

**ВЛИЯНИЕ АДАПТАЦИИ К КОРОТКИМ СТРЕССОРНЫМ
ВОЗДЕЙСТВИЯМ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ N-
АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА НА ПОСТСТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И
РЕДОКС-СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА**

МАЙОРОВА С.С.

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Резюме. Целью работы было изучить влияние адаптации к коротким стрессорным воздействиям и предварительного введения N-ацетил-L-цистеина на постстрессорные изменения активности перекисного окисления липидов и редокс-системы глутатиона. О редокс-состоянии клеток судили по соотношению восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона. Также определяли концентрацию нитратов и нитритов, активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общую антиоксидантную активность (АОА) плазмы крови. В группе стрессированных животных наблюдалась активация ПОЛ на 13% и угнетение АОА плазмы крови на 19%, а также накопление окисленного глутатиона и снижение соотношения GSH/GSSG на 46%.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям полностью предупредила постстрессорную активацию перекисного окисления липидов, снижение антиоксидантной активности, накопление продуктов деградацииmonoоксида азота и восстановила соотношение GSH и GSSH. Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина обладало такими же свойствами, как и адаптация к коротким стрессорным воздействиям, то есть предупреждало постстрессорные изменения в редокс-состоянии клеток, снижение антиоксидантной активности и активацию перекисного окисления липидов, а также избыточное накопление monoоксида азота.

Ключевые слова: адаптация, N-ацетил-L-цистеин, редокс-регуляция, иммобилизационный стресс.

Abstract. The work was aimed at the investigation of adaptation influence to short stress and preliminary N-acethyl-L-cystein injection on the poststressory changes of lipid peroxidation activity and redox –system of glutathione. The cellular redox state has been estimated according to reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione ratio. The concentration of nitrates and nitrites, activity of lipid peroxidation (LPO) and general antioxidant activity (AOA) of bloods plasma have been defined in this work. The LPO activation (13%), AOA inhibition of blood plasma (19%) and oxidized glutathione accumulation and the reduction of GSH/GSSG ratio (46%) has been observed in the group of stressed animals.

Adaptation to the short stressor influences has completely prevented the poststressory activation of lipid peroxidation, the reduction of antioxidant activity, accumulation of nitric monoxide degradation products and restored the GSH/GSSG ratio. Preliminary N-acethyl-L-cystein injection possessed by the similar properties as adaptation to the short stressory influences, i.e. prevented the poststressory changes in cellular redox-state, reduction of antioxidant activity, activation of lipid peroxidation and superfluous nitric monoxide accumulation.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра нормальной физиологии, тел. 37-07-54 - Майорова С.С.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям в значительной степени предупреждает активацию перекисного окисления липидов, а также способствует депонированиюmonoоксида азота. Эти факты позволяют предположить, что в развитии устойчивости к стрессу может принимать участие и система редокс-регуляции функции клетки.

Редокс-состояние клетки определяется соотношением восстановленных и окисленных форм соединений (например, восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона, НАДН и НАД⁺, НАДФН и НАДФ⁺) [9, 10]. Соотношение между окисленным и восстановленным глутатионом

(GSSG/GSH) не только определяет редокс-состояние клеток, но и является своеобразным «молекулярным переключателем» их фенотипических свойств. Это связано с тем, что при изменении соотношения GSSG/ GSH меняется характер активности целого ряда клеточных ферментов, факторов транскрипции, шаперонов, рецепторов, ионных каналов и др. [9,10]. Можно предположить, что редокс-система глутатиона играет важную роль в формировании устойчивости гладкомышечных клеток коронарных сосудов к стрессу.

В связи с этим в качестве одного из компонентов патогенетической терапии и профилактики нарушений функций органов и тканей, обусловленных «окислительным стрессом» в последнее время все более пристальное внимание стало уделяться низкомолекулярному тиолсодержащему антиоксиданту N-ацетил-L-цистеину.

Ранее было показано, что предварительное введение N-ацетил-L-цистеина предупреждает наблюдающееся при кратковременном и долговременном иммобилизационном стрессе уменьшение содержания восстановленного глутатиона, окисление сульфгидрильных групп белковых молекул, повышение активности ферментов системы глутатиона (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы) в миокарде и тиол/дисульфидного соотношения в эритроцитах, а также снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда характерное для долговременного стресса [5].

Цель исследования – изучить влияние адаптации к коротким стрессорным воздействиям и предварительного введения N-ацетил-L-цистеина на постстрессорные изменения активности перекисного окисления липидов и редокс-систему глутатиона.

