	0,64±0,02*	0,47±0,03**
$ОМ\text{P}_{430}$ ммоль/г протеїну	0,51±0,02	0,41±0,02**	0,71±0,04*	0,59±0,03**

**Таблиця 3.** Зміни активності антиоксидантів у крові щурів при стресі (M±m)

Показник	Група			
	контроль		стрес	
	високоактивні (n=12)	низькоактивні (n=12)	високоактивні (n=12)	низькоактивні (n=12)
Супероксиддисмутазна активність, ум. од./мг	0,43±0,02	0,32±0,02**	0,51±0,02*	0,61±0,02**
Каталазна активність, мкат/кг	0,38±0,01	0,24±0,02**	0,47±0,01*	0,52±0,01**

у перших на 16,8 %. Вміст ТБК-ап збільшився при стресі у самців із високою руховою активністю на 23,1 %, з низькою – на 14,8 %. Причому знову ж таки була статистично достовірна різниця у вищих значеннях ТБК-ап серед щурів із високою руховою активністю порівняно з низькою. Вона переважала у перших на 19,7 %. Отримані дані вказують на більше підвищення продуктів пероксидного окиснення ліпідів у тварин із високою руховою активністю, причому різниця між досліджуваними показниками посилювалася.

Значення ОМП<sub>370</sub> при стресі підвищилися у самців із високою руховою активністю на 52,4 %, з низькою – на 34,3 %. Причому залишалася статистично достовірна різниця у вищих значеннях ОМП<sub>370</sub> у тварин із високою руховою активністю порівняно з низькою. Вона переважала у перших на 36,2 %. Показники ОМП<sub>430</sub> у самців із високою руховою активністю зросли на 39,2 %, з низькою – на 41,5 %. Причому залишалася статистично достовірна різниця у вищих значеннях ОМП<sub>430</sub> у тварин із високою руховою активністю порівняно з низькою. Вона переважала у перших на 20,3 %. Отримані дані вказували на розвиток карбонільного стресу із ушкодженням протеїнів клітинних мембран при довготривалій гіпокнезії більшою мірою у тварин із високою руховою активністю.

Правда, спостерігалася компенсаторне підвищення активності антиоксидантів. Так, супероксиддисмутазна активність у самців із високою руховою активністю підвищилася на 18,6 %, з низькою – на 90,6 %. Причому залишалася статистично достовірна різниця у вищих значеннях СОД активності, правда у тварин із низькою руховою активністю по-

рівняно з високою. Вона переважала у перших на 19,6 %. Каталазна активність зросла у самців із високою руховою активністю на 23,7 %, з низькою – на 116,7 %. Кількість клітин, які зазнали апоптозу, була вищою у серці щурів із високою руховою активністю. Причому знову ж таки залишалася статистично достовірна різниця у вищих значеннях каталазної активності, правда у тварин із низькою руховою активністю порівняно з високою. Вона переважала у перших на 10,6 %. Отримані дані вказують на те, що більша потужність антиоксидантної системи забезпечує знешкодження вільних радикалів. При стресі поряд із наростанням процесів руйнування клітинних мембран, відмічено зростання активності антиоксидантів, що більше виражено у тварин із низькою руховою активністю і забезпечує менше ушкодження у них кардіоміоцитів, оскільки число клітин з апоптозом була значно вищою у тварин із високою руховою активністю, які зазнали стресу порівняно зі щурами з низькою руховою активністю.

Отримані дані змін біохімічних показників узгоджуються з морфологічними даними, які вказують на більше ушкодження кардіоміоцитів самців із високою руховою активністю.

#### ВИСНОВКИ

Розвиток стресу залежить від рухової активності тварини. Хронічний гіподинамічний стрес спричинює зростання пероксидного окиснення протеїнів і ліпідів у щурів-самців, що більше виражено у тварин із високою руховою активністю. Компенсаторно у крові щурів збільшується активність антиоксидантів, більшою мірою таке зростання виявилось серед низькоактивних особин.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Corcoran A. Hypoxia-inducible factor signaling mechanisms in the central nervous system / A. Corcoran, J. J. O'Connor // *Acta Physiol. (Oxf)*. – 2013. – Vol. 208, No. 4. – P. 298–310.

2. Механизмы формирования острой экзогенной гипоксии и возможности ее фармакологической коррекции антигипоксантами / Д. В. Сосин, О. Е. Шалаева, А. В. Евсеев, П. Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2015. – Т. 13, № 1. – С. 1–24.

3. A possible role for systemic hypoxia in the reactive component of pulmonary hypertension in heart failure / B. J. Taylor, C. R. Mojica, T. P. Olson [et al.] // *Journal of Cardiac Failure*. – 2013. – Vol. 19, Issue 1. – P. 50–59.

4. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress / J. Mathers, J. A. Fraser, M. McMahon [et al.] // *Biochem. Soc. Symp.* – 2004. – No 71. – P. 157–176.

5. Colombo M. L. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives / M. L. Colombo // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15, No. 4. – P. 2103–2113.

