

УДК 616.831-005.4:577]:616-092

*В.О.Куровська, І.Р.Тимофійчук***ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ГІПОКАМПІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUZІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ТА УВЕДЕННЯ L-АРГІНІНУ**Кафедра фізіології (зав. – проф. С.С.Ткачук)
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Резюме. Ішемія впродовж 20 хв спричиняє наростання продуктів перекисного окиснення ліпідів та активацію антиоксидантних ферментів у всіх полях гіпокампа щурів. 1- та 24-годинна реперфузія зумовлює подальше збільшення первинних та вторинних продуктів деградації ліпідів та зниження активності антиоксидантної системи. Уведення L-аргініну суттєво не вплинуло на досліджувані показники в інтактних тварин та за

умов ішемії, де отримані результати були подібними даним у відповідних дослідних групах без L-аргініну. За умов 1- та 24-годинної реперфузії на фоні введення L-аргініну відмічається пригнічення антиоксидантних ферментів, однак наростання продуктів перекисного окиснення ліпідів не спостерігається.

Ключові слова: окиснювальний стрес, ішемія, реперфузія, гіпокамп, L-аргінін.

Вступ. Окиснювальний стрес – один з основних патогенетичних чинників, що спричиняє ушкодження нейронів за умов ішемії-реперфузії головного мозку. Відповідно одним із напрямів терапевтичного лікування є введення речовин, що володіють антиоксидантними властивостями. Встановлено також, що окиснювальний стрес є залежним від оксиду азоту (NO) [6], причому інгібітор синтази NO сприяє збільшенню зони ушкодження мозкової тканини [5]. Подальші дослідження довели, що введення донора оксиду азоту L-аргініну має нейропротективний ефект в експерименті з оклюзією середніх мозкових артерій та подальшою реперфузією у щурів [7]. Вважається, що такий вплив L-аргініну має бути дозозалежним. Інші дослідники вводили нітрит натрію, враховуючи, що NO вивільняється з нітритів під впливом ацидозу чи гіпоксії [4]. Вони також відмітили, що адекватна доза нітриту зменшувала окиснювальний стрес в ішемічному мозку. Отже, ці дослідження є перспективними стосовно ролі та механізму впливу оксиду азоту на перебіг та можливість пригнічення оксидативного стресу головного мозку.

Мета дослідження. Дослідити вплив донора оксиду азоту L-аргініну на стан перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантні ферменти в полях CA₁, CA₂, CA₃ гіпокампа щурів за умов неповної глобальної ішемії головного мозку та подальшої реперфузії.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на білих безпородних самцях щурів, масою 130-150 г, які знаходилися в умовах віварію на стандартному вигодовуванні. Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Дослідні тварини розподілені на 8 груп: 1-у групу склали контрольні тварини; 2-у – тварини, яким моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом накладання затискачів на загальні сонні артерії на 20 хвилин; 3-ю – тварини, які після 20-хвилинної ішемії підлягали реперфузії на 1 годину; 4-у – тварини, які після

20-хвилинної ішемії підлягали реперфузії на 24 години; 5-у – тварини, яким вводили амінокислоту L-аргінін (виробництво «Synex Pharma», Китай) внутрішньовенно, з розрахунку 150мг/кг; 6-у – тварини, які після введення L-аргініну підлягали 20-хвилинній ішемії; 7-у – тварини, яким вводили L-аргінін, піддавали 20-хвилинній ішемії з подальшою реперфузією 1 годину; 8-у – тварини, яким вводили L-аргінін, піддавали 20-хвилинній ішемії з подальшою реперфузією 24 години. Кожна група налічувала 10 тварин. Декапітацію проводили під ефірним наркозом. На холоді забирали головний мозок, який одразу поміщали в рідкий азот, виділяли та забирали поля гіпокампа (CA₁, CA₂, CA₃), згідно з атласом стереотаксичних координат мозку щурів [1]. Наважки зважували та гомогенізували в охолоджену Трис-НСІ буфері (рН – 7,4). Оцінку стану окисного стресу проводили за визначенням вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – малонного альдегіду (МА) та дієнових кон'югатів (ДК), а також за станом ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО), каталази (КТ) згідно із сучасними методиками біохімічних досліджень [3]. Статистичну обробку результатів проводили після створення бази даних у системі Microsoft Excel та за програмою «BioStat» з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Отримані результати наведені в таблицях 1 та 2.

