

Естественные науки. 2022. № 2 (7). С. 18–26.

*Yestestvennyye nauki = Natural Sciences*. 2022; no. 2(7):18–26 (In Russ.)

Научная статья

УДК 612.014:616.1/.9:618.2/618.2

doi 10.54398/1818507X\_2022\_2\_18

**УРОВЕНЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ КРОВИ  
ПРЕНАТАЛЬНО СТРЕССИРОВАННЫХ САМОК КРЫС  
НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА**

*Кулешова Ольга Николаевна<sup>1</sup>✉, Брыкова Анастасия Николаевна<sup>2</sup>,  
Яковенкова Людмила Александровна<sup>3</sup>*

<sup>1–3</sup>Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

<sup>1</sup>pozdniakova\_olga@list.ru✉

**Аннотация.** Смотрели уровень окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови и гемолизате эритроцитов половозрелых пренатально стрессированных самок крыс на стадии эструс и диэструс. Пренатальный стресс (трёхчасовая иммобилизация) проводили с 16 по 19 дни пренатального онтогенеза. Состояние свободнорадикального гомеостаза (СРО) оценивали на третий-четвёртый месяц постнатального онтогенеза. После перенесённого пренатального стресса в плазме самок крыс были отмечены более существенные сдвиги СР гомеостаза, чем в эритроцитах. В целом характерно повышение уровня ПОЛ и снижение продуктов ОМБ. Однако уровень ПОЛ резервных липидов в эритроцитах остался без изменений. Такие изменения, возможно, связаны с разным уровнем активности разных звеньев антиокислительной системы. Отмечено также, что ПОЛ на стадии диэструс остаётся в норме (уровень контрольной группы), в то время как для стадии эструс отмечены значительные сдвиги этого параметра, что, вероятнее всего, зависело от изменения гормональной активности, сместившейся после перенесенного пренатального стресса.

**Ключевые слова:** свободнорадикальное окисление, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, структурные и резервные липиды, пренатальный стресс, самки крыс, плазма, эритроциты

**Для цитирования:** Кулешова О. Н., Брыкова А. Н., Яковенкова Л. А. Уровень свободнорадикального окисления крови пренатально стрессированных самок крыс на разных стадиях эстрального цикла // Естественные науки. 2022. № 2 (7). С. 18–26. [https://doi.org/10.54398/1818507X\\_2022\\_2\\_18](https://doi.org/10.54398/1818507X_2022_2_18).

**THE LEVEL OF FREE RADICAL OXIDATION  
OF THE BLOOD OF PRENATALLY STRESSED FEMALE RATS  
AT DIFFERENT STAGES OF THE ESTROUS CYCLE**

**Kuleshova Olga N.<sup>1</sup>✉, Brykova Anastasia N.<sup>2</sup>, Yakovenkova Ludmila A.<sup>3</sup>**

Astrakhan State University, Astrakhan, Russia

<sup>1</sup>pozdniakova\_olga@list.ru✉

**Abstract.** The level of oxidative modification of proteins (OMP) and lipid peroxidation (POL) in blood plasma and erythrocyte hemolysate of sexually mature prenatally stressed female rats at the estrus and diestrus stages of ovulation cycle was studied. Prenatal stress (3-hour immobilization) was carried out in the period from 16 to 19 days of prenatal ontogenesis. The state of free radical homeostasis (SRO) was assessed for 3–4 months of postnatal ontogenesis. After undergoing prenatal stress, more significant shifts in SR homeostasis were observed in the plasma of female rats than in erythrocytes. In general, an increase in the level of POL and a decrease in OMP products are characteristic. However, the level of full lipids in erythrocytes remained unchanged. Such changes may be associated with different levels of activity of different parts of the antioxidant system. It was also noted that POL at the diestrus stage remains normal (the level of the control group), while significant shifts in this parameter were noted for the estrus stage, which most likely depended on changes in hormonal activity that shifted after the prenatal stress.

**Keywords:** free radical oxidation, oxidative modification of proteins, lipid peroxidation, structural and reserve lipids, prenatal stress, female rats, plasma

**For citation:** Kuleshova O. N., Brykova A. N., Yakovenkova L. A. The level of free radical oxidation of the blood of prenatally stressed female rats at different stages of the estrous cycle. *Yestestvennyye nauki = Natural Sciences*. 2022; no. 2(7):18–26. [https://doi.org/10.54398/1818-507X\\_2022\\_2\\_18](https://doi.org/10.54398/1818-507X_2022_2_18).

