

ПРООКСИДАНТНО-ОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС У КРЫС С ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ

Елизавета Бонь,
доцент кафедры
патологической
физиологии
Гродненского
государственного
медицинского
университета,
кандидат
биологических наук,
доцент;
asphodela@list.ru

**Наталья
Максимович,**
заведующий
кафедрой
патологической
физиологии ГрГМУ,
доктор медицинских
наук, профессор;
mne@grsmu.by

Иосиф Дремза,
доцент кафедры
патологической
физиологии
ГрГМУ, кандидат
биологических наук,
доцент;
idremza@rambler.ru

Татьяна Каваленя,
аспирант кафедры
биохимии ГрГУ;
t.kovalenya93@gmail.com

**Мария
Лычковская,**
студентка 4-го курса
педиатрического
факультета ГрГМУ;
lychkovskaya.m@gmail.com

Александра Койко,
студентка 3-го курса
педиатрического
факультета ГрГМУ;
alexandrakoiko@yandex.by

Виолетта Шевчук,
студентка 3-го курса
педиатрического
факультета ГрГМУ;
violetta.shev00@mail.ru

Аннотация. В статье показана важность процесса генерации активных форм кислорода для жизнедеятельности клеток организма в целом и головного мозга в частности и указана опасность их избыточной выработки, которая может приводить к повреждению мембран, накоплению продуктов окисления липидов, белков и нуклеиновых кислот, дефициту восстановленных пиридиннуклеотидов и фосфолипидов митохондриальных мембран, а затем – к электролитному дисбалансу, набуханию митохондрий, разобщению процессов окисления и фосфорилирования и гибели нейронов при ишемии. В представленном исследовании были изучены показатели дыхания митохондрий гомогенатов головного мозга крыс с его тотальной и субтотальной ишемией спустя 1 час и 1 сутки, отмечены нарастающие с течением времени нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса и усугубление дефицита антиоксидантных механизмов.

Ключевые слова: окислительный стресс, церебральная ишемия, нейроны.

Для цитирования: Бонь Е., Максимович Н., Дремза И., Каваленя Т., Лычковская М., Койко А., Шевчук В. Прооксидантно-оксидантный баланс у крыс с церебральной ишемией // Наука и инновации. 2023. №5. С. 75–78. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-05-75-78>

При ишемии головного мозга (ИГМ) развивается цепь патогенетических нарушений в его структурах, среди которых одно из ведущих – энергодефицит, ведущий к развитию клеточной патологии из-за изменения гомеостаза, активности ферментов, целостности мембран [8–10]. Избирательно повреждаются и механизмы синаптической передачи, что способствует расстройству ауторегуляции местного кровотока, развитию вазоспазма и внутрисосудистого стаза, усилению агрегации тромбоцитов, усугубляет гипоксию и энергодефицит [12, 13, 16]. Нарушается работа ферментов, в том числе натрийкалиевой АТФазы, приводя к дисбалансу ионов и отеку головного мозга (ГМ) [1–3, 5].

Образование активных форм кислорода (АФК) играет важную роль в жизнедеятельности клеток головного мозга и организма в целом. В небольших количествах кислородные радикалы выполняют

функции мессенджера, отвечая за нейрональную активность, регулируют мозговой кровоток, апоптоз и другие процессы. Однако их избыток ведет к повреждению мембран, накоплению продуктов окисления липидов, белков и нуклеиновых кислот (альдегидов, кетонов), дефициту восстановленных пиридиннуклеотидов и фосфолипидов митохондриальных мембран, а затем – к электролитному дисбалансу, набуханию митохондрий, разобщению процессов окисления и фосфорилирования и гибели нейронов при ишемии. Повреждение АФК незащищенной гистонами митохондриальной ДНК приводит к ингибированию синтеза белков – переносчиков электронов [7, 11]. В связи с этим исследование окислительного стресса, активности антиоксидантной системы имеет важное значение.

Цель данной работы – изучить изменения прооксидантно-оксидантного баланса у крыс

с ишемическим повреждением головного мозга различной степени тяжести с субтотальной (одномоментной двухсторонней перевязкой обеих общих сонных артерий, ОСА) и тотальной (полным прекращением мозгового кровотока) ИГМ.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 24 самцах беспородных белых крыс массой 260 ± 20 г с соблюдением требований Директивы Европейского парламента и Совета №2010/63/EU от 22.09.2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей.

Моделирование ИГМ осуществляли в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг): тотальную ишемию головного мозга (ТИГМ) – путем декапитации животных, субтотальную (СИГМ) – одномоментной перевязкой обеих общих сонных артерий (ОСА). Забор головного мозга проводили спустя 1 час и 24 часа после декапитации [1]. Контрольную группу составили ложно оперированные крысы аналогичных пола и веса.