Методы

Опыты были проведены на 148 крысах-самках Вистар.Стресс вызывали 6–часовой иммобилизацией крыс на спине без фиксации головы. Адаптацию проводили в течение 8 суток по следующей схеме: крысу

помещали в пластиковый пенал и погружали в воду при температуре 22°C до уровня шеи: 1-й день – 5 мин., 2-й день – 10 мин., 3-й день – 15 мин. После 2-х дневного перерыва адаптацию повторяли. Через сутки животных брали в эксперимент. В отдельных группах крыс N-ацетил-L-цистеин вводили в дозе 40 мг/кг веса тела за 1 час до иммобилизации [4].

Определение стабильных продуктов деградации монооксида азота проводилось в плазме крови. Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди, с последующим фотометрическим определением нитрит-ионов с помощью реакции Грисса [2].

Оценку активности процесса перекисного окисления липидов и общую антиоксидантную активность в плазме крови производили на биохемилюминометре БХЛ-06 (Россия). Метод индуцирования хемилюминесценцией и перекисью водорода с сульфатом железа основан на том, что в представленной системе происходит каталитическое разложение перекиси водорода ионами металла с переходной валентностью – двухвалентным железом в соответствии с реакцией Фентона.

Образующиеся при этом свободные радикалы вступают в процесс инициации свободнорадикального окисления в исследуемом биологическом субстрате. Для оценки активности ПОЛ и АОА плазмы регистрировали максимальную интенсивность свечения (I_{max} , мВ), пропорциональную уровню перекисного окисления липидов, светосумму (S , мВ \times сек) свечения, обратно пропорциональную антиоксидантной активности и $tg2\alpha$ – тангенс угла убывания сигнала после достижения максимальной интенсивности, характеризующий скорость снижения свободнорадикальных процессов [6].

Восстановленный и окисленный глутатион в эритроцитах определяли методом высоко эффективной жидкостной хроматографии и с учетом гематокрита, выражали в мкг/мл крови[11]. На первом этапе пробы крови забирали в пробирку с 1,10-фенантралином. После центрифугирования, удалив надосадочную жидкость, добавляли восстановленный (0; 62,5; 125,0;

250,0 $\mu\text{g/ml}$) и окисленный (0; 25,0; 50,0; 100,0 $\mu\text{g/ml}$) глутатион. Затем белок осаждали и пробы обрабатывали 2,4-динитрофторбензолом для того, чтобы образовались N-(2,4-динитрофенил) производные S-карбоксиметил восстановленного и окисленного глутатиона. Через 20 часов инкубации пробы вводили в хроматографическую колонку Zorbax NH₂ 250^x4,6 мм, размер частиц 5 мкм высоко эффективного жидкостного хроматографа Agilent 1100 (система подачи и дегазации четырех растворителей G1311A, фотодиодноматричный детектор G1315B, терmostат колонок G1316A, устройство для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A).

Элюирование осуществляли метанолом. Концентрации были рассчитаны путем экстраполирования калибровочного графика зависимости площади пика глутатиона от его концентрации в пробе (линейная регрессия, рассчитанная методом наименьших квадратов).

Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводилась с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D. Обработку полученных результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 6.0. Для сравнения двух количественных признаков применялся t-критерий Стьюдента.

Результаты эксперимента выражали как среднее арифметическое плюс - минус ошибка средней величины. Различия принимали достоверными при значении вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты

После иммобилизационного стресса отмечалось увеличение активности перекисного окисления липидов (I_{max}) на 13%, а также снижение антиоксидантной активности на 19% (S , обратно пропорциональна суммарной сумме хемилюминесценции) и уменьшение скорости элиминации свободных радикалов на 10% (пропорционален $t g 2\alpha$, табл.1).

Таблица 1

Влияние адаптации на показатели активности перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности в плазме крови крыс после иммобилизационного стресса

Группы	I max, мВ	S, мВ×сек	$\text{tg } 2\alpha$
Контроль (n=9)	1,137±0,042	10,4±0,3	-0,241±0,006
Стресс 6 часов (n=7)	1,281±0,040*	12,4±0,3*	-0,268±0,007*
Адаптация (n=10)	1,163±0,042	11,0±0,2	-0,258±0,030
Адаптация+стресс (n=9)	1,123±0,091	10,7±0,7	-0,259±0,049

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям не оказала влияния на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность у контрольных крыс, и полностью предупредила изменения данных показателей при стрессе. Под влиянием иммобилизационного стресса концентрация NO_2/NO_3 увеличилась на 53% (табл.2). После адаптации также наблюдалось, но менее выраженное, чем при стрессе увеличение синтезаmonoоксида азота. В тоже время адаптация к коротким стрессорным воздействиям полностью предупреждала его постстрессорное накопление (табл.2).

Таблица 2

Влияние адаптации на концентрацию нитратов/нитритов в плазме крови у животных после иммобилизационного стресса

Группы	$\text{NO}_2/\text{NO}_3, \text{мкМ/л}$
Контроль (n=10)	27,5±1,2
Стресс 6 часов (n=11)	42,0±1,2*
Адаптация (n=7)	34,2±2,7*
Адаптация+стресс (n=7)	28,9±1,3

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе.