**Введение.** Одним из актуальных направлений современной биологии и медицины является выявление факторов, определяющих индивидуальную предрасположенность к возникновению различных заболеваний. В связи с увеличением количества и интенсивности стрессогенных факторов особое место среди которых занимает проблема психоэмоциональных стрессов, испытываемых матерями в период беременности, особую актуальность приобретает изучение последствий перенесенного пренатального стресса у потомства этих матерей. Процессы свободнорадикального окисления (СРО) занимают центральное место в метаболизме клетки. Они служат источником энергии, необходимой для жизнедеятельности клетки и всего организма в целом [4]. Процессы свободнорадикального окисления липидов являются одним из важных регуляторов метаболизма углеводов, белков, липидов, нуклеиновых кислот, лежащего в основе пластического и энергетического обеспечения функций клетки и организма в целом. Кроме того, они являются лимитирующим звеном регуляции морфофункционального состояния биологических мембран, их проницаемости и внутриклеточного гомеостаза.

Реакции СРО, имеющие универсальный характер, являются показателем устойчивости стационарного режима превращений в организме и, оказывая влияние на его адаптивные особенности, определяют возможность развития

патологии. Это обусловлено высокой биологической активностью соединений, образующихся в реакциях СРО, комплексом системных перестроек метаболизма, изменениями характера межклеточных и межсистемных взаимоотношений, а также решающей роли в жизнедеятельности биомембран организма, в структуре которых важное место занимают липиды с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот.

Уровень свободнорадикального гомеостаза и антиоксидантной защиты в значительной степени зависит от пола, а у самок он колеблется в зависимости от стадий полового цикла. К сожалению, из-за цикличности гормональной системы малое количество исследователей уделяет внимание работе с самками. Известно, что перенесённый пренатальный стресс оказывает существенное модифицирующее влияние на уровень гормональной активности самок, их половое и исследовательское поведение [7], эти изменения у самок происходят в зависимости от стадии эстрального цикла. Несмотря на значимость процесса свободнорадикального окисления, вопрос об особенностях изменения свободнорадикального гомеостаза под влиянием пренатального стресса у самок в зависимости от стадии эстрального цикла остаётся малоизученным. В связи с тем, что кровь является межорганным связующим звеном и наиболее метаболизирующей тканью, по состоянию про- и антиоксидантного статуса с ней можно судить об общеорганизменном уровне протекания этих процессов.

Таким образом, цель исследования — изучить влияние пренатального стресса на уровень свободнорадикального окисления липидов крови самок крыс в зависимости от стадии эстрального цикла.

**Методика исследования.** Исследования проведены на 20 белых беспородных крысах самках. Животные содержались в виварии в стандартных лабораторных условиях, при свободном доступе к воде и пище. Все работы с лабораторными животными проводили с соблюдением принципов биоэтики (Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, 1993) и Правил лабораторной практики в РФ (2003). На протяжении нескольких дней у самок брали мазки из влагалища [1] для отслеживания фаз эстрального цикла. При наступлении фазы проэструса или эструса к самке подсаживали самца до наступления беременности (первым днём беременности считался день обнаружения сперматозоидов в мазке из влагалища).

Крысы были разделены на две группы: первая группа животных — крысы с нормально протекающей беременностью; вторая группа животных — крысы, подвергнутые действию иммобилизационного стресса. Для этого с 16 по 19 дни беременности каждое животное помещали в узкий пластиковый пенал, ограничивающий их подвижность на три часа ежедневно. Потомство от обеих групп составило около 60 крысят, в работе были использованы только самки. На четвёртом месяце постнатального онтогенеза у пренатально-стрессированных самок и самок группы контроля стандартным способом определяли стадии эстрального цикла. После чего каждая группа была

разделена на две группы в зависимости от стадии цикла: контроль эструс и контроль диэструс, стресс эструс и стресс диэструс. У наркотизированных этаминалом натрия (внутрибрюшинно в дозе 4 мг на 100 г массы тела) животных производили декапитацию, кровь собирали в гепаринизированные пробирки, центрифугировали, выделяли плазму и эритроцитарную массу. Из массы эритроцитов готовили гемолизат [6]. В плазме и гемолизате эритроцитов определяли содержание диеновых и кетотриеновых конъюгатов, оснований Шиффа [2]. Принцип метода основан на установлении содержания продуктов ПОЛ в крови по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра. Количество диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ) экстрагируются в гептан-изопропанольных фракциях. Так как в гептане экстрагируются в основном нейтральные липиды, а в изопропаноле — фосфолипиды, гептановая фракция свидетельствует об активности ПОЛ в нейтральных липидах, а изопропанольная — в фосфолипидах.

