

Առնետների հիպոկամպում պրո- եւ հակաօքսիդանտային մեթաբոլիզմի արդյունքների հարաբերակցությունը սակավաշարժության տարբեր ժամկետներում

Գ.Ա. Նավասարդյան¹, Կ.Ս. Սաֆարյան¹, Մ.Ա. Սիմոնյան²

¹ Մ. Հերացու անվ. ԵՊԲՀ, ախտաֆիզիոլոգիայի ամբիոն
² ՀՀ ԳԱԱ Գ. Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտ

375025 Երևան, Կորյունի, 2

Բանալի բառեր. սակավաշարժություն, հիպոկամպ, լիպիդային գերօքսիդացում, սթրես

Սակավաշարժությունը (ՄՇ), ժամանակակից մարդու կյանքում մեծ տարածում ունեցող սթրեսային վիճակ է։ Այն ռիսկի գործոն է տարբեր օրգան համակարգերի վնասումների ախտաճանաչման մեջ [2,10]։ ՄՇ-ը ենթադրում է ոչ միայն շարժումների, այլև տարածափոխարկման, վարքային գործունեության սահմանափակում, որի պատճառով էլ այն դիտարկվում է որպես բազմաբաղադրյալ, հոգեհուզական մասնաբաժին ունեցող սթրես։

Հիպոկամպը, լինելով լիմբիկ համակարգի կենտրոնական կառույցներից մեկը, ուղղակի մասնակցություն ունի ուսուցման, հիշողության գործընթացների, հուզական և վարքային ռեակցիաների ձևավորման մեջ։ Ավաճից բխում է այն հետևությունը, որ ՄՇ ախտաճանաչման դերի, նրա հանդեպ աղիք-կենսաբանական հարմարվողականության մեխանիզմների բնութագրի լիարժեք չի լինի առանց դրանում հիպոկամպի դերի և բաժնեմասի ուսումնասիրության։ Մինչդեռ գրականության տվյալները վկայում են, որ այս ուղղությամբ կատարված ուսումնասիրությունները եզակի են, ոչ ամբողջական [3]։

Ներկա աշխատանքը մի մասն է փորձարարական ՄՇ տարբեր ժամկետներում սպիտակ առնետների հիպոկամպում ընթացող կենսաքիմիական-նյութափոխանակային, մորֆոֆունկցիոնալ [3], էլեկտրաֆիզիոլոգիական [20], վարքային [21, 25] տեղաշարժերի մեր համալիր ուսումնասիրության և նպատակ ունի վեր հանել հյուսվածքների և բջիջների վնասման համապարփակ, ոչ յուրատիպ մեխանիզմներից մեկի օքսիդատիվ սթրեսի [23], դոստոյան և արտահայտվածության վիճակը հիպոկամպում։ Ավելի կոնկրետ՝ ներկա հետազոտության խնդիրն է պարզել ՄՇ տարբեր ժամկետներում պրո- և հակաօքսիդանտային համակարգերի շարժընթացի առանձնահատկությունները, դրանք համեմատելով ամբողջական ուղեղում հետազոտվող ցուցանիշների տեղաշարժերի պատկերի հետ։

Նյութը և մեթոդները

Փորձերը կատարվել են 180-200գ քաշով սպիտակ, անցել սեռահասուն (5-6 ամսական) արու առնետների վրա։ Կրկնվող ՄՇ-ը մոդելավորվել է առնետներին տեղադրելով նեղ անհատական վանդակների մեջ 22 ժամ տևողությամբ։ Օրվա ընթացքում երկու ժամով կենդանիները դուրս են բերվել նեղ վանդակներից նրանց տալով ազատ տեղաշարժվելու հնարավորություն սովորականների մեջ։ Փորձարարական կենդանիների մոտ առաջ է բերվել 2, 7, 15, 45 և 70-օրյա սակավաշարժություն (յուրաքանչյուր խմբում տասական առնետ)։ Ստուգիչ խումբը այդ ընթացքում ունեցել է ազատ տեղաշարժվելու հնարավորություն։ Փորձարարական շրջանից հետո կենդանիները զլխատվել են թույլ եթերային անզգայացման ներքո։ Առանձնացվել են հիպոկամպը և ուղեղի մնացյալ մասը։