Следовательно, под влиянием иммобилизационного стресса происходило увеличение образования monoоксида азота, активация перекисного окисления липидов на фоне снижения общей антиоксидантной активности, которые эффективно предупреждались адаптацией к коротким стрессорным воздействиям. После 6-часового иммобилизационного стресса достоверных различий абсолютных значений GSH и GSSG не

обнаруживалось, однако их соотношение уменьшалось на 46% в сторону увеличения окисленного глутатиона (табл.3).

Таблица 3

**Концентрация восстановленного, окисленного глутатиона и их соотношение
в крови крыс, перенесших стресс до и после адаптации**

Группа животных	GSH мкг/мл крови	GSSG мкг/мл крови	GSH/GSSG
Контроль (n=11)	521±53	166±25	4,29±0,78
Стресс (n=10)	424±76	176±21	2,29±0,34*
Адаптация (n=8)	438±40	126±14	3,53±0,31
Адаптация+стресс (n=7)	509±79	210±58	3,67±1,5

Примечание: * – p<0,029 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе.

В группе животных перенесших стресс после адаптации к коротким стрессорным воздействиям тиолдисульфидное соотношение оставалось таким же, как в контроле.

В связи с тем, что адаптация к коротким стрессорным воздействиям полностью устраняет последствия нитрозилирующего и окислительного стресса, восстанавливая редокс-систему глутатиона в клетках, на следующем этапе за 1 час до иммобилизационного стресса животным вводили тиолсодержащий низкомолекулярный антиоксидант N-ацетил-L-цистеин и оценивали его эффект на постстрессорные нарушения редокс-состояния клеток, уровень перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность, а также на концентрацию продуктов деградацииmonoоксида азота (табл. 4, 5).

Таблица 4

Влияние N-ацетил-L-цистеина на показатели активности перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности в плазме крови крыс после иммобилизационного стресса

Группы	I max, мВ	S, мВ×сек	tg 2α
Контроль (n=9)	1,137±0,042	10,4±0,3	-0,241±0,006
Стресс 6 часов (n=7)	1,281±0,040*	12,4±0,3*	- 0,268±0,007*
N-ацетил-L-цистеин(n=7)	1,179±0,040	11,0±0,2	- 0,279±0,030*
N-ацетил-L-цистеин +стресс (n=7)	1,072±0,050	10,3±0,5	-0,244±0,030

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе.

Таблица 5

Влияние N-ацетил-L-цистеина на концентрацию нитратов/нитритов в плазме крови у животных после иммобилизационного стресса

Группы	NO ₂ /NO ₃ , мкМ/л
Контроль (n=10)	27,5±1,2
Стресс 6 часов (n=11)	42,0±1,2*
N-ацетил-L-цистеин(n=7)	26,6±2,6
N-ацетил-L-цистеин +стресс (n=7)	28,9±2,5

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе.

Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина в контрольной группе животных не оказalo влияние на уровень перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность плазмы крови, а также полностью предупредило изменение данных показателей при стрессе. Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина животным, перенесшим иммобилизационный стресс, также предупреждало характерное для стресса накопление продуктов разрушения монооксида азота.

В группе животных перенесших стресс после предварительного внутрибрюшинного введения N-ацетил-L-цистеина, тиолдисульфидное соотношение не изменилось (табл. 6).

Таблица 6

Концентрация восстановленного, окисленного глутатиона и их соотношение в крови крыс, перенесших стресс до и после введения N-ацетил-L-цистеина

Группа животных	GSH мкг/мл крови	GSSG мкг/мл крови	GSH/ GSSG
Контроль (n=11)	521±53	166±25	4,29±0,78
Стресс (n=10)	424±76	176±21	2,29±0,34*
N-ацетил-L-цистеин (n=7)	483±92	154±24	3,37±0,62
N-ацетил-L-цистеин +стресс (n=7)	508±63	190±42	4,04±1,67

Примечание: *– p<0,029 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе.

Таким образом, предварительное введение тиолсодержащего низкомолекулярного антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина, так же как и адаптация к коротким стрессорным воздействиям полностью устраняет характерную для стресса активацию перекисного окисления липидов на фоне снижения антиоксидантной активности, накопление продуктов деградации монооксида азота, а также восстанавливает тиолдисульфидное соотношение клеток.

Обсуждение

При иммобилизационном стрессе происходит активация перекисного окисления липидов, снижается общая антиоксидантная активность плазмы крови и соотношение GSH и GSSG изменяется в сторону накопления GSSG. Как известно, при изменении соотношения GSSG/GSH меняется характер активности целого ряда клеточных ферментов, в том числе и факторов транскрипции (AP-1, NF-кB, HIF-1) [9, 10].

