

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ СТУПЕНЧАТОЙ СУБТОТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС

*Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Дремза И.К.*

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,  
г. Гродно, Беларусь*

*Оксидативные реакции и образующиеся в результате их протекания вещества имеют важное значение в жизнедеятельности клеток всего организма и мозга, в частности. Известно, что кислородные радикалы выполняют функции мессенджера, отвечая за нейрональную активность, регулируют мозговой кровоток, апоптоз и другие процессы, необходимые для функционирования головного мозга.*

*Однако, избыток наработки радикалов может приводить 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 радикалами незащищенной гистонами митохондриальной ДНК приводит к ингибированию синтеза белков-переносчиков электронов [5-6].*

*В связи с вышеизложенным, изучение окислительного стресса, активности антиоксидантной системы имеет важное значение.*

**Ключевые слова:** *окислительный стресс, церебральная ишемия, нейроны.*

## OXYLATIVE STRESS IN STAGED SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS

*Bon E.I., Maksimovich N.E., Dremza I.K.*

*Grodno State Medical University,  
Grodno, Belarus*

*Oxidative reactions and the resulting substances are important in the life of cells throughout the body and the brain in particular. Oxygen radicals are known to act as messengers, being responsible for neuronal activity, regulating cerebral blood flow, apoptosis and other processes that are necessary for brain functioning.*

*However, excessive radical production can lead to membrane damage, the accumulation of oxidation products of lipids, proteins and nucleic acids (aldehydes, ketones), deficiency of reduced pyridinnucleotides and mitochondrial membrane phospholipids, and then to electrolyte imbalance, mitochondrial swelling, decoupling of oxidation and phosphorylation and neuronal death during ischemia. Radical damage to histone-unprotected mitochondrial DNA leads to inhibition of electron transfer protein synthesis [5-6].*

*In view of the above, the study of oxidative stress and the activity of the antioxidant system is important.*

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

**Цель** – оценить активность окислительного стресса у крыс со ступенчатой ишемией головного мозга.

Эксперименты выполнены на 42 самцах беспородных белых крыс массой  $260 \pm 20$  г с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей.

Выбор экспериментальных животных обусловлен сходством ангиоархитектоники головного мозга крыс и человека. Моделирование ИГМ осуществляли в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг).

Ступенчатую субтотальную ИГМ (ССИГМ) осуществляли путем последовательной перевязки обеих ОСА с интервалом 7 суток (подгруппа 1), 3-е суток (подгруппа 2) или 1 сутки (подгруппа 3). Взятие материала осуществляли через 1 час после перевязки второй ОСА в каждой из подгрупп. Контрольную группу составили ложно оперированные крысы аналогичных пола и веса.

**Метод изучения** прооксидантно-антиоксидантного состояния головного мозга. Для определения прооксидантно-антиоксидантного состояния головного мозга в его гомогенатах (20% 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 активности глутатионпероксидазы.

ТБКРС возникают в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода, служит маркером активности ПОЛ и окислительного стресса.

Для определения содержания ТБКРС к исследуемому образцу 10%-го гомогената головного мозга (0,3 мл) последовательно добавляли 2,4 мл 0,07 N раствора серной и 0,3 мл 10%-го раствора фосфорновольфрамной кислот. К дважды отмытому, растворенному в 3,0 мл бидистиллированной воды осадку, добавляли 1 мл 0,85%-го 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 минут. После их охлаждения в воде в течение 5 минут определяли оптическую плотность отцентрифугированного супернатанта на спектрофотометре РV 1251С (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 головного мозга (147,7).

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

При измерении концентрации GSH к 1 мл 15%-го гомогената головного мозга добавляли 0,2 мл 25% трихлоруксусной кислоты, встряхивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение пяти минут. К полученному супернатанту (0,2 мл) добавляли 1,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 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  $\lambda = 412 \text{ нм}$  на спектрофотометре PV 1251С.

Определение концентрации TSH осуществляли следующим образом. Добавляли 30 мкл 3%-го раствора натриевой соли додецилсульфата к 60 мкл гомогената головного мозга, отбирали 25 мкл полученной смеси и соединяли с 1,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,8) и 50 мкл реактива Элмана, через 10 мин инкубации при комнатной температуре определяли оптическую плотность на спектрофотометре PV 1251С при  $\lambda = 412 \text{ нм}$  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-НСI буфера (рН 7,25), содержащего 0,012 М азиды натрия, 0,001М этилендиаминтетрауксусной кислоты и 4,8 мМ GSH, добавляли 0,1 мл 0,1 мл гомогената головного мозга и 20 мМ трет-бутилгидропероксида, инкубировали 10 минут при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали путем добавления 0,02 мл раствора 25% 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 (рН 7,8) добавляли 30 мкл полученного супернатанта и 30 мкл реактива Элмана, измеряли оптическую плотность при  $\lambda = 412 \text{ нм}$  и  $\lambda = 700 \text{ нм}$ .

Для предотвращения систематической ошибки измерений образцы головного мозга от сравниваемых контрольной и опытных групп животных изучали в одинаковых условиях.

В результате исследований получены количественные непрерывные данные. Так как в эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, анализ проводили 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 Крускаллы-Уоллиса с поправкой Бонферони).

При изучении прооксидантно-антиоксидантного баланса головного

мозга крыс со ступенчатой церебральной ишемией были получены следующие данные.

