

УДК 612.766.1; 612.015.3

**ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ
В ГОМОГЕНАТЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ
ВВЕДЕНИЯ АЛЛОГЕННЫХ МОНОНУКЛЕАРОВ**

Бахтиярова Ш.К., Капышева У.Н., Жаксымов Б.И., Баимбетова А.К., Крганбаева А.С.

РГП «Институт физиологии человека и животных» КН МОН РК, Алматы, e-mail: unzira@inbox.ru

В период 30–60 сут после трансплантации аллогенной мононуклеарной фракции костного аспирата в мозговой ткани экспериментальных животных наблюдается усиление активности перекисного окисления липидов – уровень ДК и оксида азота растет. Только на 90 сут после введения МНК во всех возрастных группах отмечалась тенденция к нормализации уровня ДК, МДА и NOx, что отражает снижение активности ПОЛ в тканях мозга крыс. Отмеченное нами повышение уровня суммарных продуктов NOx у контрольных и опытных 24-мес. старых животных можно объяснить возрастным снижением возможностей антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная активность, мононуклеары, трансплантация

**LIPID PEROXIDATION IN HOMOGENATES OF NERVE TISSUE AT DIFFERENT
TIMES AFTER THE INTRODUCTION ALLOGENEIC MONONUCLEARS**

Bakhtiyarova S.K., Kapysheva U.N., Zhaksymov B.I., Baimbetova A.K., Korganbaeva A.S.

Institute of Human and Animal Physiology, Almaty, e-mail: unzira@inbox.ru

In the period 30–60 days after transplantation of allogeneic bone marrow aspirate mononuclear fraction in the brain of experimental animals observed increased activity of lipid peroxidation – the level of DC and nitric oxide increases. Only 90 days after the introduction of MNCs in all age groups showed a trend toward normalization of DC, MDA and NOx, which reflects the decrease in the activity of lipid peroxidation in rat brain tissue. The marked increase in our total product in the control of NOx and experienced 24-months. older animals can be attributed to age-related decrease antioxidant defense capacity.

Keywords: lipid peroxidation, antioxidant activity, mononuclear cells transplantation

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) является важной причиной накопления клеточных дефектов. Основным субстратом ПОЛ являются полиненасыщенные цепи жирных кислот, входящих в состав клеточных мембран, а также липопротеинов. Их атака кислородными радикалами приводит к образованию гидрофобных радикалов, взаимодействующих друг с другом [1–3]. В результате такого взаимодействия в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению. Активация перекисного окисления характерна для многих заболеваний: дистрофии мышц (болезнь Дюшена), болезни Паркинсона, при которых ПОЛ разрушает нервные клетки в стволовой части мозга, при атеросклерозе, развитии опухолей [4]. Поиск веществ регулирующих активность ПОЛ является одной из актуальных научных проблем.

Влияние аллогенных мононуклеарных клеток, введенных в вену, на активность ПОЛ мозговой ткани фактически не изучено, тем более в разные сроки после трансплантации, хотя именно этот аспект проблемы представляет огромный практический интерес.

Материалы и методы исследования

После декапитации у животных брали кровь и производили забор головного мозга. Для предотвращения свертывания крови в качестве антикоагулянта вводили гепарин (500 МЕ/кг внутривенно). Для получения гомогената нервной ткани, мозг гомогенизировали – рН 7.4 на холоде с помощью гомогенизатора типа «Ultra Turrax». После этого гомогенат центрифугировали при 6000 g [5]. В полученных супернатантах определяли уровень перекисного окисления липидов по содержанию промежуточных (диеновые конъюгаты) и конечных (малоновый диальдегид) [6]. Содержание оксида азота NO определяли по методу [7]. Согласно методике на первом этапе NO₃⁻ восстанавливали до NO₂⁻ используя металлический кадмий. Затем, используя реактив Грисса, проводили спектрофотометрию при длине волн 546 нм. Для оценки степени восстановления нитритов в нитраты строили калибровочную кривую.

Для получения мононуклеарной фракции использовали аспират костного мозга бедренной кости 3х-мес крыс. Костный мозг заготавливали, аспирируя клетки из полостей трубчатых костей. Дальнейшее очищение состояло из удаления фрагментов кости фильтрацией и изоляции лейкоцитарного слоя (buffy-coat) после центрифугирования. Выделение мононуклеарной фракции из донорского костного аспирата проводили по методу Bouum [8].