Уровень продуктов окислительной модификации белковых молекул (ОМБ) устанавливали по методу Е. Е. Дубининой и соавт. [3], регистрировали уровень продуктов ОМБ на стадии инициации (270 нм) и стадии пролонгации (370 нм) [5].

Для перерасчёта уровней модифицированных белков на грамм белка, определяли общий белок сыворотки методом Лоури. Пробы спектрофотометрировали на цифровом UV-спектрофотометре PD-303UV (Arel, Япония). Статистическая обработка полученных данных производилась с применением *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** В норме в плазме и эритроцитах уровень СРО отличался незначительно. В плазме (табл. 1) в стадии ДЭ отмечалось снижение уровня кетодиенов и сопряжённых триенов резервных липидов ( $p < 0,001$ ) и увеличение уровня диеновых конъюгатов и оснований Шиффа структурных фосфолипидов ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно). Отмечен рост продуктов ОМБ на стадии ДЭ ( $p < 0,001$ ). В эритроцитах (табл. 2) происходили изменения уровня окислительной модификации только липидов: установлено уменьшение кетодиенов и сопряжённых триенов резервных липидов ( $p < 0,05$ ), диеновых конъюгатов и кетодиенов и сопряжённых триенов структурных липидов ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно).

После перенесённого пренатального стресса в плазме самок крыс вне зависимости от стадии цикла произошли однонаправленные изменения СРО гомеостаза. Отмечено уменьшение количества продуктов ОМБ и увеличение продуктов ПОЛ как структурных (диеновых конъюгатов и оснований Шиффа), так и резервных липидов (основания Шиффа).

Таблица 1

**Свободнорадикальный гомеостаз в плазме пренатально стрессированных самок крыс  
в зависимости от стадии эстрального цикла**

		Контроль		Пренатальный стресс	
		Эструс, <i>n</i> = 8	Диэструс, <i>n</i> = 8	Эструс, <i>n</i> = 8	Диэструс, <i>n</i> = 7
ОМБ, Е на мг белка в 1 мл	270	0,014±0,0019	0,015±0,0017	0,006±0,0005 ***	0,008±0,0013 **
	363	0,018±0,0008	0,023±0,0034	0,003±0,0005 ***	0,005±0,0008 *** #
	430	0,017±0,0019	0,029±0,0033 ###	0,007±0,0005 ***	0,007±0,0005 ***
Продукты СРО резервных ли- пидов (триа- цилглицеридов)	Диеновые конъюгаты	0,518±0,0123	0,493±0,0385	0,554±0,0191	0,476±0,0300 #
	Кетотриены и сопр. триены	0,131±0,0211	0,111±0,0108 ###	0,103±0,0228	0,144±0,0145
	Основания Шиффа	0,036±0,0038	0,034±0,0039	0,078±0,0100 ***	0,069±0,0068 ***
Продукты СРО структурных (мембранные) фосфолипидов	Диеновые конъюгаты	0,107±0,0139	0,272±0,0201 ###	0,253±0,0283 ***	0,146±0,0067 *** ###
	Кетотриены и сопр. триены	0,466±0,0507	0,484±0,0458	0,549±0,0681	0,576±0,0390
	Основания Шиффа	0,032±0,0038	0,048±0,0055 #	0,092±0,0133 ***	0,106±0,0209 **

Примечание: статистически достоверная разница между показателями контрольной и опытной групп —  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$  и между стадиями эструс и диэструс —  $p < 0,05^{\#}$ ,  $p < 0,01^{\#\#}$ ,  $p < 0,001^{\#\#\#}$  (критерий Стьюдента).

Таблица 2

**Свободнорадикальный гомеостаз в эритроцитах пренатально стрессированных самок крыс в зависимости от стадии эстрального цикла**