Для оценки прооксидантно-антиоксидантного состояния ГМ в его гомогенатах (20%-ное разведение в PBS, pH – 7,2) определяли активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), концентрацию восстановленного глутатиона (GSH), общих тиоловых групп (TSH) и активность глутатионпероксидазы.

ТБКРС возникают в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода, служат маркером активности ПОЛ и окислительного стресса. Для определения их содержания к исследуемому образцу 10%-ного гомогената головного мозга (0,3 мл) последовательно добавляли 2,4 мл 0,07 N раствора серной и 0,3 мл 10%-го раствора фосфорновольфрамовой кислот. К дважды отмытому, растворенному в 3,0 мл бидистиллированной воды осадку добавляли 1 мл 0,85%-ного водного раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК), растворенной в 25 мл уксусной кислоты с добавлением 5 мл H_2O . Цветная реакция протекает в герметически закрытых пробирках при температуре $96^\circ C$ в течение 60 мин. После их охлаждения в воде в течение 5 мин определяли оптическую плотность отцентрифугированного супернатанта на спектрофотометре PV 1251C (Солар, Беларусь) при длинах волн 532 нм и 580 нм.

Концентрацию ТБКРС рассчитывали по формуле: $TBKPC = (E_{532} - E_{580}) / 0,156 \times K$, где E – экстинкция при соответствующих длинах волн,

V_1 – объем раствора ТБК;

V_2 – объем исследуемого образца;

K – коэффициент разведения образца ГМ (147,7).

Расчет осуществляли с использованием коэффициента поглощения для образующегося продукта $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ и выражали в наномоль на грамм белка (грамм ткани).

При измерении концентрации GSH к 1 мл 15%-ного гомогената ГМ добавляли 0,2 мл 25%-ной трихлоруксусной кислоты, встряхивали и центрифугировали при 5000 об/мин. в течение пяти мин. К полученному супернатанту (0,2 мл) добавляли 1,2 мл 0,5 M фосфатного буфера (pH – 7,8) и 50 мкл реактива Элмана. Концентрацию GSH рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) путем определения оптической плотности исследуемых образцов при $\lambda = 412$ нм на спектрофотометре PV 1251C.

Концентрацию TSH устанавливали следующим образом. Добавляли 30 мкл 3%-ного раствора натриевой соли додецилсульфата к 60 мкл гомогената головного мозга, отбирали 25 мкл полученной смеси и соединяли с 1,2 мл 0,5 M фосфатного буфера (pH – 7,8) и 50 мкл реактива Элмана, через 10 мин. инкубации при комнатной температуре определяли оптическую плотность на спектрофотометре PV 1251C при $\lambda = 412$ нм с учетом коэффициента молярной экстинкции. Коэффициент молярной экстинкции при определении содержания TSH составляет $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для измерения активности глутатионпероксидазы к 0,8 мл Трис-HCl буфера (pH – 7,25), содержащего 0,012 M азида натрия, 0,001 M этилендиаминтетрауксусной кислоты и 4,8 mM GSH, добавляли 0,1 мл гомогената головного мозга и 20 mM трет-бутилгидропероксида, инкубировали 10 мин. при температуре $37^\circ C$. Реакцию останавливали, присоединяя 0,02 мл раствора 25%-ной трихлоруксусной кислоты; для получения нулевой точки аналогичную процедуру проводили сразу после введения трет-бутилгидропероксида. Пробы центрифугировали (5000 об/мин., 5 мин.), к 1 мл фосфатного буфера (pH – 7,8) добавляли 30 мкл полученного супернатанта и 30 мкл реактива Элмана, измеряли оптическую плотность при $\lambda = 412$ нм и $\lambda = 700$ нм [6].

Результаты и обсуждение

В результате исследований получены количественные непрерывные данные. Так как в эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, анализ проводили

Группы	SH, ммоль/л	GSH, ммоль/л	ГП, ммоль GSH/мин.хл	ТБКРС, ммоль/л
Контроль	5,5 (5,4; 5,6)	4,6 (4,4; 4,8)	70 (70; 72)	19,9 (13,8; 22,7)
ТИГМ 1 час	1,0 (1,0; 1,1) *	1,1 (1,0; 1,2) *	0 (0; 0) *	12,3 (11,7; 14,1)
ТИГМ 1 сутки	0,7 (0,6; 0,7) *+	0,5 (0,2; 0,7) *+	0 (0; 0) *	5,9 (2,1; 10,9) *

Таблица 1. Показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса ГМ крыс с тотальной церебральной ишемией, Me(LQ;UQ)
Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контрольной группой, *+ – p<0,05 по сравнению с 1-часовой ТИГМ

методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при p<0,05 (тест Крускал-Уоллиса с поправкой Бонферони) [4].