В свою очередь, это может приводить к экспрессии генов, ответственных за развитие фенотипической адаптации. Активация перекисного окисления липидов при стрессе превышает физиологические возможности антиоксидантной системы. Это приводит к нарушению функциональной активности каналов, насосов, ферментов. Кроме того, при этом одновременно с активацией свободнорадикального окисления наблюдается гиперпродукцияmonoоксида азота [8].

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям так же, как и иммобилизация, сопровождалась, усилением продукции NO [7]. Однако, не смотря на это, ограничивала активацию перекисного окисления липидов, восстанавливалась постстрессорное снижение антиоксидантной активности и тиолдисульфидное соотношение. Это может быть связано с изменением биологической активности NO в условиях адаптации, вызванным образованием динитрозильных комплексов железа и S-нитрозотиолов, являющихся физиологически активным депо NO [1] и предотвращающих его токсический эффект.

Роль NO в адаптационной защите связана не столько с его прямым влиянием на гладкомышечную клетку сосудов сердца, сколько с его способностью активировать защитные системы организма (синтез протекторных белков HSP70 [3], экспрессию антиоксидантных ферментов [3], синтез простагландинов [3], которые являются факторами локальной антистрессорной защиты).

Одним из возможных условий подобного действияmonoоксида азота является сохранение содержания GSH и соотношения GSH/GSSG.

Предварительное введение низкомолекулярного тиолсодержащего антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина предупредило постстрессорное увеличение monoоксида азота, ограничило активацию перекисного окисления липидов и усилило антиоксидантную активность плазмы крови, а также предупредило снижение соотношения восстановленного и окисленного глутатиона.

Данный эффект N-ацетил-L-цистеина может быть обусловлен как прямым его антиоксидантным действием (нейтрализуя активные формы кислорода, причем наиболее эффективно – гидроксильный радикал и гипохлорную кислоту), так и непрямым действием, обусловленным увеличением содержания восстановленного глутатиона.

Таким образом, можно предполагать, что подобно адаптации N-ацетил-L-цистеин вызывает активацию стресс-лимитирующих систем (антиоксидантной, глутатиона) и, таким образом, не только проявляет свойства низкомолекулярного тиолсодержащего антиоксиданта, но и является соединением, оказывающим действие на редокс-систему глутатиона клеток.

Заключение

1. Адаптация к коротким стрессорным воздействиям полностью предупреждает постстрессорную активацию перекисного окисления липидов, снижение антиоксидантной активности, накопление продуктов деградации monoоксида азота и восстанавливает соотношение GSH и GSSH.
2. Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина обладает такими же свойствами, как и адаптация к коротким стрессорным воздействиям, то есть предупреждает постстрессорные изменения в редокс-состоянии клеток, антиоксидантной активности и перекисного окисления липидов, а также избыточное накопления monoоксида азота.

Литература

1. Ванин, А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А. Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – С. 924-938.
2. Веремей, И.С. Восстановление NO₃ в NO₂ цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / И. С. Веремей, А. П. Солодков // Сборник научных трудов. – Витебск, 1999. – С. 274-277.
3. Вовлечены ли оксид азота в адаптационную защиту органов от стрессорных повреждений? / Е. Б. Маленюк [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1998. – Т. 126. – С. 274-277.
4. Возможность коррекции нарушений тонуса коронарных сосудов при острой кровопотере N-ацетилцистеином / Л. Е. Беляева [и др.] // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: труды II республик. науч.-практич. конф. – Витебск, 2002. – С. 71-76.
5. Дорошенко, А. С. Влияние N-ацетил-L-цистеина на роль супероксид-анионов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при стрессе / А. С. Дорошенко, А. П. Солодков, В. И. Шебеко // Белорусский мед. журн. – 2005. – № 4. – С. 48-50.
6. Журавлев, А. И. Слабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике / А. И. Журавлев, А. И. Журавлева. – Москва: «Медицина». – 1975. – 127 с.
7. Меерсон, Ф. З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшениникова. – М.: Медицина, 1988. – 252 с.
8. Солодков, А. П. Изменение активности эндотелиоцитов коронарных сосудов под влиянием стресса / А. П. Солодков, А. П. Божко // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова.– 1994. – Т. 80, № 4. – С. 65-72.
9. Шебеко, В. И. Эндотелий и система комплемента / В. И. Шебеко. – Витебск: ВГМУ, 1999. – 149 с.

10. Schafer, F. Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide / glutathione couple / F. Q. Schafer, G. R. Buettner // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30, N 11. – P. 1191-1212.
11. Yoshida, T. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection / T. Yoshida // Journal of Chromatography B. – 1996. – № 678. – P. 157-164.