		Контроль		Пренатальный стресс	
		Эструс, <i>n</i> = 8	Диэструс, <i>n</i> = 11	Эструс, <i>n</i> = 8	Диэструс, <i>n</i> = 9
ОМБ, Е на мг белка в 1 мл	270	0,120±0,011	0,151±0,0169	0,071±0,017 *	0,071±0,0159 ***
	363	0,104±0,0173	0,122±0,0197	0,101±0,0209	0,127±0,0099
	430	0,074±0,0074	0,116±0,0164	0,055±0,0069	0,063±0,0059 **
Продукты СРО резервных липидов (триацилглицеридов), у.е.	Диеновые конъюгаты	0,668±0,0351	0,591±0,017	0,606±0,0183	0,567±0,0237
	Кетотриены и сопр. триены	0,203±0,0157	0,155±0,0115 #	0,220±0,0264	0,178±0,0230
	Основания Шиффа	0,120±0,0129	0,096±0,04181	0,115±0,0147	0,096±0,0034
Продукты СРО структурных (мембранных) фосфолипидов, у.е.	Диеновые конъюгаты	0,517±0,0439	0,656±0,0226 ###	0,709±0,0698 *	0,656±0,0646 ###
	Кетотриены и сопр. триены	0,638±0,0435	0,950±0,0968 ##	1,140±0,2100 *	1,032±0,0754
	Основания Шиффа	0,534±0,0372	0,574±0,0666	1,163±0,1224 ***	0,680±0,0764 ###

Примечание: статистически достоверная разница между показателями контрольной и опытной групп —  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$  и между стадиями эструс и диэструс —  $p < 0,05^{\#}$ ,  $p < 0,01^{\##}$ ,  $p < 0,001^{\###}$  (критерий Стьюдента).

В эритроцитах пренатально стрессированных самок крыс также отмечены изменения СРО гомеостаза. На стадии эструса отмечено уменьшение продуктов ОМБ (270,  $p < 0,001$ ), и значительный рост продуктов ПОЛ структурных липидов (табл. 2). Изменение уровня ПОЛ на стадии ДЭ отмечено не было, уровень ОМБ значительно уменьшился (270,  $p < 0,001$  и 430,  $p < 0,01$ ). Активность СОД также изменилась только на стадии ДЭ, отмечено увеличение показателя ( $p < 0,05$ ).

Особенностью пренатального стресса является его пролонгированный эффект, так как на стадии пренатального развития любое негативное влияние будет оказывать «программирующее» влияние, сохраняющееся на протяжении всего постнатального онтогенеза: самки, перенесшие пренатальный стресс, отличаются более высоким уровнем стресс-гормона кортикостерона, рост которого характерен и для стадии эструса, и для стадии диэструса. Отмечено нивелирование гормональных различий между стадиями эстрального цикла для уровня эстрадиола в крови, также для пренатально стрессированных самок крыс характерен рост уровня прогестерона в стадии диэструса.

В нашем эксперименте перенесённый самками пренатальный стресс привёл к существенным изменениям свободнорадикального гомеостаза их крови в половозрелом возрасте. При этом в плазме крови были отмечены существенно более выраженные сдвиги свободнорадикального гомеостаза, чем в эритроцитах. Вероятно, это связано с тем, что уровень свободнорадикального гомеостаза плазмы отражает общеорганизменный уровень окислительных процессов, разные органы и системы могут по-разному реагировать на перенесённый пренатальный стресс и изменять базовый уровень СРО плазмы. Рост уровня ПОЛ в эритроцитах крови пренатальный стресс самок крыс характерен только для структурных липидов и не отмечается для резервных. Перекисное окисление мембранных фосфолипидов является самым распространённым механизмом деструкции мембранных структур. Эритроциты — клетки, лишённые системы репарации, одновременно, их функциональная активность напрямую связана с уровнем метаболической активности организма. Уровень окисления белковых молекул после перенесённого пренатального стресса снижался как в плазме, так и в эритроцитах. Вероятно, это объясняется особенностями активности антиокислительной системы, точнее — изменением активности различных её звеньев. Вероятно, активность липидных, жирорастворимых антиоксидантов существенно ниже, чем цитозольных. Следствием этого является разница в степени деструкции липидных и белковых молекул.

Для липидных молекул плазмы крови пренатально стрессированных самок крыс отмечен рост свободнорадикального окисления вне зависимости от стадии эстрального цикла. Избыточное образование продуктов ПОЛ имеет повреждающее воздействие на клетки и в целом на организм, что связано с накоплением перекисей липидов. Продукты ПОЛ относятся к токсичным метаболитам, оказывающим повреждающее влияние на липопротеиды, белки, ферменты, нуклеиновые кислоты.

**Заключение.** Таким образом, после перенесённого пренатального стресса в системе «плазма — эритроциты» половозрелых самок крыс нами были отмечены значительные изменения в уровнях ПОЛ и ОМБ. После перенесённого пренатального стресса в плазме самок крыс были отмечены более существенные сдвиги свободнорадикального гомеостаза, чем в эритроцитах. В целом характерно повышение уровня ПОЛ и снижение продуктов ОМБ. Однако уровень ПОЛ резервных липидов в эритроцитах остался без изменений. Такие изменения, возможно, связаны с разным уровнем активности разных звеньев антиокислительной системы. Отмечено также, что ПОЛ на стадии диэструса сохраняется на нормальном уровне (уровень контрольной группы), на стадии эструса замечены значительные изменения этого параметра, что, вероятнее всего, зависело от изменения гормональной активности, сместившейся после перенесенного пренатального стресса.

