

УДК 616.831-005.4-036.11-092.9:616.15-074

## ХАРАКТЕРИСТИКА СДВИГОВ В СИСТЕМЕ ПРО-/АНТИОКСИДАНТЫ У КРЫС С МОДЕЛЬЮ ОСТРОЙ ЛОКАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Левичкин В.Д., Павлюченко И.И., Каде А.Х., Охременко О.С., Трофименко А.И., Занин С.А.

*ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации», Краснодар, e-mail: artemtrofimenko@mail.ru*

Целью нашей работы было исследование показателей системы про-/антиоксиданты в динамике острой локальной церебральной ишемии в эксперименте у крыс. Мы определяли ферментативные и не ферментативные показатели системы про-/антиоксиданты в эритроцитарной массе и плазме крови экспериментальных животных на 1, 3, 7, 14 сутки после воссоздания модели острой локальной церебральной ишемии. В эритроцитарной массе изучалась активность ферментов первой и второй линии антиоксидантной системы крови – супероксиддисмутазы и каталазы. В плазме крови биофизическими методами определялась общая антиоксидантная активность и уровень максимальной вспышки хемилюминесценции. В ходе работы показано значительное превалирование прооксидантных факторов над антиоксидантными на всех этапах наблюдения за течением модели ишемического инсульта.

**Ключевые слова:** церебральная ишемия у крыс, антиоксидантная защита, оксидативный стресс

## CHARACTERISTIC CHANGES IN PRO-/ANTIOXIDANT SYSTEM THE MODEL OF ACUTE FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA IN THE RAT

Levichkin V.D., Pavljuchenko I.I., Kade A.H., Ohremenko O.S., Trofimenko A.I., Zanin S.A.

*Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnodar, e-mail: artemtrofimenko@mail.ru*

The aim of our work was to study the performance of pro-/antioxidants in the dynamics of acute focal cerebral ischemia in experimental rats. We determined the enzymatic system performance and no enzymatic pro-/antioxidants erythrocyte mass and serum of experimental animals at 1, 3, 7, 14 days after reconstitution model of acute focal cerebral ischemia. In the red cell mass of the enzyme activity was studied first and second line of the blood antioxidant – superoxide dismutase and catalase. In the blood plasma of biophysical methods determined total antioxidant activity and the level of maximum flash chemiluminescence. The work shows a significant prevalence of the prooxidant antioxidant factors at all stages monitor the progress of the model of ischemic stroke.

**Keywords:** cerebral ischemia in rats, antioxidant protection, oxidative stress

Сдвиг равновесия в системе биологического окисления в сторону активации процессов перекисного окисления липидов с одновременным ослаблением резервов антиоксидантной системы защиты организма получил название окислительного, или оксидативного, стресса [4]. Каскад патобиохимических реакций, запускаемых оксидативным стрессом (ОС), является одним из ключевых звеньев патогенеза повреждения нервной ткани при самых разных патологических процессах [1, 13]. Известно, что в организме существует антиоксидантная система, включающая в свой состав комплекс внутриклеточных ферментов, противодействующих окислительному стрессу и обезвреживающих свободные радикалы (супероксиддисмутазы и каталазы) [2]. Однако при значительном повышении содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) эндогенная антиоксидантная система становится неспособной поддерживать баланс системы про-/антиоксиданты, что приводит к развитию оксидативного стресса

(ОС) одного из универсальных механизмов повреждения тканей [2, 7]. При развитии церебральной ишемии создаются условия для массивного образования энзимов и субстратов, которые могут образовывать свободные радикалы, запускающие цепные реакции «повреждения» с фрагментацией мембранных фосфолипидов. Цитотоксичность активированных форм кислорода (АФК) проявляется посредством индукции процессов липопероксидации, инактивации ферментов и повреждения мембраносвязывающих белков [3, 14].

**Цель исследования** – изучить особенности сдвигов в системе про-/антиоксиданты у крыс с моделью острой локальной церебральной ишемии.

