

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 616.831-008.811.1-0.53.31-07

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В МОЗГЕ КРОЛИКОВ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, М. Л. ДЕМЧУК, Л. В. ПОРЯДИНА, В. Г. ВОРОНОВ

Институт нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко РАМН, 125047 Москва, ул. Фадеева, д. 5.
Факс: (095) 975-22-28

Хемилюминесцентным методом исследовано содержание свободных радикалов в мозге кроликов, перенесших черепно-мозговую травму, а также уровень малонового диальдегида спектрофотометрически. Установлено, что количество свободно-радикальных продуктов в полушариях, стволе мозга и мозжечке травмированных животных достоверно увеличено и коррелирует с уровнем МДА.

Полученные данные позволяют более широко использовать метод хемилюминесценции при исследовании процессов перекисного окисления липидов в условиях патологии нервной системы.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, черепномозговая травма, свободные радикалы, хемилюминесценция.

Введение. К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих об активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) при различных церебральных патологиях, таких как эмоционально-болевой стресс [1], ишемические и гипоксические нарушения [2, 3], болезни Паркинсона и Альцгеймера [4], субарахноидальные кровоизлияния [5], неврозы [6] и др.

Это объясняется тем, что ткань мозга особенно подвержена окислительному стрессу из-за ее существенного липидного компонента, в состав которого входит ряд полиненасыщенных жирных кислот [7].

При этом образуются перекисные соединения липидов, которые, являясь токсическими продуктами, вызывают последующие нарушения обмена веществ мозга [8].

Как известно, инициаторами ПОЛ являются активные кислородные частицы. Из них образуются гидропероксильные, алкоксильные и другие органические радикалы, что в дальнейшем приводит к образованию вторичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, оснований Шиффа, которые обычно и определяют при изучении ПОЛ в различных биологических субстратах.

Так как нами было ранее показано, что при черепно-мозговой травме (ЧМТ) в мозге кроликов достоверно повышается уровень всех вторичных продуктов ПОЛ [9], в данном исследовании нам казалось важным определить уровень радикалообразования в ткани мозга при ЧМТ и сопоставить его с концентрацией одного из наиболее часто определяемых продуктов ПОЛ малонового диальдегида (МДА). Решение этого вопроса тем более оправдано, что в ряде случаев было показано уменьшение как количества вторичных продуктов ПОЛ, так и уровня свободных радикалов при введении больным животным антиоксидантов [10].

Методика. Объектом исследования служили кролики-самцы породы шиншилла массой 2,5 — 3 кг.

ЧМТ средней степени тяжести наносили стандартным методом [11], посредством свободного падения груза массой 500 г с высоты 2,2 м на голову фиксированного в станке животного. Кроликов забивали воздушной эмболией через сутки после нанесения травмы. Извлечение мозга и все последующие операции проводили при +4°C. Ткань полушария, ствола и мозжечка гомогенизировали отдельно в фосфатном буфере (0,02 М KH_2PO_4 - 0,1 М KCl , pH 7,2) при соотношении ткань мозга:буфер — 1:4.

МДА определяли в гомогенатах спектрофотометрически методом Okhawa [12] на спектрофотометре СФ-46. Об уровне радикалообразования судили по хемилюминесценции (ХЛ) супернатанта, полученного центрифугированием исходного гомогената мозга при 1000 g в течение 2 минут. При этом определяли амплитуду вспышки и светосумму хемилюминесценции, индуцированной системой гидроперекись трет-бутила (ГПТБ) FeSO_4 [13], на хемилюминометре ХЛМ-3. Измерения проводили следующим образом: в кювету хемилюминометра помещали 300 мкл фосфатного буфера, 500 мкл 2М раствора $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и 25 мкл 1%-ного раствора ГПТБ, регистрировали фоновое свечение и впрыскивали через крышку прибора 200 мкл супернатанта. При этом в течение 20 сек. развивалась интенсивная вспышка ХЛ.

Таблица

Уровень радикалообразования и МДА в мозге животных, перенесших ЧМТ ($M \pm m$)

максимум ХЛ (мВ)			
	полушарие	ствол	мозжечок
норма	7,3±0,7 n=6	10,4±0,9 n=6	8,7±0,7 n=5
травма	15,8±1,1 n=6 p<0,001	24,2±3,3 n=6 p<0<0,001	17,1±0,25 n=6 p<0,01
светосумма (мВ x сек)			
	полушарие	ствол	мозжечок
норма	79,6±2,5 n=6	98,8±9,5 n=6	80,6±4,7 n=5
травма	155,3±19,7 n=6 p<0,01	206,1±34,8 n=6 p<0,02	153,6±23,1 n=6 p<0,01
МДА (нмоль/100 мг сырого веса мозга)			
	полушарие	ствол	мозжечок
норма	6,49±0,82 n=6	6,29±0,46 n=5	5,52±0,42 n=6
травма	9,9±0,8 n=7 p<0,001	13,32±0,86 n=7 p<0,001	11,4±1,2 n=7 p<0,001

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента, корреляционный анализ проводили с помощью программы Statgraph 3.0. В работе использованы ГПТБ, синтезированную в НИИ Органической химии им.