#### Список литературы

1. Владимирская, Т. Э. Определение фаз эстрального цикла белых крыс по клеточному составу влагалищных мазков / Т. Э. Владимирская, И. А. Швед, С. Г. Криворот и др. // Вести национальной академии наук Белоруссии. Серия биологических наук. — 2011. — № 4. — С. 88–91.
2. Волчегорский, И. А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактов крови / И. А. Волчегорский, А. Г. Налимов, Б. Г. Яровинский, Р. И. Лившиц // Вопросы медицинской химии. — 1989. — Т. 35, № 3. — С. 127–131.
3. Дубинина, Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов, И. Г. Поротов // Вопросы медицинской химии. — 1999. — Т. 45, № 1. — С. 47–54.
4. Луцкий, М. А. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма / М. А. Луцкий, Т. В. Куксова, М. А. Смелянец, Ю. П. Лушникова // Успехи современного естествознания. — 2014. — № 12–1. — С. 24–28.
5. Флеров, М. А. Влияние пренатального стресса на свободнорадикальное окисление липидов и белков и активность супероксиддисумутазы в нейронах и нейроглии коры больших полушарий головного мозга крыс / М. А. Флеров, И. А. Герасимова, А. В. Вьюшина, А. В. Притворова // Российский физиологический журнал им. Сеченова. — 2008. — Т. 94, № 4. — С. 406–413.
6. Drabkin, D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and hemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. — 1949. — Vol. 21. — P. 224–226.
7. Moura, C. A. Prenatal restraint stress impairs recognition memory in adult male and female offspring / C.A. Moura, M.C. Oliveira, L.F. Costa // Acta Neuropsychiatrica. — 2020. — Vol. 32, № 3. — P. 122–127.

#### References

1. Vladimirskaia, T. E., Shved I. A., Krivorot S. G. et al. Determination of the phases of the estrous cycle of white rats by the cellular composition of vaginal smears. *Vesti of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Biological Sciences = News of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Sciences Series*. 2011; no. 4:88–91.
2. Volchegorsky, I. A., Nalimov, A. G., Yarovinsky, B. G., Livshits, R. I. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy Meditsinskoy Khimii = Question. of Medical Chemistry*. 1989; vol. 35, no. 3:127–131.



3. Dubinina, E. E., Burmistrov S. O., Khodov D. A., Porotov I. G. Oxidative modification of human serum proteins, method of its determination. *Voprosy Meditsinskoj Khimii = Question. of Medical Chemistry*. 1999; vol. 45, no. 1:47–54.

4. Lutsky M. A., Kuksova T. V., Smelyanets M. A., Lushnikova Yu. P. Free radical oxidation of lipids and proteins — a universal process of vital activity of the organism. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Successes of modern natural science*. 2014; no. 12–1:24–28.

5. Flerov, M. A., Gerasimova, I. A., Vyushina, A. V., Pritvorova, A. V. The effect of prenatal stress on free radical oxidation of lipids and proteins and the activity of superoxide dimutase in neurons and neuroglia of the cerebral cortex of rats. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. Sechenova = Russian Sechenov Physiological Journal*. 2008; vol. 94, no. 4:406–413.

6. Drabkin, D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and hemoglobin in the crystalline. *Arch. Biochem*. 1949; vol. 21:224–226.

7. Moura, C. A., Oliveira, M. C., Costa L. F. Prenatal restraint stress impairs recognition memory in adult male and female offspring. *Acta Neuropsychiatrica*. 2020; vol. 32, no. 3:122–127.

#### **Информация об авторах**

Кулешова О. Н. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;

Брыкова А. Н. — студент;

Яковенкова Л. А. — кандидат биологических наук, доцент.

#### **Information about the authors**

Kuleshova O. N. — Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher;

Brykova A. N. — student;

Yakovenkova L. A. — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor.

#### **Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### **Contribution of the authors**

The authors contributed equally to this article. The authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 16.05.2022; одобрена после рецензирования 19.05.2022; принята к публикации 23.05.2022.

The article was submitted 16.05.2022; approved after reviewing 19.05.2022; accepted for publication 23.05.2022.