

УДК 615.099:577.151.042:599.323.4-148.11

С.У. Крижана, А.Л. Березнякова  
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

### ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ПОРФІРИНОПАТІЇ

Вивчено порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу в головному мозку в умовах експериментальної порфіринопатії. Показано, що дана патологія характеризується активацією вільнорадикальних процесів (збільшенням кількості ТБК-активних продуктів, підвищенням інтенсивності індукованого ПОЛ) та пригніченням антиоксидантної системи (зменшенням глутатіонпероксидазної і каталазної активності).

**Ключові слова:** порфіринопатія, головний мозок, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

*Робота виконана у рамках науково-дослідної програми Національного фармацевтичного університету “Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці (№ держ. реєстр. 010300909418).*

Процеси вільнорадикального окиснення у нормі перебігають в усіх органах та тканинах організму, зокрема у головному мозку, однак їх надмірна активація є універсальним механізмом деградації біомембран при багатьох патологічних станах [3]. У відповідь на вплив пошкоджувального чинника відбувається порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу, яке у подальшому може набути генералізованої форми [1, 8]. Особливу увагу привертає група захворювань з загальною назвою порфірії, при яких порушення біосинтезу гему та як наслідок, накопичення в організмі порфіринів та/або їх попередників приводить до порушення діяльності і центральної нервової системи. Стан прооксидантно-антиоксидантного балансу головного мозку в умовах порушеного порфіринового обміну представляє цікавість для науковців та клініцистів з точки зору визначення ступеню його пошкодження та медикаментозної корекції в подальшому.

**Метою** роботи була оцінка ступеню порушення інтенсивності ПОЛ і активності ферментів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) головного мозку щурів при експериментальному порушенні порфіринового обміну.

**Матеріал та методи дослідження.** Експерименти проведені на 40 нелінійних білих щурах масою 180-200г. Порушення порфіринового обміну викликали підшкірними ін'єкціями бензолу [11, 13] дозами із розрахунку 0,1 мл на 1 кг маси тварини 2 рази на тиждень протягом 3 місяців. На момент початку експерименту вік тварин складав 6 місяців. До контрольної групи ввійшли щури тієї ж статі та віку, які отримували аналогічну дієту. В останній день експерименту тварин декапітували під наркозом, готували 25 % гомогенат головного мозку на 50 mM tris-HCl буфері, що містив 50 mM NaCl (pH-7,4). У гомогенатах головного мозку вивчали базальний рівень ТБК-активних продуктів згідно з методом [1], показник виражали у нмоль МДА/мг білка. Також досліджували інтенсивність індукованого ПОЛ. Для цього гомогенат інкубували 10 хв у середовищі (pH-7,4), що містило 50 mM tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,25 mM аскорбату й 12 mM FeSO<sub>4</sub>. Швидкість накопичення ТБК-активних продуктів вивчали згідно з методом [2], виражали у нмоль МДА/мг білка за 1 хв. Активність каталази досліджували за зменшенням вмісту перекису водню при довжині хвилі 240 нм [4], виражали у мкмоль Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> білка за 1 хв. Активність глутатіонпероксидази визначали за зниженням вмісту відновленого глутатіону, виражали у мкмоль GSSG/мг білка за 1 хв [5, 11]. Вміст білка у гомогенаті головного мозку оцінювали за допомогою біуретового методу. Інтенсивність поглинання зразків визначали на спектрофотометрі "Сагу-50" (Австралія). Усі маніпуляції на тваринах проводили під етамінал-натрієвим наркозом (60 мг/кг підшкірно), згідно з Міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986) [7]. Статистичну обробку даних проводили з використанням параметричних методів статистики за t-критерієм Ст'юденту [2, 12].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Отримані нами дані свідчать про те, що гематоенцефалічний бар'єр в умовах експериментальної порфіринопатії легко пропускає порфірини та/або їх попередники. Це можна пояснити тим, що вони гарно сорбуються тканиною мозку за рахунок високого вмісту води та інтенсивною васкуляризацією. Окрім того, оксидативний стрес є важливим механізмом реалізації їх деструктивних ефектів на головний мозок [8, 14, 15], що приводило до порушення інтенсивності ПОЛ та АОЗ тканини. Прооксидантний статус клітин головного мозку оцінювали за базальним рівнем ТБК-активних продуктів та інтенсивністю неферментативного Fe<sup>2+</sup>-аскорбатіндукованого ПОЛ. Базальний рівень ТБК-активних продуктів у експериментальній групі складав (547,8±36,7), у контрольній - (332,9±12,8) нмоль МДА/мг білка. Швидкість накопичення ТБК-активних продуктів у експериментальній і контрольній групах становила (117,6±8,3) і (36,1 ±5,5) нмоль МДА/мг білка за 1 хв відповідно (p<0,05) (табл. 1).