### Материал и методы исследования

Исследования проведены в лабораториях кафедры общей и клинической патофизиологии и кафедры фундаментальной и клинической биохимии ГБОУ ВПО КубГМУ. Эксперименты проведены на 60 крысах линии Вистар, средней массой – 250 ± 50 г.

Содержание животных и постановка экспериментов проводилась в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 года и № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 года, а также международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Крысы были разделены на 2 группы: 1 группа – из 40 животных, которым выполнялась коагуляция правой средней мозговой артерии [8] с последующим забоем на 1, 3, 7 и 14 сутки; 2 группа – из 20 крыс, контрольная, операция этим крысам не выполнялась. В экспериментах использовали общий наркоз (0,3 мг зоветила, 0,8 мг ксиланита, 0,02 мл – 0,1% раствора атропина на 100 г веса животных) [9]. Эвтаназию крысам проводили следующим образом: под глубоким наркозом выполнялась декапитация, далее выделяли головной мозг, ополаскивали в холодном 0,9% растворе хлорида натрия, проводили фиксацию органов в 10% нейтральном формалине, с последующей проводкой в ряду спиртов, заливкой образцов в парафин и приготовлением срезов и стекол. Окрашивание полученных стекол выполняли гематоксилином-эозином [11]. Для изучения показателей системы прооксиданты-антиоксиданты крысы из экспериментальной группы ( $n = 40$ ) на 1, 3, 7 и 14 выводились из эксперимента по 10 животных, и у них производился забор крови. Гепаринизированная кровь центрифугировалась, отделялись эритроцитарная масса и плазма крови, в которых изучались ферментные и неферментные показатели системы про-/антиоксиданты. Контролем служили аналогичные показатели группы интактных крыс ( $n = 20$ ). В эритроцитарной массе изучалась активность ферментов первой и второй линии антиоксидантной системы (АОС) крови – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Активность КАТ исследовали в гемолизате эритроцитов по методу, предложенному R. Veers et al., 1952 в авторской модификации И.И. Павлюченко и соавт., 2006 [5], основанному на оценке скорости убывания субстрата фермента (перекиси водорода). Активность СОД определяли в гемолизате эритроци-

тов по методу предложенному В.А. Костюк и соавт., 1990, в авторской модификации И.И. Павлюченко и соавт., 2006 [5], которая основана на способности СОД ингибировать индуцированную реакцию аутоокисления кверцетина. В плазме крови изучались биофизическими методами общая антиоксидантная активность (АОА) и уровень максимальной вспышки хемиллюминесценции (МВХЛ). Определение АОА плазмы крови проводилось модифицированным амперометрическим способом на анализаторе «Яуза-01-ААА». Способ основан на измерении электрического тока, возникающего при окислении биологического образца на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале. Интенсивность МВХЛ определялась с помощью люминотестера ЛТ-01 в составе системы для диагностики ОС [6], включающей аналогово-цифровой преобразователь и ЭВМ с авторской «Программой регистрации сигналов хемиллюминотестера ЛТ-01», позволяющей регистрировать амплитуду и площадь хемиллюминесценции.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для подтверждения формирования церебральной ишемии проведено гистологическое исследование ткани мозга. Результаты гистологического исследования мозговой ткани подтвердили формирование ишемии по характерным зонам некроза.

При изучении показателей системы про-/антиоксиданты в период с 1 по 14 сутки течения экспериментального ИИ были выявлены существенные сдвиги в системе антиоксидантной защиты (АОЗ) крови уже на первые сутки. Эти изменения, отражающие формирование ОС и его динамику, наиболее наглядно проявились на уровне биофизических показателей плазмы (таблицу).

