

ОСОБЕННОСТИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В МОЗГЕ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ, ВЫЗВАННОГО ОСТАНОВКОЙ СИСТЕМНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ У КРЫС С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

Байбурина Г.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Россия (450000, Уфа, ул. Ленина,3), e-mail:bsmunauka@mail.ru

Цель работы – изучение особенностей процессов свободно-радикального окисления в мозге крыс с разной устойчивостью к гипоксии в длительной динамике после ишемического повреждения, вызванного остановкой системного кровообращения. Эксперимент выполнен на самцах неинбредных белых крыс, разделенных на 3 группы по устойчивости к гипоксии – высокоустойчивые, среднеустойчивые и неустойчивые. 5-минутную аноксию моделировали под общим эфирным наркозом интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца с последующей реанимацией. Период наблюдения составлял 35 дней. В гомогенатах тканей мозга определяли содержание ТБК-реагирующих продуктов, проводили хемилюминесцентный анализ с регистрацией спонтанного свечения, амплитуд быстрой и медленной вспышки, светосуммы. Установлена относительно небольшая активация этих процессов у неустойчивых к гипоксии животных, что, вероятно, вызвано быстрым истощением у них субстратов окисления, более значительными расстройствами микроциркуляции и доставки кислорода.

Ключевые слова: головной мозг, гипоксия, ишемия, реперфузия, хемилюминесценция, крысы, свободно-радикальное окисление, перекисное окисление липидов, резистентность к гипоксии

FEATURES OF OXIDATIVE STRESS IN BRAIN AFTER ISCHEMIC INJURY DUE TO THE SYSTEMIC CIRCULATION STOP IN RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

Bayburina G.A.¹

¹Bashkir State Medical University, Ufa, Russia (450000, Ufa, street Lenin, 3), e-mail: bsmunauka@mail.ru

The purpose of the article is to study the features of the processes of free radical oxidation in the brain of rats with different resistance to hypoxia in long dynamics after ischemic damage caused by stopping the systemic circulation. The experiment was performed on male noninbred albino rats, which were divided into 3 groups of resistance to hypoxia - highly resistant, and middle-resistant and non-resistant. 5-minute anoxia was simulated under general ether anesthesia by intrathoracic vascular clamping beam with subsequent heart resuscitation. The observation period lasted for 35 days. In brain tissue homogenates the content of TBA-reactive products was determined, chemiluminescent analysis was performed with the registration of spontaneous emission, the amplitudes of the fast and slow flash light sum. A relatively small activation of these processes in fragile animals to hypoxia was established, which is probably caused by the rapid depletion of their substrate oxidation, more significant disorders of microcirculation and oxygen delivery.

Keywords: brain, hypoxia, ischemia, reperfusion, chemiluminescence, rats, free radical oxidation, lipid peroxidation, resistance to hypoxia

Проблема ишемического повреждения мозговой ткани актуальна во всем мире, что объясняется широким распространением, а также высокими показателями временной нетрудоспособности и первичной инвалидизации. В настоящее время широко известно, что патологические состояния, связанные с ишемией/реперфузией, сопровождаются образованием активных форм кислорода с последующей индукцией свободно-радикальных реакций и развитием оксидативного стресса [3]. Усилению этих процессов в мозге способствуют высокая интенсивность аэробных процессов [9] и значительное содержание ионов железа [8]. Чрезмерная активация свободно-радикальных процессов, приводящих к

инициации перекисного окисления липидов в мембранах, вызывает повреждение мембранных структур, что усугубляет деструкцию нервных клеток и ведет к гибели нейронов [5].

Цель работы

Изучение особенностей процессов свободно-радикального окисления в мозге крыс с разной устойчивостью к гипоксии в длительной динамике после ишемического повреждения, вызванного остановкой системного кровообращения.