За умов 20-хвилинної ішемії спостерігається зростання дієнових кон'югатів у всіх полях гіпокампа: у CA₁ – 2, 11 разів, CA₂ – 1,6 разів, CA₃ – 1,9 разів; за умов введення L-аргініну: у CA₁ – 2,39 разів, CA₂ – 2,1 разів, CA₃ – 2,68 разів. Малонний альдегід зростає в CA₁ – 1,46 разів, CA₂ – 1,38 разів, у CA₃ – 1,3 разів; за умов введення L-аргініну: в CA₁ – 1,7 разів, CA₂ – 1,4 разів, CA₃ – 1,45 разів. Активність супероксиддисмутази зростає в полях CA₁, CA₂, CA₃ у 2,69, 2,1, 2,32 разів відповідно та за умов введення L-аргініну: у 2,8, 2,4, 2,7 разів відповідно. Глутатіонпероксидаза зростає у CA₁ в 1,61 разів, у CA₂ – 1,3 разів, у CA₃ –

Таблиця 1

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів у полях гіпокампа щурів за умов ішемії-реперфузії головного мозку (M+m, n=10)

CA ₁					
Контроль	0,58±0,008	2,48±0,79	52,9±9,0	7,89±0,81	1,26±0,022
Ішемія 20 хв	0,85±0,005 p<0,001	5,24±0,93 p<0,05	142,7±7,08 p<0,001	8,26±0,41	2,04±0,025 p<0,05
Реперфузія 1год	1,44±0,01 p<0,001	8,89±0,21 p<0,001	109,2±8,21 p<0,001 p' <lt;0,05< td=""> <td>8,54±0,61</td> <td>1,24±0,038</td> </lt;0,05<>	8,54±0,61	1,24±0,038
Реперфузія 24год	2,48±0,08 p<0,001	11,24±0,44 p<0,001	44,3±5,28	7,98±0,31	1,46±0,041 p<0,05
CA ₂					
Контроль	0,5±0,004	2,32±0,34	26,0±2,41	3,32±0,91	0,51±0,006
Ішемія 20 хв	0,69±0,001	3,75±0,45	54,7±3,08 p<0,05	2,98±0,08	0,68±0,005
Реперфузія 1год	0,86±0,012 p<0,05	7,12±0,99 p<0,001	41,5±4,48 p<0,05 p' <lt;0,05< td=""> <td>3,01±0,032</td> <td>0,59±0,003</td> </lt;0,05<>	3,01±0,032	0,59±0,003
Реперфузія 24год	1,2±0,08 p<0,001	9,2±0,46 p<0,001	23,7±2,45	2,78±0,04	0,46±0,001
CA ₃					
Контроль	0,66±0,004	1,15±0,014	31,9±2,91	9,91±1,33	0,89±0,007
Ішемія 20 хв	0,87±0,001	2,23±0,012	74,2±9,48 p<0,05	10,01±0,98	1,21±0,008 p<0,05
Реперфузія 1год	1,54±0,03 p<0,001	3,76±0,041 p<0,001	52,8±6,7 p<0,05 p' <lt;0,001< td=""> <td>9,48±0,44</td> <td>1,11±0,002</td> </lt;0,001<>	9,48±0,44	1,11±0,002
Реперфузія 24год	2,10±0,11 p<0,001	4,78±0,1 p<0,001	24,31±4,45	9,52±0,25	0,98±0,007

Примітка. p – вірогідність змін порівняно з показниками в контрольних тварин; p' – вірогідність змін порівняно з показниками в ішемічних тварин

1,35 рази та за умов уведення L-аргініну в 2,28, 1,76, 1,91 рази відповідно. Достовірного збільшення активності каталази не спостерігається, тільки в полі CA₁ за умов уведення L-аргініну було підвищення її в 1,23 рази. Отже, ішемічне втручання зумовило активацію ферментів антиоксидантного захисту, особливо супероксиддисмутазу та збільшення продуктів перекисного окиснення ліпідів. Це свідчить про мобілізацію системи антиоксидантного захисту, спрямовану на подолання оксидативного стресу. Відмічено, що експресія СОД та ГПО нейропротективна і в умовах ішемії призводить до зменшення некротичної та апоптичної загибелі нейронів [8].

Реперфузія впродовж 1 години призвела до накопичення продуктів ПОЛ. Так, дієнові кон'югати зросли в полях CA₁, CA₂, CA₃ у 3,58, 3,92, 3,26 рази відповідно та за умов уведення L-аргініну в 3,1 2,5, 2,8 рази відповідно порівняно з контролем. Показники малонового альдегіду зростають у полях CA₁, CA₂, CA₃ у 2,48, 1,72, 2,3 рази відповідно, та за умов уведення L-аргініну у 2,17, 1,8, 1,85 рази відповідно. Порівняно з ішемією активність антиоксидантних ферментів зни-

жується, однак величини не досягають контрольних значень. Так, СОД зменшується у CA₁ в 1,31 рази, CA₂ – 1,4 рази, CA₃ – 1,3 рази та за умов уведення L-аргініну: CA₁ – 1,7 рази, CA₂ – 1,42 рази, CA₃ – 1,7 рази. Тобто, за умов 1-годинної реперфузії окиснювальний стрес наростає, антиоксидантні ферменти стають уразливими до дії вільних радикалів [2], активність їх падає. Уведення екзогенних супероксиддисмутазу та глутатіонпероксидази не спричинило позитивних результатів в експерименті з моделюванням глобальної ішемії-реперфузії головного мозку [8].