Н. Д. Зелинского, 2-тиобарбитуровую кислоту фирмы Serva (ФРГ) и реактивы квалификации ХЧ отечественного производства.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены средние значения величин амплитуды вспышки и светосуммы ХЛ в гомогенате разных отделов мозга животных, перенесших ЧМТ. Как видно из представленных данных, при ЧМТ во всех отделах мозга кроликов наблюдается достоверное повышение уровня радикалообразования, являющегося первой стадией развития цепных реакций свободнорадикального окисления липидов.

В тех же гомогенатах мозга нами обнаружено возрастание МДА во всех исследованных отделах мозга травмированных животных по сравнению с контролем, что свидетельствует о накоплении вторичных продуктов ПОЛ в ткани мозга кроликов, перенесших ЧМТ.

Далее представляло интерес выяснить, существует ли корреляционная зависимость между уровнем радикалообразования и содержанием МДА. Корреляционный анализ данных о содержании радикальных продуктов (амплитуда и светосумма вспышки ХЛ) с уровнем МДА выявил высокую положительную корреляцию между амплитудой ХЛ ($r=0.94$), светосуммой ХЛ ($r=0.96$) и уровнем МДА.

Необходимо отметить, что удобство, простота и воспроизводимость хемилюминесцентного метода и наличие тесной корреляционной связи между уровнем ХЛ и концентрацией вторичных продуктов ПОЛ позволяет рекомендовать этот метод для исследования свободнорадикальных процессов в гомогенатах различных тканей живого организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуляева Н. В. Перекисное окисление липидов в мозге при адаптации к стрессу. Автореф. дисс. докт. биол. наук. -М., 1989.
2. Davis R. J., Bulkey G. B., Taystman R. G. // Fed. Proc. -1987. -Vol. 46, -P. 2816 — 2830.
3. Piantadosi C. A., Tatro L., and Zhang J. // Free rad. biol. med., -1995. -Vol. 18. -No3. -P. 603 — 609.
4. Adams J. D., Odunze I. N. // Free rad. biol. med., -1991. -Vol. 10. -P. 161 — 169.
5. Sakaki S., Ohta S., Nakamura H., Takeda S. // J. Cerebr. Blood Flow Metab. -1988. -Vol. 8. -P. 1 — 8.
6. Александровский Ю. В., Поюровский Л. Г., Незнамов Г. Г. // Неврозы и перекисное окисление липидов. -М.: Наука, 1991. -С. 144.
7. Кренс Е. М. // Липиды клеточных мембран. -Л., 1981.
8. Siesjo B. K., Agardh C. D., Bengtsson F. // Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. -1989. -Vol. 1. -P. 165 — 211.
9. Демчук М. Л., Левченко Л. И., Промыслов М. Ш. // Нейрохимия. -1990. No1. -С. 103 — 105.
10. Ерин А. Н., Гуляева Н. В., Никушкин Е. В. // Бюлл. эксп. биол. мед. -1994. -No10. -С. 243 — 249.
11. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. // Вестн. АМН СССР. -1971. -No11. -С. 28 — 31.
12. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. -1979. -Vol. 95. -P. 351 — 358.
13. Величковский Б. Т., Владимиров Ю. А., Коркина Л. Г. и др. // Хемилюминесцентный анализ в профилактической и клинической медицине. -Метод. рекомендации. МЗ РСФСР. -М., 1990.
14. Gutteridge J. M. C. // Free Rad. Res. Commun. -1986. -Vol.1. -P. 351 — 358.

APPLICATION OF THE CHEMILUMINESCENT ASSAY FOR THE INVESTIGATION
OF FREE RADICAL LIPID PEROXIDATION IN RAT BRAIN AFTER THE
CRANIOCEREBRAL TRAUMA

Promyslov M. Sh., Demchuk M. L., Poryadina L. V., Voronov V. G.

Burdenko Neurosurgical Institute, Fadeev str., 5. 125047 Moscow, Russia.

FAX: 7 (095) 975-22-28

The method of chemiluminescence was applied for the determination of free radicals content in rabbit brain after the experimental craniocerebral trauma. The level of malone dialdehyde was measured spectrophotometrically. The quantity of free radical products in hemispheres, brain stem and cerebellum of rabbits with traumatic injury was shown to be significantly increased and correlated with MDA level.

Data obtained indicate that the chemiluminescent technique can be useful for the investigation of lipid peroxidation in brain pathology.

Key Words: lipid peroxidation, cranio-cerebral injury, free radicals, chemiluminescence.