Материалы и методы

Серия экспериментов выполнена на 320 половозрелых самцах неинбредных белых крыс массой 150–180 г, содержащихся в виварии на стандартном рационе и свободном доступе к воде, после предварительного тестирования на резистентность к гипоксии [1]. По итогам тестирования все животные были разделены на 3 группы – неустойчивые (НУ), среднеустойчивые (СУ) и высокоустойчивые к гипоксии (ВУ). Группы включали по 70 опытных и 10 контрольных крыс. Через неделю после тестирования под общим эфирным наркозом моделировали 5-минутную аноксию интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца по методу [4]. Реанимация проводилась с помощью наружного массажа сердца и искусственной вентиляции легких. Контрольная группа крыс после тестирования на устойчивость к гипоксии подвергалась эфирному наркозу без моделирования аноксии. В 1-е, 3-и, 5-, 7-, 14-, 21-е, 35-е сутки после оживления проводили забой животных под эфирным наркозом. Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-рп), определяли с помощью набора реактивов «ТБК-АГАТ». С целью изучения интенсивности свободно-радикального окисления (СРО) проводили хемилюминесцентный анализ гомогенатов тканей головного мозга с использованием отечественного хемилюминометра ХЛ-003 с компьютерным обеспечением. Fe^{2+} -индуцированную хемилюминесценцию исследовали по [2]. При оценке Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции определяли спонтанное свечение (Sp), амплитуду быстрой вспышки (h), амплитуду медленной вспышки (H), светосумму (SFe^{2+}) по [7]. Статистическая обработка результатов велась с использованием непараметрических критериев Манна—Уитни для независимых выборок.

Результаты и обсуждение

До моделирования аноксии крысы с разной устойчивостью к гипоксии не имели достоверных различий показателей хемилюминесценции (ХЛ) в гомогенатах ткани мозга, за исключением амплитуды быстрой вспышки. В восстановительном периоде после аноксии при изучении ХЛ были получены следующие результаты.

Показатель Sp, характеризующий интенсивность перекисного окисления без вмешательства извне, в ткани мозга высокоустойчивых к гипоксии крыс повышался во все

сроки, в том числе значимо на 1-е (на 48%, $p=0,031$), 7-е (на 44%, $p=0,038$), 14-е (на 59%, $p=0,013$) и 35-е сутки (на 63%, $p=0,014$) восстановительного периода (рис. 1). В группе среднеустойчивых к гипоксии животных (рис. 2) значимое повышение спонтанного свечения (3-и сутки в 1,5 раза, $p=0,017$, 7-е – в 2 раза, $p=0,0004$, 14-е – в 1,5 раза, $p=0,014$, 21-е – в 1,9 раза, $p=0,0022$) сменялось тенденцией к снижению (5-е сутки до 55%, 35-е до 60%). Анализ Sp животных, неустойчивых к гипоксии, не выявил достоверных отличий показателя от контрольных значений, показав лишь тенденцию к снижению практически на всем протяжении постаноксического периода, кроме 3-х и 14-х суток (рис. 3).

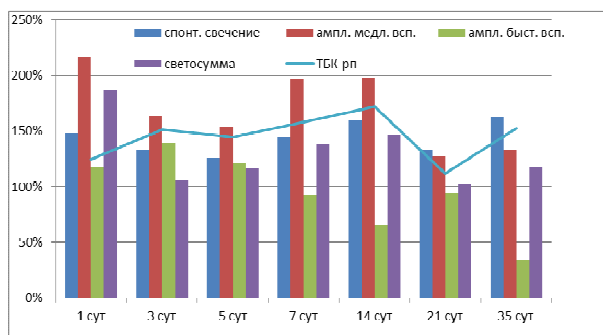


Рис. 1. Показатели свободно-радикального окисления ткани мозга крыс, высокоустойчивых к гипоксии, в восстановительном периоде после остановки системного кровообращения

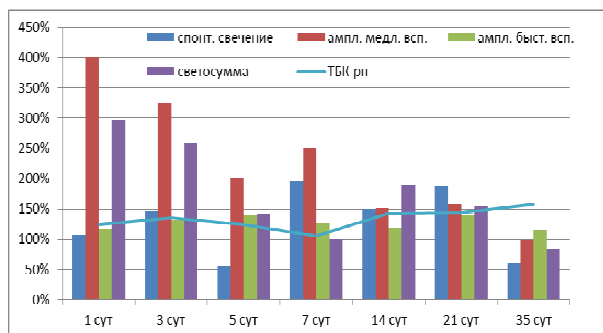


Рис. 2. Показатели свободно-радикального окисления ткани мозга крыс, среднеустойчивых к гипоксии, в восстановительном периоде после остановки системного кровообращения