#### Показатели системы про-/антиоксиданты у крыс с моделью ИИ

Показатель/группа экспериментальных животных	Модель ИИ								Интактные животные (контроль)	
	1 сутки		3 сутки		7 сутки		14 сутки			
Период наблюдения	М	m	М	m	М	М	М	m	М	m
<sup>1</sup> АОА, нА*с	2151,3	39,8	2931,1	47,8	2818,2	87,4	1214,5	19,7	1441,9	35,26
<sup>2</sup> МВХЛ, у.е. ХЛ	0,327	0,025	0,532	0,035	0,887	0,023	0,648	0,045	0,137	0,06
<sup>3</sup> КАТ, ед. акт.	1,28	0,03	0,87	0,03	1,22	0,07	1,33	0,05	1,79	0,1
<sup>4</sup> СОД, ед. акт.	0,18	0,01	0,21	0,01	0,33	0,03	0,16	0,01	0,13	0,06

Примечания: <sup>1</sup>АОА – антиоксидантная активность; <sup>2</sup>МВХЛ – максимальная вспышка хемиллюминесценции; <sup>3</sup>КАТ – каталаза; <sup>4</sup>СОД – супероксиддисмутаза.

Общая АОА активность плазмы крови уже на первые сутки моделирования ИИ возросла в среднем на 49% относительно показателей группы интактных животных. На 3–7 сутки рост этого показателя продолжался, и он превосходил нормальные показатели, характерные для группы интактных животных, в два и более раз. Если судить об

изменениях этого показателя у экспериментальных животных в период формирования ИИ, то можно их характеризовать как выраженную защитную реакцию активации стресс-лимитирующих систем в ответ на прооксидантную нагрузку. Однако данная реакция возможна при изначально не истощенной системе АОС, что характерно

только для пациентов молодого возраста и без сопутствующей патологии. Прирост общей АОА плазмы может быть обусловлен и накоплением продуктов гиперкатаболизма и тканевого распада в виде олигопептидов и молекул низкой и средней массы, которые, с одной стороны, обладают антиоксидантными свойствами, а с другой, при их значительной концентрации имеют достаточно высокую токсичность (мочевина, мочевая кислота, внеэритроцитарный гемоглобин, миоглобин и пр.) [11, 12]. При длительном течении ИИ показатель АОА плазмы начинает резко снижаться, что, вероятно, связано с дезадаптацией системы АОЗ, и к 14 суткам он был в среднем на 15% даже ниже показателей группы контроля. Выраженность прооксидантной нагрузки подтвердил показатель ХЛ, который возрос уже на 1 сутки после моделирования ИИ в 2,4 раза. Так как индукция процессов СРО превалировала над активацией АОС к 3 суткам уровень максимальной вспышки ХЛ уже в 3,9 раз превышал показатель группы контроля, к 7 суткам – в 6,5 раз, и только к 14 суткам начиналось постепенное снижение этого показателя, но он не возвращался даже к уровню цифр 1 суток и оставался выше показателя группы интактных животных в 4,7 раза. Резкое снижение общей АОА плазмы и стойкое повышение уровня продуктов СРО дает повод говорить о дисбалансе в системе АОЗ крови и организма в целом, что является неблагоприятным фактором течения патологического процесса и требует эффективных мер метаболической коррекции. Дисбаланс в системе АОЗ клеток подтвердился и при изучении активности ферментов антирадикальной и антиоксидантной защиты эритроцитов. Активность СОД прогрессивно возрастала до 7 суток после моделирования ИИ. На 1 сутки ее активность возросла на 38,5% относительно группы контроля, к 3 суткам – на 61,5% и к 7 суткам превосходила данные контрольной группы в 2,5 раза. Затем отмечено значительное падение данного показателя, но и к 14 суткам активность СОД не возвращалась к нормальным значениям, оставаясь на 23,1% выше контрольных показателей. В отличие от активности СОД активность фермента второй линии антиоксидантной защиты КАТ имела тенденцию к снижению. В период с 1-х по 14-е сутки ее снижение в среднем колебалось в пределах 48,6–74,3%. Наиболее низкая каталазная активность отмечена на 3-и сутки. К 14 суткам происходила некоторая стабилизация активности этого фермента, но снижение его функции относительно показателей контрольной группы составляло

все же около 25%. Активация СОД является важным фактором защиты организма от избытков первичных радикалов, к которым относится и супероксидный анион-радикал, в дисмутации которого СОД принимает непосредственное участие. Но есть проблема избыточного образования активных метаболитов кислорода при участии компонентов АОС, в частности, пероксида водорода, который может синтезироваться в повышенных количествах на фоне высокой активности СОД и низкой активности КАТ, что и наблюдалось у экспериментальных животных.