По сравнению с показателями в группе «контроль», в 1-й подгруппе ССИГМ с интервалом между перевязками обеих общих сонных артерий 7 суток, происходило уменьшение содержания общих SH-групп белков и глутатиона на 8(4;12)%,  $p < 0,05$ , концентрации GSH на 20(17;28)%,  $p < 0,05$ , а также увеличение активности глутатионпероксидазы – на 5(3;9)%,  $p < 0,05$ . Содержание продукта ПОЛ ТБКРС при этом увеличилось на 23(18;29) %  $p < 0,05$  (таблица 1).

**Таблица 1.**  
**Показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга крыс со ступенчатой субтотальной церебральной ишемией, Me(LQ;UQ).**

Группы		SH, ммоль/л	GSH, ммоль/л	ГП, ммоль GSH/ мин.×л	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)
ССИГМ	1 пг (7суток)	5,1(5,1;5,1) *	3,6(3,6;3,8) *	74(74;75) *	25,5(24,8;26,0) *
	2 пг (3суток)	3,8(3,7;4,0) **	3,1(3,0;3,2) **	76(76;77) **	27,8(23,8;30,6) *
	3 пг (1сутки)	2,9(2,8;3,1) ** **#	2,0(1,9;2,1) ** **#	77(77;79) **	29,5(28,9;30,5) *

Примечания

\* –  $p < 0,05$  – по сравнению с группой контроль, + –  $p < 0,05$  по сравнению с 1-й подгруппой ССИГМ.

# –  $p < 0,05$  – по сравнению со 2-й подгруппой ССИГМ, ССИГМ – ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга, пг – подгруппа, ГП – глутатионпероксидаза, ТБКРС – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, GSH – восстановленный глутатион.

Во 2-й подгруппе ССИГМ с интервалом между перевязками 3 суток, по сравнению с группой «контроль», отмечалось уменьшение содержания общих SH-групп белков и глутатиона на 30(25;37)%,  $p < 0,05$ , концентрации GSH на 31(27;38)%,  $p < 0,05$ , а также увеличение активности глутатионпероксидазы – на 8(5;13)%,  $p < 0,05$ . Содержание ТБКРС при этом возросло на 29(23;37)%  $p < 0,05$ .

Во 2-й подгруппе ССИГМ с интервалом между перевязками 3 суток, по сравнению с показателями в 1-й подгруппе (интервал между перевязками ОСА 7 суток), отмечалось уменьшение содержания общих SH-групп белков и глутатиона на 26(21;31) %,  $p < 0,05$ , концентрации GSH на 14(9;18)%,  $p < 0,05$ , а также увеличение активности глутатионпероксидазы – на 3(1;6)%,  $p < 0,05$ .

В 3-й подгруппе ССИГМ с минимальным интервалом между перевязками обеих ОСА 1 сутки, по сравнению с группой «контроль»,

происходило уменьшение содержания общих SH-групп белков и глутатиона на 46(35;52)%,  $p < 0,05$ , концентрации GSH на 57(49;65)%,  $p < 0,05$ , а также увеличение активности глутатионпероксидазы – на 9(4;15)%,  $p < 0,05$ . Содержания ТБКРС возросло на 31(26;39)%,  $p < 0,05$ .

В 3-й подгруппе ССИГМ (интервал между перевязками ОСА 1 сутки), по сравнению с показателями в 1-й подгруппе, содержание общих SH-групп белков и глутатиона было меньше на 42(36;49)%,  $p < 0,05$ , концентрация GSH – на 46(39;51)%,  $p < 0,05$ , а активность глутатионпероксидазы – больше на 4(2;7)%,  $p < 0,05$ , а по сравнению со 2-й подгруппой, происходило уменьшение содержания общих SH-групп белков и концентрации GSH – на 22(18;29)%,  $p < 0,05$  и на 38(31;43)%,  $p < 0,05$ , соответственно. Активность глутатионпероксидазы не изменялась ( $p > 0,05$ ).

При ступенчатой ишемии головного мозга с перевязкой обеих общих сонных артерий с интервалом 7 суток, при которой гистологические изменения были выражены в наименьшей степени, изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса были незначительными. Отмечалось отсутствие подавления антиоксидантной защиты головного мозга и рост содержания нейроглобина, как проявления активации компенсаторных механизмов: повышение эффективности процессов утилизации кислорода и субстратов окисления и доставки их к митохондриям нейронов вследствие эффектов нейроглобина, увеличение синтеза нуклеиновых кислот и белков, транспорта  $O_2$  и субстратов обмена веществ, доминирование активности анаболических процессов над катаболическими [6,67,68], что уменьшает выраженность окислительного стресса.

Таким образом, наибольшие нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга наблюдались в 3-й подгруппе ССИГМ с минимальным интервалом между перевязками ОСА 1 сутки, что свидетельствует о наиболее высокой активности окислительного стресса.

### Литература

1. Chen, H. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia / H. Chen, D. Sun // *Neurol. Res.* – 2005. – V. 27, N 3. – P. 280–286.
2. Максимович, Н. Е. Головной мозг крысы и его реакция на ишемию: монография / Н. Е. Максимович, Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин. – Гродно: ГрГМУ, 2020. – С. 240.
3. Clemens, J. A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants / J. A. Clemens // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – V. 28. – P. 1526–1531.
4. Réus, G. Z. Relationship of Oxidative Stress as a Link between Diabetes Mellitus and Major Depressive Disorder / G. Z. Réus [et al.] // *Oxid Med Cell Longev* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/8637970/>. – Дата доступа: 20.01.2022. DOI:10.1155/2019/8637970.
5. Su, H. Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies / H. Su [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – V. 1165. – P. 585–60