Таким чином, спостерігалось збільшення базального рівня в 1,7 раза та швидкості накопичення ТБК-активних продуктів у 3,3 раза, що свідчить про стимуляцію процесів ПОЛ (p<0,05). Стан системи АОЗ головного мозку щурів з порфіринопатією оцінювали за зміною активності її основних ферментативних складників. Так, глутатіонпероксидазна активність у головному мозку тварин експериментальної групи

складала (0,188±0,012), контрольної - (0,309±0,014) мкмоль GSSG/мг білка за 1 хв. Разом із тим, каталазна активність була на рівні (11,7±0,5) і (16,3±0,7) мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мг білка за 1 хв відповідно (табл. 2).

Таблиця 1

**Базальний рівень ТБК-активних продуктів та інтенсивність індукованого ПОЛ у гомогенаті кори головного мозку тварин при експериментальному порушенні порфіринового обміну**

	ТБК-активні продукти нмоль МДА/мг білка	Інтенсивність індукованого ПОЛ нмоль МДА/мг білка за 1 хв
Контрольна група	332,9±12,8	36,1 ±5,5
Експериментальна група з порфіринопатією	547,8±36,7*	117,6±8,3*

Примітка: \* - p<0,05 порівняно з контрольною групою.

Таблиця 2

**Глутатіонпероксидазна та каталазна активність у гомогенаті кори головного мозку тварин при експериментальному порушенні порфіринового обміну**

	глутатіонпероксидазна активність мкмоль GSSG/мг білка за 1 хв.	каталазна активність мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг білка за 1 хв
Контрольна група	0,309±0,014	16,3±0,7
Експериментальна група з порфіринопатією	0,188±0,012*	11,7±0,5*

Примітка: \* - p<0,05 порівняно з контрольною групою

Наведені результати показали зниження глутатіонпероксидазної активності в 1,6 раза, каталазної - в 1,4 раза, що свідчить про пригнічення роботи системи АОЗ на тлі порушеного порфіринового обміну.

В усіх живих системах існують прооксидантні чинники та механізми, стримування яких відбувається за рахунок системи АОЗ. Пояснити причини розвитку оксидативного стресу при порфіринопатії можна особливостями метаболізму порфіринів та/або їх попередників. Їх тривале надходження у кору головного мозку у високих дозах значна кількість руйнується за участю мітросомальної системи, що окиснює токсичні речовини. Окиснення за цим шляхом відбувається під впливом цитохрому Р-450, при цьому як побічні продукти утворюються активні форми кисню, що залучаються до ланцюгових реакцій ПОЛ [6]. Відомо, що система цитохрому Р-450 представлена як у сірих так і білих структурах головного мозку [8, 9]. Отже, цитохром Р-450-залежний шлях генерації вільних радикалів у клітинах головного мозку при порфіринопатії можна враховувати як один з шляхів розвитку оксидативного стресу. Незалежно від шляху окиснення порфіринів та/або їх попередників утворюються активні форми кисню (АФК) [6]. Розвиток перекисних процесів викликає руйнування молекул антиоксидантів, зміну фосфоліпідного складу мембран, внаслідок чого порушується їх структурно-функціональна цілісність. Підвищення проникності мембран клітинних органел призводить до вивільнення гідролітичних ферментів, порушення іонного гомеостазу, зниження мембранного потенціалу, що, у свою чергу, супроводжується роз'єднанням окиснювального фосфорилування у мітохондріях, і зменшує енергетичне забезпечення клітини [3, 16]. Ці події підсилюються тим, що різноманітні продукти ПОЛ здатні ковалентно взаємодіяти з окремими функціональними групами білків, і зумовлює їх полімеризацію та пошкодження амінокислотних залишків. Глутатіонпероксидаза, локалізована у цитоплазмі, ядрі та мітохондріях, є гомотетрамером, містить в активному центрі 4 атоми селену, що пов'язані з цистеїном, основна функція ферменту - нейтралізація перекису водню і гідроперекисів ліпідів [5]. Каталаза - гемовмісний білок, що локалізується у пероксисомах та діє у сполученій системі із супероксиддисмутазою, нейтралізує H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Надмолекулярна структура стабілізується 4 молекулами НАДФН [9]. Таким чином, обидва ферменти мають досить складну структуру, зміна якої при взаємодії з продуктами ПОЛ може призводити до порушення їх активності. Зв'язуючись з ДНК та білками ядерного хроматину, активні форми кисню також впливають на їх структуру і функцію, що зумовлює порушення зчитування генетичної інформації та проявляється зниженням активності синтетичних процесів у клітині. Таким чином, отримані нами дані свідчать про те, що вивчені нами ферменти приймають активну участь у розвитку оксидативного стресу в корі головного мозку експериментальних тварин як за рахунок посиленого утворення активних форм кисню, так і блокування функціональної активності ферментів системи АОЗ, зокрема глутатіонпероксидази та каталази. Окрім того, можливим є пригнічення біосинтезу вказаних ферментів. Лікування уражень головного мозку токсичного генезу є складним завданням. Це зумовлено низкою причин, однією з яких можна назвати відсутність лікарських препаратів, що активно впливають на патогенез захворювання, зокрема на розвиток оксидативного стресу і проникливість гематоенцефалічного бар'єру. Поява ліків, здатних пригнічувати перекисні процеси в корі головного мозку, може стати ефективним методом зменшення тяжкості пошкодження головного мозку в цілому, і зокрема, при порфіринопатії. Отримані у нашій роботі результати показали підвищення інтенсивності процесів ПОЛ у корі головного мозку щурів при порфіринопатії, що супроводжується зниженням активності ферментів системи АОЗ - глутатіонпероксидази та каталази. Ці дані свідчать про розвиток вільнорадикального пошкодження головного мозку - одного з головних механізмів реалізації деструктивного впливу накопичених в організмі порфіринів та/або їх попередників та, ймовірно, можуть вказувати на тяжкість перебігу процесу.