Ուղեղային հյուսվածքի և ուղեղիկի մետաղապրոտեինները (ՄՊ) ստացվել են կոտորակային մետեցման և իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով [6,9], փոխելով ցիտոքրոմ c-ի և կատալազի ստացման համար անջատման հեթականությունը։ Ցիտոքրոմ c-ի (օքսիդացած ձևը) քանակը որոշվել է նրա մաքսիմալ օպտիկական կլամման խտության հաշվարկի միջոցով (ալիքի երկարությունը 520 նմ)։ Սուպերօքսիդիսմուտազի (ՍՕԴ) գոմարային ակտիվությունը (CuZn-ՍՕԴ և Mn-ՍՕԴ) որոշվել է միտոքոնոմիալ կապիտի (ՆՏԿ) մեթոդով, հաշվարկվել է 560 նմ ալիքի երկարության պայմաններում սուպերօքսիդ ռադիկալներով ՆՏԿ-ի վերականգնման արդյունքում առաջացող ֆորմազանի մաքսիմալ օպտիկական կլամման խտության նվազման %-ը [9]։ ՍՕԴ-ի ակտիվության միավոր ընդունվել է ֆրակցիայի այն քանակը, որն ունակ է 50%-ով ընկճել ֆորմազանի առաջացումը։ Կատալազային ակտիվությունը որոշվել է պերմանգանատամետրիայով՝ հաշվարկելով 20°C պայմաններում 1 րոպեի ընթացքում

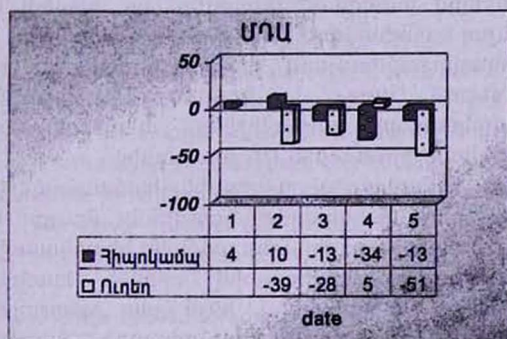
Ֆրակցիայի որոշակի քանակի ազդեցությամբ քայքայված ջրածնի պերօքսիդի քանակը: ՍՕՂ-ի, կատալազի տեսակարար ակտիվությունը որոշվել է 1 գ հյուսվածքի հաշվարկով: Լիպիդային գերօքսիդացման (ԼԳՕ) արգասիք մալոնային դիպերիդի (ՄԴԱ) քանակը որոշվել է օպտիկական սպեկտրալ մեթոդով: ՄՊՄ-ի տեսակարար քանակը որոշվել է 1 գ հյուսվածքի հաշվարկով:

Կլանման օպտիկական սպեկտրերը և ՍՕՂ-ի ակտիվության որոշման կինետիկ կորերը գրանցվել են 1 սմ օպտիկական վազի երկարությամբ "Specord UV-VIS" (Գերմանիա) սպեկտրաֆոտոմետրի միջոցով: ՄՊՄ-ի ստացման և մաքրման ընթացքում օգտագործվել են տարբեր չափերի ապակյա սյունակներ (3x15, 2x10, 1,5x70 սմ), հյուսվածքների մանրիչ՝ 2000 պտ/ադրոպե դանակների պտտման արագությամբ, ինչպես նաև ցենտրիֆուգեր K-24 և K-70 (Գերմանիա):

Տվյալների վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է Ստյուդենտ-Ֆիշերի եղանակով:

Արդյունքները և դրանց քննարկումը

ՄՊՄ-ի քանակական տեղաշարժերի ընթացքը

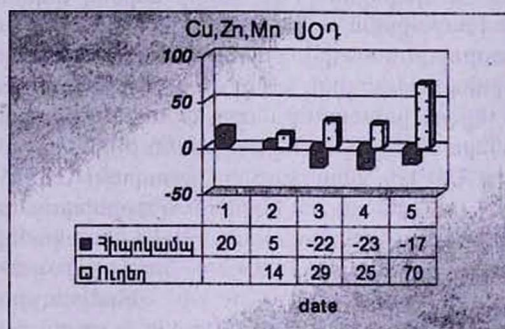


Նկ. 1 ՄՊՄ-ի քանակական տեղաշարժերը հիպոկամպում և ուղեղում 7, 15, 45 և 70-օրյա ՀՇ պայմաններում
* 2 օր - 1; 7 օր - 2; 15 օր - 3; 45 օր - 4; 70 օր - 5