### Заключение

При исследовании показателей системы про-/антиоксиданты в условиях острой локальной церебральной ишемии обнаружены следующие характерные изменения. На 3 сутки отмечалось превалирование роста показателя МВХЛ над ростом показателя АОА, внутриклеточно отмечалось повышение активности СОД и падение активности КАТ. Это отражает недостаточную активность внутриклеточной ферментативной системы по утилизации свободных радикалов с накоплением вторичных продуктов (перекись водорода), а также выраженным преобладанием прооксидантной активности плазмы крови на фоне высокого уровня антиоксидантной активности. На 14 сутки на фоне высокого уровня МВХЛ отмечалось резкое падение показателя АОА, при этом со стороны клеток на фоне постепенно снижающейся активности СОД отмечалась тенденция к восстановлению активности КАТ. Таким образом, завершение острого периода на модели ишемического инсульта характеризовалось появлением тенденции к нормализации внутриклеточной ферментативной антиоксидантной системы, что в совокупности с резким падением АОА плазмы крови на фоне высокого МВХЛ можно трактовать как истощение антиоксидантной стресс-лимитирующей системы при оксидативном стрессе. Можно ли трактовать данный паттерн системы про-/антиоксиданты как предиктор развития нейродегенеративных процессов головного мозга, покажут дальнейшие исследования.

### Список литературы

1. Окислительный стресс при остром ишемическом инсульте и его коррекция с использованием антиоксиданта мексидола / С.М. Виничук, В.А. Мохнач, М.М. Прокопив, Н.С. Турчина, П.П. Унич, Л.Н. Трепет // Международный неврологический журнал. – 2006. – № 1 (5). – С. 18–22.
2. Луцак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него // Биохимия. – 2001. – Т. 66, Вып. 5. – С. 592–609.