За умов 24-годинної реперфузії показники дієнових кон'югатів зростають у полях CA₁, CA₂, CA₃ у 4,53, 3,96, 4,15 рази відповідно щодо контролю. Однак за умов уведення L-аргініну такого зростання не спостерігається, і щодо контролю збільшення складає 3,3, 2,7, 2,8 рази. Малоновий альдегід щодо контролю зростає у 3,62, 2,4, 3,1 рази в CA₁, CA₂, CA₃ відповідно, а за умов уведення L-аргініну зростання складає 2,2, 2,2, 2,3 рази. Отже, за умов уведення L-аргініну наростання продуктів перекисного окиснення ліпідів є меншим. Активність СОД падає нижче контроль-

Таблиця 2

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів у полях гіпокампа шурів за умов ішемії-реперфузії головного мозку та уведенні L-аргініну (M+m, n=10)

Група спостереження	МА (нмоль/мг білка)	ДК (нмоль/мг білка)	СОД (од/хв·мг білка)	КТ (мкмоль/ хв·мг білка)	ГПО (нмоль G-SH/ хв·мг білка)
CA ₁					
Контроль	0,45±0,007	2,64±0,009	50,03±6,73	8,01±0,03	1,32±0,03
Ішемія 20 хв	0,78±0,005 p<0,001	6,31±0,075 p<0,001	141,8±4,05 P<0,001	9,91±1,01	3,01±0,07 p<0,05
Реперфузія 1год	0,98±0,001 p<0,001	8,18±0,035 p<0,001	82,5±5,47 p<0,001 p'<0,001	6,32±1,07 p<0,05	1,45±0,05
Реперфузія 24год	0,99±0,003 p<0,001	8,82±0,097 p<0,001	34,05±4,8 p<0,001	6,48±0,73 p<0,05	1,28±0,05 p<0,05
CA ₂					
Контроль	0,48±0,003	2,45±0,037	25,41±3,38	4,45±0,03	0,75±0,08
Ішемія 20 хв	0,68±0,002 p<0,05	5,24±0,028 p<0,001	62,1±4,12 P<0,001	4,77±0,38	0,32±0,03
Реперфузія 1год	0,89±0,007 p<0,001	6,21±0,035 p<0,001	43,6±3,85 p<0,001 p'<0,05	3,58±0,92	1,21±0,07 p<0,005
Реперфузія 24год	1,07±0,004 p<0,001	6,65±0,049 p<0,001	21,34±5,35	4,01±0,74	0,97±0,08
CA ₃					
Контроль	0,77±0,004	1,25±0,012	28,9±3,45	9,09±1,48	1,05±0,07
Ішемія 20 хв	1,12±0,021 p<0,001	3,36±0,032 p<0,05	78,4±5,94 p<0,001	9,09±1,76	2,01±0,03 p<0,05
Реперфузія 1год	1,43±0,015 p<0,001	3,51±0,045 p<0,05	45,6±4,45 p<0,001 p'<0,001	8,37±1,35	1,75±0,01
Реперфузія 24год	1,78±0,006 p<0,001	3,68±0,041 p<0,001	27,32±6,58	8,96±1,95	1,35±0,01

Примітка. p – вірогідність змін порівняно з показниками в контрольних тварин; p' – вірогідність змін порівняно з показниками в ішемічних тварин

них значень: у CA₁ – 1,19 раза, у CA₂ – 1,09 раза, у CA₃ – 1,08 раза та за умов уведення L-аргініну: у CA₁ – 1,46 раза, у CA₂ – 1,19 раза, у CA₃ – 1,15 раза. Глутатіонпероксидаза і каталаза на рівні контрольних значень.

Очевидно, даний ефект L-аргініну не пов'язаний з активністю антиоксидантних ферментів, оскільки наявне зниження їх у період реперфузії в усіх дослідних групах. Як зазначалось, амінокислота L-аргінін – це донор оксиду азоту і через вплив останнього реалізується ефект L-аргініну. Встановлено, що NO має подвійну дію на ПОЛ. Негативну – через взаємодію із супероксиданіоном і утворення пероксинітриду, і позитивну, оскільки NO може прямо інгібувати ПОЛ, перехоплюючи алкогольні та пероксильні радикальні інтермедіати, таким чином обриваючи ланцюги реакцій [8].

Отримані нами дані вказують на можливість застосування L-аргініну з протекторною метою

за умов ішемії-реперфузії головного мозку, як альтернативу антиоксидантним ферментам.