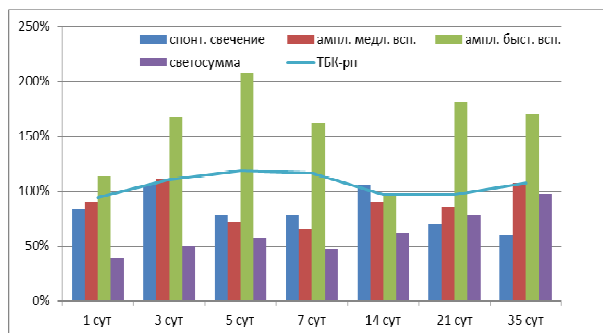


Рис. 3. Показатели свободно-радикального окисления ткани мозга крыс, неустойчивых к гипоксии, в восстановительном периоде после остановки системного кровообращения

Таким образом, высоким базальным уровнем перекисного окисления в ткани мозга в восстановительном периоде после оживления обладают крысы, высокоустойчивые и среднеустойчивые к гипоксии. У животных, неустойчивых к гипоксии, после глубокой ишемии/реперфузии отмечается тенденция к подавлению перекисных реакций, что может быть выражением более значительных расстройств микроциркуляции и доставки кислорода по сравнению с более устойчивыми к гипоксии крысами.

Показатель h (амплитуда быстрой вспышки), характеризующий содержание гидроперекисей в препарате, зависит от скорости окисления ионов двухвалентного железа и образования в среде активных форм кислорода. В восстановительном периоде после остановки системного кровообращения отмечалось накопление гидроперекисей в той или иной степени во всех экспериментальных группах. Стабильно высокими показателями амплитуды быстрой вспышки на уровне 115–140% во все сроки наблюдения при значимых различиях с контролем ($p < 0,01$) отметились СУ животные (рис. 2). У ВУ крыс после некоторого достоверного подъема в 1-е, 3-и, 5-е сутки ($p < 0,001$) наблюдался длительный спад показателя, минимумы определялись на 14-е (до 65% от контроля, $p = 0,017$) и 35-е сутки (до 34% от контроля, $p = 0,001$) (рис. 1). Наибольшее накопление гидроперекисей липидов по результатам ХЛ отмечалось в группе НУ, особенно учитывая, что в контрольной группе этих животных изучаемый показатель был ниже в сравнении с ВУ и СУ соответственно на 44% ($p = 0,031$) и 41% ($p = 0,022$). На фоне высоких параметров h на протяжении всего эксперимента наибольшие подъемы регистрировались на 5-е сутки (208%, $p = 0,0003$), 21-е (181%, $p = 0,0009$) и даже в конце наблюдения (170%, $p = 0,003$) (рис. 3). Кроме того, следует отметить, что в группе неустойчивых к гипоксии животных этот показатель ХЛ был доминирующим. Возможно, увеличение образования активных форм кислорода у этих животных связано с недостаточностью антиоксидантных систем.

Следующий исследованный нами показатель – амплитуда медленной вспышки, косвенно указывающая на содержание субстратов, способных к переоксислению, – на всем протяжении восстановительного периода в группах ВУ и СУ держался на высоких цифрах (200–400%) с показателями достоверности $p < 0,001$ практически на всех отрезках измерения. Этот показатель ХЛ был преобладающим среди прочих у животных СУ (рис. 1, 2). Практически обратная картина наблюдалась в последней экспериментальной группе (рис. 3). Вероятно, одним из последствий глубокой тотальной ишемии и последующей реперфузии является истощение субстратов окисления в мозговой ткани, что проявляется достоверным снижением показателей амплитуды медленной вспышки у НУ животных на 1-е (89% от контроля, $p = 0,041$), 7-е (66%, $p = 0,017$) и 21-е сутки (86%, $p = 0,026$). Колебания этого параметра в другие сроки были недостоверными.