Базовый прооксидантно-антиоксидантный статус коры головного мозга характеризовался параметрами, установленными в контрольной группе (табл. 1).

По сравнению с контрольной в группе ТИГМ продолжительностью 1 час отмечали статистически значимое уменьшение показателей неферментативных механизмов защиты – общих SH-групп белков и глутатиона на 82 (79; 87)%, p<0,05, концентрации GSH – на 75 (71; 81)%, p<0,05, а также нулевую активность глутатионпероксидазы, что указывает на несостоятельность антиоксидантных механизмов. Содержание ТБКРС не изменялось, так как для его наработки необходим определенный уровень оксигенации.

При 1-суточной ТИГМ, по сравнению с контрольной группой, произошло уменьшение общих SH-групп белков и глутатиона на 88 (81; 91)%, концентрации GSH на 87 (79; 92)%. Активность глутатионпероксидазы была нулевой, как и в группе ТИГМ продолжительностью 1 час, что, возможно, связано с повреждением и инактивацией фермента

активными формами кислорода. Содержание ТБКРС уменьшилось на 70 (65; 75)%, p>0,05.

В условиях 1-суточной ТИГМ отмечено более значительное, чем при 1-часовой ТИГМ, уменьшение общих SH-групп белков и глутатиона – на 34 (29; 38)%, концентрации GSH – на 55 (48; 61)% и ТБКРС – на 53 (47; 59)%, p<0,05.

Таким образом, по мере удлинения ишемического периода у крыс с ТИГМ происходит усугубление нарушений показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса – уменьшение общих SH-групп белков и глутатиона, концентрации GSH и активности глутатионпероксидазы. Снижение содержания ТБКРС связано с отсутствием притока кислорода при тотальной ишемии головного мозга.

Низкий уровень неферментативной и ферментативной защиты указывает на общее снижение функциональной активности нейронов и невозможность запуска компенсаторных функций при ТИГМ.

При изучении показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса ГМ в группе СИГМ продолжительностью 1 час по сравнению с контрольной отмечали уменьшение показателей неферментативных механизмов защиты – общих SH-групп белков и глутатиона на 56 (49; 61)%, p<0,05, концентрации GSH – на 57 (51; 63)%, p<0,05, а также повышение активности глутатионпероксидазы – на 12 (9; 18)%, p<0,05, отражающие высокую напряженность ферментативных механизмов и увеличение

Группы	SH, ммоль/л	GSH, ммоль/л	ГП, ммоль GSH/мин.хл	ТБКРС, ммоль/л
Контроль	5,5 (5,4; 5,6)	4,6 (4,4; 4,8)	70 (70; 72)	19,9 (13,8; 22,7)
СИГМ 1 час	2,4 (2,3; 2,4) *	1,94 (1,7; 2,0) *	80 (80; 82)*	29,4 (28,7; 30,5)*
СИГМ1 сутки	1,0 (0,9; 1,1) *+	1,4 (1,3; 1,5) *+	18 (12; 18)* +	35,1 (34,3; 35,8)* +

Таблица 2. Показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга крыс с субтотальной церебральной ишемией, Me (LQ; UQ)

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с группой контроля, *+ – p<0,05 по сравнению с 1-часовой СИГМ

содержания ТБКРС – на 32 (27; 38)%, являющихся маркером окислительного стресса (табл. 2).

При 1-суточной СИГМ произошло уменьшение общих SH-групп белков и глутатиона на 82 (77; 90)%, концентрации GSH – на 70 (68; 79)%. Активность глутатионпероксидазы была ниже на 74 (67; 81)%, а содержание ТБКРС – выше на 43 (37; 51)%, $p < 0,05$. Данные изменения свидетельствуют о выраженных окислительных процессах (повышение содержания МДА), причем механизмы антиоксидантной защиты (снижение SH, GSH, активности глутатионпероксидазы) выражены слабо.

В условиях 1-суточной СИГМ отмечено более значительное, чем при 1-часовой СИГМ, уменьшение общих SH-групп белков и глутатиона – на 58 (51; 64)%, концентрации GSH – на 29 (19; 35)%, $p < 0,05$. Повысилось содержание ТБКРС на 17 (11; 23)%, что указывает на большую активность окислительного стресса при продолжительности СИГМ 1 сутки.

Изменения активности глутатионпероксидазы были в данных моделях разнонаправленными: при 1-часовой СИГМ она повышалась на 12 (9; 18)% по отношению к контролю, а при 1-суточной – снижалась на 74 (67; 81)%.