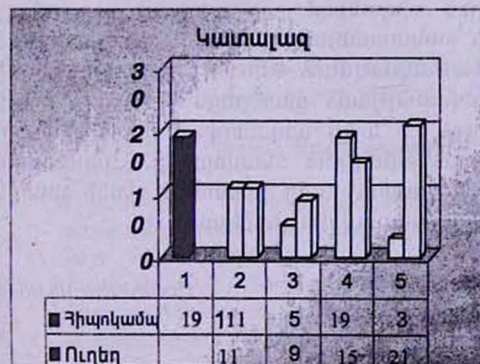
ցույց է տալիս, որ ՍՕ-ի սկզբնական սուր շրջանում նրա քանակությունը աճում է, առավելագույն արժեքին հասնելով 7-րդ օրը: Հետագա ժամկետներում այն նվազում է: Ամբողջական ուղեղում ՄՊՄ-ի քանակությունը ՍՕ-ի 7, 15-րդ օրերին իջած է, 45-րդ օրը բարձրացման միտում է ցուցաբերում, իսկ 70-րդ օրը խիստ նվազում է (նկ. 1):

Հակաօքսիդանտային համակարգը ներկայացնող ՄՊՄ-ի տեղաշարժերը հետևյալ պատկերը ունեն:

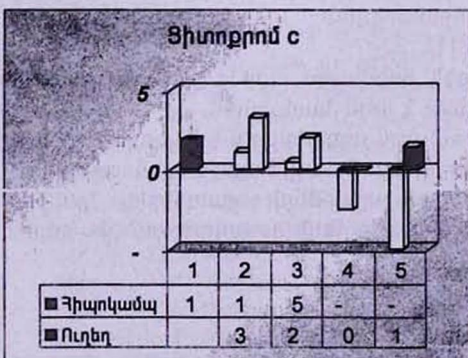
ԽՕՂ-ի ակտիվությունը ՍՕ-ի 2-րդ օրը բարձրանում է, 7-րդ օրը այն նվազում է, սակայն մնում է նորմայից բարձր քվերի վրա: ՍՕ մյուս ժամկետներում այն իջնում է: Ամբողջական ուղեղում դիտվում է նշյալ հակաօքսիդանտի ակտիվության բարձրացում, առավելագույն արժեքը արձանագրելով 70-րդ օրը (նկ. 2): Թե հիպոկամպում, թե ամբողջական ուղեղում կատալազի ակտիվությունը ՍՕ-ի տարբեր ժամկետներում նորմայից բարձր ցուցանիշներ ունեն: Ուշադրության է արժանի այն հանգամանքը, որ 70-օրյա ՍԳ-ի պայմաններում առնետների հիպոկամպի հյուսվածքում կատալազի ակտիվությունը նվազագույն չափի է, իսկ ամբողջական ուղեղում ամենաբարձր ակտիվություն է գրանցված (նկ. 3):



Նկ. 2 ՍՕՂ-ի ակտիվության տեղաշարժերը ուղեղում 2, 7, 15, 45 և 70-օրյա ՍՕ պայմաններում



Նկ. 3 Կատալազի ակտիվության փոփոխությունները 2, 7, 15, 45 և 70 օրյա հիպոկլինեզիայի պայմաններում



Նկ. 4 Ցիտոքրոմ c-ի քանակական փոփոխությունները 7, 15, 45 և 70 օրյա հիպոկլինեզիայի պայմաններում

Ֆիտոքրոմ c -ի կողմից հիպոկլամպում և ամբողջական ուղեղում փոփոխությունների տարբեր միտվածություն է դիտվում: Հիպոկլամպում այն ամենաբարձր մակարդակն է դրսևորում հիպոկլինեզիայի սուր շրջանի սկզբնական փուլում, ապա նվազում է 7,15-րդ օրերին, քրոնիկ ՄԿ պայմաններում ցիտոքրոմ c -ի քանակությունը նորմայից խիստ նվազում է: Ամբողջական ուղեղում ամենացածր մակարդակը դիտվում է ՄԿ-ի 45-րդ օրը (նկ. 4):