Светосумма (SFe^{2+}) отражает способность биосубстрата к развитию цепных процессов окисления при инициации их ионами металлов переменной валентности. По результатам статистического анализа изменения этого показателя практически во все сроки наблюдения и во всех экспериментальных группах являются достоверными ($p < 0,05$). У высокорезистентных животных светосумма была выше контрольного уровня весь период наблюдения, имела две волны подъема с максимумами на 1-е (186%) и 14-е (147%) сутки (рис. 1). Среднерезистентные к гипоксии крысы реагировали более значительным повышением параметра, особенно в 1–3-и сутки (297 и 258% соответственно), но к концу исследования способность липидов мозговой ткани этих животных подвергаться окислению становилась ниже контрольных величин (рис. 2). Группа НУ отвечала резким снижением светосуммы до 39% в первые сутки после моделирования клинической смерти. Далее на протяжении всего эксперимента регистрировался медленный подъем показателя. К 35-м суткам SFe^{2+} приблизилась к контрольным цифрам, но не достигла их (97%, $p = 0,597$) (рис. 3).

Снижение интенсивности свечения может являться диагностическим признаком повышенного содержания средних молекул, связанного с высокой степенью эндотоксемии [6], неизбежно возникающей после глубокой ишемии/реперфузии. По данным [7] образующиеся в постреанимационном периоде средние молекулы обладают способностью связывать ионы двухвалентного железа и тем самым лишают Fe^{2+} каталитической активности, что отражается на стадиях иницирования, продолжения и разветвления цепей свободно-радикального окисления.

Определение содержания вторичных продуктов липопероксидации – соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, дало результаты, не противоречащие данным, полученным при исследовании хемилюминесценции. В фоновом содержании ТБК-рп в мозговой ткани экспериментальных животных значимых межгрупповых различий обнаружено не было. Активное накопление ТБК-рп в группе ВУ шло с первых суток восстановительного периода (рис. 1), на 3-и сутки эксперимента статистические различия стали достоверными (151%, $p = 0,023$). Максимум этого параметра определился на 14-е сутки (172%, $p = 0,0007$), но и к концу наблюдения его уровень оставался высоким (153%, $p = 0,004$). В группе СУ (рис. 2) так же, хотя и в меньшей степени, наблюдался рост ТБК-рп, приобретающий статистическую значимость в 3-и (135%, $p = 0,0101$), 14-е (142%, $p = 0,009$), 21-е (143%, $p = 0,007$) и 35-е сутки (158%, $p = 0,002$). Содержание ТБК-рп у животных, неустойчивых к гипоксии (рис. 3), в течение всего периода наблюдений колебалось возле контрольных значений и не имело статически значимых с ними различий.

Заключение

Острая остановка системного кровообращения с последующей реанимацией вызывает рост интенсивности свободно-радикальных процессов и перекисного окисления липидов в ткани мозга, имеющий свои особенности в зависимости от резистентности животных к гипоксии. Относительно небольшая активация этих процессов у неустойчивых к гипоксии животных, вероятно, вызвана быстрым истощением у них субстратов окисления, более значительными расстройствами микроциркуляции и доставки кислорода, так как реперфузия не восстанавливает метаболические капилляры микроциркуляторного русла, а также высокой степенью эндотоксемии с подавлением перекисных реакций.

Список литературы

1. Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Шибкова Д.З., Башкатов С.А. Способ определения степени устойчивости к гипобарической гипоксии мелких лабораторных животных // Заявка №20141377/14 с приоритетом от 17.09.2014
2. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. Свободные радикалы в живых системах. – М.: ВИНТИ, 1991. — 249 с.
3. Зозуля Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. – М.: Знание, 2000. – 344 с.
4. Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Телль Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1982. — № 3. – С. 78–80.
5. Лукьянова Л.Д. Сигнальная функция митохондрий при гипоксии и адаптации // Патогенез. – 2008. – Т. 6, № 3. – С. 4–12.
6. Нургалева Е.А. Патогенетические аспекты раннего и позднего эндотоксикоза в постреанимационном периоде (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2013. – 38 с.
7. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине. – Уфа, 1995. – 87 с.
8. Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim M.B. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? // J. Neurochem. – 1994. – Vol. 63, № 3. – P. 793-807.
9. Orellana J.A. Modulation of brain hemichannels and Gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration // Antioxid. Redox. Signal. – 2009. – Vol. 11, № 2. – P. 369–399.

Рецензенты:

Башкатов С.А., д.б.н., профессор, профессор кафедры генетики и фундаментальной
медицины ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет» МО РФ, г. Уфа;

Каюмова А.Ф., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО
«Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Уфа.