При 1-часовой СИГМ, по сравнению с показателями в группе ТИГМ 1 час, содержание общих SH-групп белков и глутатиона было больше на 60 (54; 65)%, концентрации GSH – на 42 (39; 56)%. Повысилось содержание ТБКРС на 59 (51; 63)%, $p < 0,05$. По сравнению с показателями в группе ТИГМ 1 сутки при 1-суточной СИГМ содержание общих SH-групп белков и глутатиона было больше на 36 (29; 45)%, концентрации GSH – на 63 (59; 75)%. Возросло содержание МДА – на 83 (78; 91)%, $p < 0,05$. Активность глутатионпероксидазы при ТИГМ была равна нулю.

Данные изменения свидетельствуют о меньшей выраженности окислительного стресса при СИГМ, чем при ТИГМ.

Таким образом, у крыс с СИГМ при продолжительности ишемического периода 1 сутки отмечались более выраженные нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса (уменьшение общих SH-групп белков и глутатиона, концентрации GSH и увеличение содержания ТБКРС), чем при 1-часовой СИГМ. Изменения активности глутатионпероксидазы были разнонаправленными – при 1-часовой СИГМ ее активность повышалась, а при 1-суточной – снижалась, что отражает усугубление дефицита антиоксидантных механизмов при данном способе моделирования церебральной ишемии. ■

■ **Summary.** The formation of reactive oxygen species is important in the life of the cells of the whole organism, including the brain. However, an excess of their production can lead to membrane damage, accumulation of products of lipid, protein and nucleic acid oxidation (aldehydes, ketones), deficiency of reduced pyridine nucleotides and phospholipids of mitochondrial membranes, and then to electrolyte imbalance, swelling of mitochondria, uncoupling of oxidation and phosphorylation processes, and death of neurons during ischemia. Damage to mitochondrial DNA unprotected by histones leads to inhibition of the synthesis of electron carrier proteins. In connection with the above, the study of oxidative stress, the activity of the antioxidant system is important. In the study, the parameters of respiration of mitochondria of rat brain homogenates with its total and subtotal ischemia were studied. It was found that in rats with subtotal ischemia, with the duration of the ischemic period of 1 day, there were more pronounced disorders of the prooxidant-antioxidant balance than with a 1-hour subtotal. Changes in the activity of glutathione peroxidase were multidirectional: with 1-hour subtotal ischemia, its activity increased, and with 1-day ischemia, it decreased, which reflects the aggravation of the deficiency of antioxidant mechanisms in this method of modeling cerebral ischemia.

■ **Keywords:** oxidative stress, cerebral ischemia, neurons.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-05-75-78>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга // Биомедицина. 2018. №2. С. 59–71.
2. Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга // Оренбургский медицинский вестник. 2021. №2. С. 29–36.
3. А.А. Бутин. Закономерности изменений сосудисто-капиллярной сети коры большого мозга в ответ на острую церебральную ишемию // Омский научный вестник. 2004. №26. С. 46–57.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М, 2003.
5. Семченко В.В. Постановочная энцефалопатия. – Омск, 1999.
6. Барковский Е.В. [и др.]. Современные проблемы биохимии: методы исследований. – Минск, 2013.
7. Adipose oxidative stress and protein carbonylation / A.K. Hauck [et al.] // J. Biol. Chem. 2019. V. 294, №4. P. 1083–1088. doi:10.1074/jbc.R118.003214.
8. J.A. Clemens. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants // Free Radic. Biol. Med. 2000. №28. P. 1526–1531.
9. Q. Gao. Oxidative Stress and Autophagy // Adv Exp Med Biol. 2019. V.1206. P. 179–198. doi:10.1007/978–981–15–0602–4_9.
10. R. Li, S. Guo, S. Lee. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2010. V.30. P. 1874–1882.
11. Oxidative / Nitrosative Stress and Preeclampsia / Taysi S. [et al.] // Mini Rev Med Chem. 2019. V.19, №3. P. 178–193. doi:10.2174/1389557518666181015151350.
12. Oxidative stress and aging / A.D. Romano [et al.] // J. Nephrol. 2010. V.15. P. 29–33.
13. Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies / H. Su [et al.] // Adv Exp Med Biol. 2019. V.1165. P. 585–604. doi:10.1007/978–981–13–8871–2_29.
14. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases / R. Bissinger [et al.] // FEBS J. 2019. V.286, №5. P. 826–854.
15. Relationship of Oxidative Stress as a Link between Diabetes Mellitus and Major Depressive Disorder / G.Z. Réus [et al.] // Oxid Med Cell Longev. 2019. №3. P. 863–970. doi:10.1155/2019/8637970.
16. The Naked Mole Rat: A Unique Example of Positive Oxidative Stress / F. Saldmann [et al.] // Oxid Med Cell Longev. 2019. P. 5258–5265.

Статья поступила в редакцию 08.12.2022 г.