Ստացված տվյալների համադրումը, նրանց վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ հիպոկլամպում լիպիդային գերօքսիդացման ցուցանիշ համոլիսացող ՄԴԱ քանակության ավելացում դիտվում է հիպոկլինեզիայի 2-րդ, 7-րդ օրերին, ավելի ուշ ժամկետներում նրա քանակությունը նվազում է: Ուղեղային ՄԴԱ-ի նվազագույն քանակությունը դիտվում է ՄԿ 70-րդ օրը: ՄԿ տևողության մեծացման գույքը ստեղծում է ունենում պրո- և հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեինների ֆիզիոլոգիական համակշռման խանգարում: Արդյունքում ազատ ռադիկալների քանակությունը սկզբնական շրջանում ավելանում է, ավելի ուշ ժամկետներում նվազում: Հաշվի առնելով ազատ ռադիկալների դերը բջջային թաղանթների ֆունկցիոնալ ակտիվության կանոնավորման և այլ պաշտպանական գործընթացներում, կարելի մտածել, որ ՄԴԱ-ի նվազումը ևս հիպոկլամպի բջջային նորմալ գործունեության խաթարման մեխանիզմ կարող է լինել:

Հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեիններից աուպերօքսիդիսմուտազի ակտիվությունը մեծանում է առաջին երկու խմբերում, ապա նվազում հետագա ժամկետներում: Արդյունքների վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ ՄԿ-ի ակտիվության նվազումը ՄԿ 15-, 45-, 70-րդ օրերին չի ուղեկցվում գերօքսիդացման գործընթացների ակտիվացմամբ, ավելին հիպոկլամպի հյուսվածքում նրա ակտիվության նորմայից ցածր արժեքներ են դիտվում: ՄԿ-ի ակտիվության իջեցումը ՄԿ ուշ շրջաններում կարելի է բացատրել ուղեղի արյան շրջանառության խանգարումով [2], հիպոկլամպում արյան պերֆուզիայի նվազումը բերում է աուպերօքսիդիսմուտազի ակտիվության իջեցման, չի բացառվում նաև նրա սինթեզը կողմնորոշ գենի էքսպրեսիայի խանգարումները: Նմանատիպ պատկեր դիտարկված է քրոնիկ սթրեսի այլ մոդելներում [13, 22]:

Կատալազի նորմայից բարձր քանակությունների փաստը բերում է այն համոզման, որ ՄԿ-ի տարբեր ժամկետներում այն ապահովում է հիպոկլամպի հյուսվածքի հակաօքսիդանտային պաշտպանությունը:

Դատելով տեղաշարժերի պատկերից՝ կարելի է ենթադրել, որ հիպոկլամպի հյուսվածքում ցիտոքրոմ c

ավելի շուտ հակաօքսիդանտային դեր է կատարում [24, 27], քանի որ հիպոկլամպը՝ ի համեմատ ուղեղի այլ բաժինների, ավելի է ենթակա կատեխոլամինների և գլյուկոկորտիկոիդների ներգործությանը [14, 15, 16, 19]:

Վերոհիշյալը ունի որոշակի կենսաբանական նշանակություն, մի կողմից այն կարելի է բացատրել գերբեռնվածության (overload) մեխանիզմով [18], ըստ որի հատկապես քրոնիկ սթրեսի պայմաններում հարմարվողականությունը իրագործվում է այլընտրանքային «ալոստատիկ» բեռնվածության մեխանիզմով:

Մեր մյուս տեսակետն այն է, որ ՄԿ պայմաններում օրգանիզմի հոգեհուզական համարժեք կարգավիճակի համար պատասխանատու ուղեղային կառույցները, օքսիդատիվ վնասումներից որոշակի պաշտպանվածություն դրսևորելով, հնարավորինս երկար են պահպանում իրենց ֆունկցիոնալ ակտիվությունը [3]: Այն հնարավորություն է ընձեռնում օրգանիզմին նոր, անսովոր պայմաններում վերակառուցելու իր վարքագիծը և անցնելու սոցիալ-ֆիզիոլոգիական հարմարվածության նոր տիպի:

Բացի այդ, հիպոկլամպի օքսիդատիվ պաշտպանվածությունը կարելի է դիտարկել որպես էներգետիկ և կառուցվածքային պաշարների ուղղորդում դեպի ֆունկցիոնալ համակարգ [5], որն ապահովում է համապատասխան վարքի ձևավորումը:

Ամփոփելով ստացված արդյունքները՝ կարելի է գալ հետևյալ եզրահանգումների.