**Висновок**

Експериментальне накопичення в організмі порфіринів та/або їх попередників у щурів супроводжується порушенням прооксидантно-антиоксидантного балансу в корі головного мозку, що проявляється активацією процесів ПОЛ (збільшенням кількості ТБК-активних продуктів, підвищенням

інтенсивності індукованого ПОЛ) та пригніченням антиоксидантної системи (зменшенням глутатіонпероксидазної і каталазної активності).

*Перспективи подальших досліджень у даному напрямку. Отримані у роботі дані можуть бути використані для розробки та оцінки ефективності нових методів лікування уражень головного мозку токсичного генезу на етапі їх доклінічних і клінічних випробувань.*

**Література**

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Жибина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. - С.Пб.: ИКС "Фолиант", 2000. - 200 с.
2. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. – СПб.: ФОЛИАНТ, 2003. – 429с.
3. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. - К.: Морион, 2004. -160 с.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.
5. Кулиньский В.И., Колесниченко Л.С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Усп. совр. биол. - 1993. -113, № 1. -С. 107-122.
6. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях // Бюллетень СО РАМН. -2005.- 118, №4. -С. 7-12.
7. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М.Кожемякін, О.С.Хромов, М.А.Філоненко, Г.А.Сайфетдінова. – К.:Авіцена, 2002. – 156с.
8. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А.Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин. - М.: Фирма «Слово», 2006. - 556 с.
9. Падалко В.И., Севастьянова Т.В. Клинические аспекты функционирования системы цитохрома Р-450 микросом печени // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: Медицина. - 2005. - № 705, Вип. 11. - С. 110-21.
10. Петренко А.Ю., Ковалев Г.А., Грищенко В.И. Внутривенное введение эмбриональных нервных клеток крысам с хроническим отравлением бензолом // Проблемы криобиологии. - 2005. - 15, №1. -С. 71-78.
11. Руководство по клинической лабораторной диагностике. Ч.3. Клиническая биохимия: Учеб. пособие / М.А.Базарнова, З.П.Гетге, Л.И.Кальнова и др.; Под ред. проф. М.А.Базарновой, проф. В.Т.Морозовой. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Вища шк., 2000. – 319 с.
12. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии // М., 2000. – С.192.
13. Ткачишин В.С. Професійні захворювання опорно-рухового апарату та прилеглих структур, спричинені впливом ряду шкідливих виробничих факторів. Лекція 6. Физические, химические и биологические факторы в процессе производственной деятельности.// Український ревматологічний журнал. – 2006. – № 2(24) С.26-29.
14. Calabrese V., Scapagnini G., Latteri S. et al. Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in different brain regions in the rat: protection by acetyl carnitine // Int. J. Tissue React. - 2002. - 24, № 3. - P. 97-104.
15. Cullinan S.B., Zhang D., Hannink M. et al. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival // Mol. Cell. Biol. - 2003. - Vol.23. - P.7198-7209.
16. Kirkman H.N., Ferraris M.R., Gaetani G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH: kinetics and stoichiometry // J. Biol. Chem. - 1999. - 274, №20. -P. 13908-13914.

**Резюме**

**ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОРФИРИНОПАТИИ**  
**Крыжная С.И., Березнякова А.И.**

Изучено нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в головном мозге в условиях экспериментальной порфиринопатии. Показано, что данная патология характеризуется активацией свободнорадикальных процессов (увеличению количества ТБК-активных продуктов, повышению интенсивности индуцированного ПОЛ) и угнетению антиоксидантной системы (уменьшению глутатионпероксидазной и каталазной активности).

**Ключевые слова:** порфиринопатия, головной мозг, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

Стаття надійшла 15.05.2011 р.

**PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM OF RATS BRAIN DUE TO EXPERIMENTAL PORFIRINOPATHIA**  
**Kryzhnaya S.I., Bereznyakova A.I.**

It is studied the disturbance of prooxidant -antioxidant balance in the brain under the influence of experimental porphyrinopathia. It is shown that this pathology is characterized by the activation of free-radical processes (to increase in the amount of TBA-active products, to an increase the intensity of induced LPO) and to the inhibition of antioxidant system (decrease glutathionperoxidase and catalase activity) .

**Key words:** porphyrinopathia, the brain, lipid peroxidation, antioxidant system.