6. Устойчивость к гипоксии у людей пожилого возраста с гипертонической болезнью: влияние Кардио-аргинина / О. В. Коркушко, Е. Д. Осьмак, Д. Д. Осьмак, Г. В. Дужак // *Кровообіг та гемостаз*. – 2015. – № 1–2. – С. 31–37.

7. Выбор показателей поведенческих тестов для оценки типологических особенностей поведения крыс / А. В. Мельников, М. А. Куликов, М. Р. Новикова,

Е. В. Шарова // Журнал высшей нервной деятельности им И. П. Павлова. – 2004. – Т. 54, № 5. – С. 712–717.

8. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения : пер. с англ. – М. : Высшая школа, 1991. – 399 с.

9. Влияние карбахолина и глицилпролина (GLY-PRO) на секреторную функцию желудка в зависимости от реактивности ЦНС у крыс / Т. А. Томова, Т. А. Самошина, Е. Ю. Просекина, М. В. Светлик // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, № 3. – С. 13–16.

10. Гелиева Е. А., Дерюга С. А., Фролова Г. А. Динамика поведения лабораторных крыс в нормальных (контрольных) условиях в тесте «открытое поле» / Е. А. Гелиева, С. А. Дерюга, Г. А. Фролова // Вісник студентського наукового товариства ДонНУ імені Василя Стуса. – 2013. – Вип. 5, Т. 1. – С. 269–274.

11. Патент № 99821 МПК: G 09 В 23/28; Спосіб моделювання хронічного іммобілізаційного стресу, підсиленого дією гострого стресу. Денефіль О. В, Міц І. Р. № u201414143; заявл. 29.12.2014; опубл. 25.06.2015. бюл. № 12.

12. Хышиктуев Б. С. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение / Б. С. Хышиктуев, Н. А. Хышиктуева, В. Н. Иванов // Клинич. лаб. диагностика. – 1996. – № 3. – С. 13–15.

13. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми крові / І. Ф. Мещишен // Буковинський медичний вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156–158.

14. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

15. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

16. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.

#### REFERENCES

1. Corcoran A, O'Connor JJ. Hypoxia-inducible factor signaling mechanisms in the central nervous system. *Acta Physiol. (Oxf)*. 2013;208(4): 298-310.

2. Sosin DV, Shalaeva OE, Evseev AV, Shabanov PD. [Mechanisms of the formation of acute exogenous hypoxia and the possibility of its pharmacological correction with antihypoxants]. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2015;13(1): 1-24 [in Russian].

3. Taylor BJ, Mojica CR, Olson TP, Woods PR, Frantz RP, Johnson BD. A Possible Role for Systemic Hypoxia in the Reactive Component of Pulmonary Hypertension in Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2013;19(1): 50-9.

4. Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp*. 2004;71: 157-76.

5. Colombo ML. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol –perspectives. *Molecules*. 2010;15(4): 2103-13.

6. Korkushko OV, Os'mak ED, Oc'mak DD, Duzhak GV. [Resistance to hypoxia in elderly people with essential hypertension: the effect of Cardioarginin]. *Krovoobih i hemostas*. 2015;1-2: 31-7. Russian.

7. Melnikov AV, Kulikov MA, Novikova MR, Sharova EV. [The choice of indicators of behavioral tests to as-

sess the typological characteristics of the behavior of rats]. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti imeni I.P. Pavlova*. 2004;54(5): 712-7. Russian.

8. Buresh J. [Methods and basic experiments in the study of the brain and behavior]. Moscow: Vysshaya shkola; 1991. [in Russian].

9. Tomova TA, Kamoshchina TA, Prosekina EYu, Svetlik MV. [Influence of carbacholine and glycyllproline (GLY-PRO) on gastric secretory function depending on the reactivity of the central nervous system in rats]. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015;78(3): 13-6. Russian.

10. Gelieva EA, Deryuga SA, Frolova GA. [Dynamics of behavior of laboratory rats under normal (control) conditions in the "open field" test]. *Visnyk studentskoho naukovoho tovarustva DonNU imeni Vasylya Stusa*. 2013;5(1): 269-74. Russian.

11. Patent No. 99821 IPC: G 09 B 23/28; [Method of modeling chronic stress, increase by acute stress action]. Denefil O.V, Mitz I.R. No. u201414143; zyav. 29.12.2014; opubl. 25.06.2015. bul. No. 12. Ukrainian.

12. Khyshiktyev BS, Khyshiktyeva NA, Ivanov VN. [Methods for determination of lipid peroxidation products in exhaled air condensate and their clinical significance]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1996;3: 13-5. Russian.

13. Meshchishen IF. [Method for determination of oxidative modification of blood plasma proteins]. Bukovynskyi med visn. 1998;2(1): 156-8. Ukrainian.

14. Cheviri S, Chaba I, Sekei I. [The role of superoxide dismutase in the oxidative processes of the cell and the method for its determination in biological materials]. Laboratornoye delo. 1985;11: 678-81. Russian.

15. Korolyuk MA, Ivaniva LI, Majorova IG, Tokarev VE. [Metod for determination of katalaze activity]. Lab delo. 1988;1: 16-9. Russian.

16. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. [Statistical methods in biomedical research using Excel]. Kyiv: Morion. Russian.