1. Սակավաշարժության պայմաններում հիպոկլամպում պրո- և հակաօքսիդանտային համակարգերի ցուցանիշների տեղաշարժերը կախվածություն ունեն ՄԿ ժամկետից:
2. Պրո- և հակաօքսիդանտային համակարգերի ակտիվության հարաբերակցությունը վկայում է այն մասին, որ ընդհանուր առմամբ հիպոկլամպի հյուսվածքում օքսիդատիվ սթրեսի հստակ պատկեր չի նկատվում, ինչն ըստ երևույթին հակաօքսիդանտային համակարգի բարձր ակտիվության արդյունք է: Քրոնիկ ՄԿ ընթացքում զարգացող ալոստատիկ բեռնվածությունը, որը դրսևորվում է վարքագծային, մետաբոլիկ, ֆունկցիոնալ համալիր փոփոխություններով՝ ուղղված օրգանիզմին՝ միջավայր նոր տիպի կապի հաստատմանը, բերում է շարժողության սահմանափակման հանդեպ օրգանիզմի «վարժվածության» ընտելացման, որը սակայն «փխրում է» և չի ապահովում լիարժեք հարմարվողականության ձևավորումը: Արդյունքում սակավաշարժությունը դառնում է ռիսկի գործոն տարբեր վնասումների համար:

Поступила 08.06.06

Соотношение про- и антиоксидантных металлопротеинов в гиппокампе крыс в различные сроки гипокинезии

Г.А. Навасардян, К.С. Сафарян, М.А. Симонян

Снижение двигательной активности (гипокинезия) является важным фактором риска для многих болезней и патологических процессов. Оно является ограничением как двигательной, так и пространственно-временных характеристик среды. Гиппокамп, ответственный за пространственно-временную организацию поведения, может повреждаться от стресса и в то же время регулирует стресс-реакцию.

Мы изучили про- и антиоксидантный статус гиппокампа в различные сроки гипокинезии. Гипокинезия (ГК) моделировалась помещением крыс в индивидуальные тесные клетки-пеналы на 22 часа в сутки. В

различные сроки ГК (2, 7, 15, 45, 70 дней) в ткани гиппокампа были определены активность ключевых антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также количество малонового диальдегида (МДА) и цитохрома с.

Мы обнаружили повышение уровня МДА и количество цитохрома с в ранние сроки ГК (2-й, 7-й дни), в то время как в поздние сроки ГК (45-й, 70-й дни) было выявлено стабильное повышение антиоксидативной системы. Мы заключили, что окислительные процессы переключаются в иные механизмы адаптации и повреждения.

The correlations of pro- and antioxidant metalloproteins in rat hippocampus at different terms of hypokinesia

G.A. Navasardyan, K.S. Safaryan, M.A. Simonyan

Hypokinesia is one of the risk factors for different diseases and pathological processes. It is both restriction of movement and spatiotemporal aspects of the environment. Hippocampus, which is responsible for spatiotemporal behavioral organization, can be impaired by stress and at the same time regulate the stress.

We have studied the oxidative and antioxidant status of hippocampus at various terms of hypokinesia (HK).

HK was caused by placing rats in special narrow individual cages for 22 hours per day. After the exposure to

long-lasting hypokinesia (for 2, 7, 15, 45, and 70 days correspondingly) the activities of antioxidative enzymes: superoxide dismutase (SOD) and catalase, as well as quantities of cytochrome c and malondialdehyde (MDA) were measured in the tissues of cerebellum.

We have revealed that oxidative enzyme and MDA are increased at the early stages of HK (2nd, 7th days), while a stable increase in antioxidative metalloproteins appeared at the late stages of HK (45th, 70th days). We have concluded that oxidative process turns to other mechanisms of adaptation and damage.