3. Окислительный и стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др. – Новосибирск, 2008. – 284 с.
4. Особенности перекисного стресса у детей, проживающих на территории длительного низкоинтенсивного радиационного воздействия / Л.А. Дурнов, В.М. Байкова, В.Г. Поляков и др. // *Вопр. онкол.* – 2000. – № 4. – С. 395–400.
5. Активность ферментов антирадикальной защиты в эритроцитах и в раневом отделяемом у больных с осложненным течением сахарного диабета / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, С.Р. Федосов, И.А. Луговая, М.И. Быков // *Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: XIV международная конференция и дискуссионный научный клуб. 1–5 июня 2006 г. Украина, Крым. – Ялта-Гурзуф, 2006.*
6. Павлюченко И.И., Федосов С.Р., Басов А.А. Программа для регистрации сигналов хемиллюминотестера ЛТ-1. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2006611562 от 10 мая 2006 года.
7. Свободнорадикальное окисление: учебное пособие / Ф.Е. Путилина, О.В. Галкина, Н.Д. Ещенко, Г.П. Диде, И.Е. Красовская. – СПб.: Из-во СПбГУ, 2008. – 164 с.
8. Моделирование церебральной ишемии посредством коагуляции средней мозговой артерии у крыс / А.И. Трофименко, А.Х. Каде, В.П. Лебедев, С.А. Занин, В.В. Мясникова // *Фундаментальные исследования.* – 2012. – № 2. – С. 215–218.
9. Влияние ТЭС-терапии на исходы острого адrenaлинового повреждения сердца у крыс / А.И. Трофименко, Каде А.Х., В.П. Лебедев, С.А. Занин, А.Ю. Туровая, С.П. Вчерашнюк, С.О. Апсалямова, В.Д. Левичкин, И.В. Порублев // *Кубанский научный медицинский вестник.* – 2013. – № 5 (140). – С. 174–180.
10. Яворская В.А. Исследование уровня молекул средней массы и процессов перекисного окисления липидов в крови больных с разными формами инсульта / Яворская В.А., Белоус А.М., Мохамед А.Н. // *Журн неврологии и психиатрии.* – 2000. – № 1. – С. 48–51.
11. Manual of stroke models in rats, edited by Yanlin Wang-Fischer, CRC Press Taylor& Francis Group, 2009.
12. Ozkul A. Oxidative stress in acute ischemic stroke / Ozkul A., Akyol A., Yenisey C. // *J. of Clin. Neuroscience Pure Appl. Chem.* 2001. no. 11. pp. 1062–1066.
13. Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis Text / M. Yokoyama // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004. no. 4. pp. 110–115.
14. Zhou Y., Hu C.P., Deng P.Y., Deng H.W., Li Y.J. The protective effects of ligustrazine on ischemia-reperfusion and DPPH free radical-induced myocardial injury in isolated rat hearts // *Planta Med.* 2004 Sep; 70(9):818–22.
4. Osobennosti perekisnogo stressa u detej, prozhivaju shhih na territorii dlitel'nogo nizkointensivnogo radiacionnogo vozdejstvija / Durnov L.A., Baj-kova V.M., Poljakov V.G. i dr. // *Vopr. onkol.* 2000. no. 4. pp. 395–400.
5. Pavljuchenko I.I., Basov A.A., Fedosov S.R., Lugovaja I.A., Bykov M.I. Aktivnost' fermentov antiradikal'noj zashhity v jeritrocitah i v ranevom otdeljaemom u bol'nyh s oslozhnenym techeniem saharnogo diabeta. XIV mezhdunarodnaja konferencija i diskussionnyj nauchnyj klub «Novye informacionnye tehnologii v medicine, biologii, farmakologii i jekologii». 1–5 ijunya 2006 g. Ukraina, Krym, Jalta-Gurzuf, 2006.
6. Pavljuchenko I.I., Fedosov S.R., Basov A.A. Programma dlja registracii signalov hemiljuminotestera LT-1. Svidetel'stvo ob oficial'noj registracii programmy dlja JeVM no. 2006611562 ot 10 maja 2006 g.
7. Putilina F.E., Galkina O.V., Eshhenko N.D., Dizhe G.P., Krasovskaja I.E. Svobodnoradikal'noe okislenie. Uchebnoe posobie. Iz-vo SPbGU, 2008 g, 164 p.
8. Trofimenko A.I., Kade A.H., Lebedev V.P., Zanin S.A., Mjasnikova V.V. Modelirovanie cerebral'noj ishemii posredstvom koaguljacii srednej mozgovoј arтерii u kryс // *Zhur. fundamental'nye issledovanija* no. 2, 2012 pp. 215–218.
9. Trofimenko A.I., Kade A.H., Lebedev V.P., Zanin S.A., Turovaja A.Ju., Vcherashnjuk S.P., Apsaljamova S.O., Levichkin V.D., Porublev I.V. Vlijanie TJeS-terapii na ishody ostrogo adrenalinovogo povrezhdenija serdca u kryс // *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*, no. 5 (140), 2013 g, pp. 174–180.
10. Javorskaja V.A. Issledovanie urovnja molekul srednej massy i processov perekisnogo okislenija lipidov v krvi bol'nyh s raznymi formami insul'ta / Javorskaja V.A., Belous A.M., Mohamed A.N. // *Zhur. neurologii i psichiatrii.* 2000. no. 1. pp. 48–51.
11. Manual of stroke models in rats, edited by Yanlin Wang-Fischer, CRC Press Taylor& Francis Group, 2009.
12. Ozkul A. Oxidative stress in acute ischemic stroke / Ozkul A., Akyol A., Yenisey C // *J. of Clin. Neuroscience Pure Appl. Chem.* 2001. no. 11. pp. 1062–1066.
13. Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis Text / M. Yokoyama // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004. no. 4. pp. 110–115.
14. Zhou Y., Hu C.P., Deng P.Y., Deng H.W., Li Y.J. The protective effects of ligustrazine on ischemia-reperfusion and DPPH free radical-induced myocardial injury in isolated rat hearts // *Planta Med.* 2004 Sep; 70(9):818–22.

### References

### Рецензенты:

Артемьева Н.К., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой биохимии и естественнонаучных дисциплин, ФГОУ ВПО «Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма», г. Краснодар;

Абушкевич В.Г., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 10.09.2013.