Висновки

1. Ішемія впродовж 20 хв зумовлює активацію ферментів антиоксидантного захисту та збільшення продуктів перекисного окиснення ліпідів.

2. Реперфузія впродовж 1 год пригнічує антиоксидантні ферменти та зумовлює наростання продуктів перекисного окиснення ліпідів.

3. Реперфузія впродовж 24 год зберігає тенденцію до наростання продуктів перекисного окиснення ліпідів, активність антиоксидантних ферментів є нижче контрольних значень.

4. У періоди реперфузії в дослідних групах, де вводили амінокислоту L-аргінін, поруч із пригніченням ферментів антиоксидантів наростання продуктів перекисного окиснення ліпідів не спостерігається.

Перспектива подальших досліджень. Доцільним є вивчення нейропротекторного механізму впливу L-аргініну через реалізацію ефектів оксиду азоту на процеси ПОЛ та можливі інші шляхи.

Література

1. Буданцев А.Ю. Стереотаксический атлас мозга крыс (фронтальные сечения) / А.Ю.Буданцев. – Пушино: Аналитическая микроскопия. – 2002. – С. 205.
2. Лук'янчук В.Д. Окисний гомеостаз мозку при ішемії і досвід експериментальної фармакотерапії / В.Д.Лук'янчук, Л.В.Савченкова, О.Ю.Бібік // Ж. Акад. мед. наук України. – 2001. – № 4. – С. 647-659.
3. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / [В.М.Магальяс, А.О.Міхеев, Ю.С.Роговий та ін.]. – Чернівці, 2001. – 42 с.
4. Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury / K.-H.Jung, K.Chu, S.-Y.Ko [et al.] // Stroke. – 2006. – № 37. – P. 2744-2750.
5. Effects of nitric oxide synthase inhibition on brain infarction in SOD-transgenic mice following transient focal cerebral ischemia / H.Kamii, S.Mikarva, K.Murakami [et al.] // J. of cerebral blood flow and metabolism. – 1996. – № 16. – P. 1153-1157.
6. Maksimovich N. The degree of oxidative stress in the rat brain during ischemia and reperfusion in conditions of correction of the L-arginine-NO-system / N.Maksimovich, V.Zinchuk, P.Maslakov // Neuroscience and behavioral physiology. – 2006. – № 4. – P. 373-378.
7. L-arginine in focal cerebral ischemia / C.Temiz, K.Tun, H.C.Ugur [et al.] // Neurological research. – 2003. – № 5. – P. 465-470.
8. Warner P.S. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain / P.S.Warner, H.Sheng, I.Batini-Haberle // J. of experimental biology. – 2004. – № 6. – P. 3221-3231.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ГИПОКАМПЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ВВЕДЕНИЯ L-АРГИНИНА

В.О.Куровская, И.Р.Тимофийчук

Резюме. Ишемия продолжительностью 20 мин способствует нарастанию продуктов перекисного окисления липидов и активации антиоксидантных ферментов в полях гипокампа крыс. 1- и 24-часовая реперфузия обуславливает дальнейшее увеличение первичных и вторичных продуктов деградации липидов и снижение активности антиоксидантной системы. Введение L-аргинина существенно не повлияло на исследуемые показатели у интактных животных и под влиянием ишемии, где полученные данные были подобными данным в соответствующих исследуемых группах без L-аргинина. В условиях 1- и 24-часовой реперфузии на фоне введения L-аргинина отмечается угнетение антиоксидантных ферментов, хотя нарастания продуктов перекисного окисления липидов не наблюдается.

Ключевые слова: окислительный стресс, ишемия, реперфузия, гипокамп, L-аргинин.

LIPID PEROXIDATION IN THE RAT HIPPOCAMP UNDER THE CONDITIONS OF CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION AND ADMINISTRATION OF L-ARGININE

V.O.Kurovs'ka, I.R.Tymofiihuk

Abstract. Ischemia, lasting 20 minutes, causes an augmentation of lipid peroxidation products and an activation of antioxidant enzymes in all the fields of the rat hippocamp. One and 24 hour reperfusion stipulates further increase of primary and secondary products of lipid degradation and a decrease of the activity of the antioxidant system. The introduction of L-arginine did not influence essentially on the indices under study in intact animals and under the ischemic conditions where the obtained findings were similar to the findings in the corresponding experimental groups without L-arginine. An inhibition of the antioxidant enzymes is noted under the conditions of 1- and 24-hour reperfusion with a concomitant introduction of L-arginine, however, an augmentation of lipid peroxidation products is not observed.

Key words: oxidative stress, ischemia, reperfusion, hippocampus, L-arginine.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.С.Роговий

Buk. Med. Herald. – 2010. – Vol. 14, № 1 (53). – P. 124-127

Надійшла до редакції 26.08.2009 року