Գրականություն

1. Акопян В.П., Симонян М.А., Манукян А.А., Симонян Р.М., Акопян А.А. Бюлл.эксп.биол.мед., 2001, 132(5), с. 1062–1064.
2. Акопян В.П. Гипокинезия и мозговое кровообращение. М., 1999.
3. Ерицян Н.Б. Морфофункциональная взаимосвязь кожи и гиппокампа при гипокинезии Дис. канд. мед. наук. Ереван, 2005.
4. Камскова Ю.Д., Павлова В.И., Полкова Е.В. и др. Бюлл.эксп.биол.мед., 2003, 135(6), с. 556–558.
5. Пишеникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии. Актуальные проблемы в патофизиологии М., 2001, с. 314–322.
6. Симонян М.А., Бабалян М.А., Симонян Г.М. Биохимия. 1995. 60(12), с. 1977–1987.
7. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. №908 Армпатента. Ереван, 2001.
8. Симонян М.А., Симонян Г.М. Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. № 341 Армпатента. Ереван, 1997.
9. Симонян М.А. Способ получения супероксиддисмутазы из животного сырья. Открытия Изобретения (СССР), 1988, №28, с.107.
10. Akopian V.P., Kanaian A.S., Gevorgian A.A., Melkonian, K.V. Metabolic and morphological disorders of the brain under hypokinesia and their pharmacological correction, Eksp. Klin. Farmakol., 1993, 56(5):8–11.
11. Charleen T. Chu et al. Oxidative neuronal injury, Eur. J. Biochem., 2004, 271, p. 2060–2066.

12. *Hans-J. Bidmon*. Transient increase of manganese-superoxide dismutase in remote brain areas after focal photothrombotic cortical lesion, *Stroke*, 1998, 29:203–211.
13. *Joels M.* Corticosteroids actions in the hippocampus, *Journal of Neuroendocrinology*, 2001, vol.13, p. 657–669.
14. *Karst H., Karten Y.J., Reichardt H.M., de Kloet E.R., Schutz G., Joels M.* Corticosteroid actions in hippocampus require DNA binding of glucocorticoid receptor homodimers, *Nature Neurosci.*, 2000, 3: 977–978.
15. *Karst H., Wadman W.J., Joels M.* Corticosteroid receptor-dependent modulation of calcium currents in rat hippocampal CA1 neurons, *Brain Res.*, 1994, 649: 234–242.
16. *Manukian, A.A., Hakobian, A.A., Yedigaryova, L.V., Balian, L.S., Kocharian, A.G., Stepanyan, Z.V.* The antioxidant effect of GABA-ergic remedies in hypokinetic stress, *Archives of Pharmacology*, 1998, vol. 358, 1, p. 146.
17. *McEwen B.S.* Stressed or stressed out: what is the difference? *J. Psychiatry Neurosci.*, 2005, Sep;30 (5):315–8.
18. *McEwen B.S., Weiss J.M., Schwartz L.S.* Selective retention of corticosterone by limbic structures in the brain, *Nature*, 1968, 220: 911–912.
19. *Navasardyan G., Yeritsyan N., Safaryan K.* Spontaneous firing activity of hippocampus neurons in lasting hyperkinesias, *Behav. Pharmacol.*, 2004, vol. 15, 56. p. 29.
20. *Navasardyan G.A., Yeritsyan N.B.* The state of rat's conditioned defense-motor reflex in the early terms of hypokinesia, *Proceed. of 7-th Multidisciplinary International Conference of Biological Psychiatry "Stress and Behavior"*, Moscow, 2003, p. 21.
21. *Otani N., Nawashiro H., Fukui S., Nomura N., Yano A., Miyazawa T., Shima K.* Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways after traumatic brain injury in the rat hippocampus, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2002, Mar;22(3):327–34.
22. *Paul S. Brookes, Yisang Yoon, James L. Robotham, M.W. Anders, and Shey-Shing Sheu* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, 287: C817–C833.
23. *Pereverzev M.O., T.V. Vygodina, A.A. Konstantinov and V.P. Skulachev.* Cytochrome c. an ideal antioxidant, *Biochemical Society Transactions*, 2003, vol. 31, p. 6.
24. *Shtemberg A.S.* Combined effects of various forms of motor deprivation and gamma irradiation on the higher nervous activity in rats, *Aviakosm. Ekolog Med.*, 1997, 31(2), p.38–43.
25. *Zhang P., Wang Y.Z., Kagan E. & Bonner J.C.* Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, p. 22479–22486.
26. *Abdullaev Z.Kh., Bodrova M.E., Chernyak B. V. et al.* A cytochrome c mutant with high electron transfer and antioxidant activities, but devoid of apoptogenic effect, *Biochem. J.*, (Great Britain)2002, 362, p. 749–754.