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel и изменения параметров с учетом непарного критерия Фишера – Стьюдента и считали достоверными при p ≤ 0,05. Также использовали непараметрические

тесты Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего, p – уровень значимости: $p \leq 0,05$ при сравнении всех групп с контрольной группой.

Результаты исследований и их обсуждение

После трансплантации МНК определяли уровень малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и оксида азота на 30, 60 и 90 сут наблюдений. Данные по этим показателям показаны в таблице.

У интактных 12-мес животных контрольной группы МДА составлял $8,24 \pm 1,69$ нмоль/мг белка мозговой ткани, у 18-мес. статистически значимо МДА возрастал до уровня $8,56 \pm 0,15$, у 24-мес – до $9,03 \pm 1,38$ нмоль/мг белка ткани. Повышение МДА у крыс с 12-мес. возраста до 24-мес возраста составило 110% (таблица).

После введения МНК во всех группах крыс, независимо от возраста, на всем периоде наблюдений наблюдали снижение уровня МДА в мозговой ткани на 30–48%, более выраженное у молодых 12-мес. животных, по сравнению с контрольными данными (таблица).

После трансплантации МНК содержание ДК в гомогенате головного мозга опытных крыс увеличилось в среднем за весь период наблюдений на 15% у 12-мес., на 2% – у 18-мес. и 3% – у 24-мес. крыс по отношению к контрольным данным. Такое увеличение ДК отражает тенденцию к накоплению продуктов перекисного окисления

липидов в мозговой ткани крыс после введения МНК.

Следовательно, после трансплантации аллогенных МНК уровень МДА – конечного продукта липопероксидации – в мозговой ткани снижается во всех возрастных группах на протяжении всего периода наблюдений по сравнению с контролем, на фоне незначительного увеличения промежуточного продукта ДК.

Это отражает разную скорость генерации и расхода энергии в клетках, что по мере окислительной деградации, развивающейся как компенсаторно-адаптационная реакция на стресс – введение МНК, приводит к разбалансировке уровня конечного и промежуточного продуктов окисления. Большое значение при этом играет срок исследования последствий МНК. Вероятно, что 30 и 60 сут после введения МНК отражают процесс острой фазы пероксидации.

Для окончательного выявления состояния окислительной активности мозговой ткани после введения МНК определяли уровень оксида азота NOx в гомогенате мозга. Для этого использовали спектрофотометрический метод определения. Для построения калибровочной кривой использовали 1М водный раствор NaNO_2 . Количество нитрита рассчитывали в мкмоль/л по калибровочной кривой. Полученные результаты представлены в таблице.

Уровень малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и оксида азота (NOx) в гомогенате головного мозга крыс в разные сроки после введения МНК

Показатель	Группа крыс по возрастам		
	12 мес.	18 мес.	24 мес.
	контроль		
МДА нмоль/мг белка	$8,24 \pm 1,69$	$8,56 \pm 0,15$	$9,03 \pm 1,38$
ДК нмоль/мг белка	$1,26 \pm 0,26$	$1,44 \pm 0,37$	$1,22 \pm 0,12$
NOx (мкМ) Мкмоль/л	$36,4 \pm 0,41$	$42,6 \pm 1,38$	$51,67 \pm 0,34$
	через 30 сут		
МДА нмоль/мг белка	$5,78 \pm 0,09^*$	$6,11 \pm 0,12^*$	$5,49 \pm 0,17^{**}$
ДК нмоль/мг белка	$1,52 \pm 0,24^*$	$1,57 \pm 0,43$	$1,28 \pm 0,17^{**}$
NOx (мкМ) Мкмоль/л	$46,5 \pm 1,50^*$	$50,0 \pm 2,18^*$	$56,3 \pm 2,7^{**}$
	через 60 сут		
МДА нмоль/мг белка	$4,28 \pm 0,26^{**}$	$4,78 \pm 0,12^{**}$	$4,98 \pm 0,15^{**}$
ДК нмоль/мг белка	$1,39 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,05$	$1,24 \pm 0,006$
NOx (мкМ) Мкмоль/л	$47,7 \pm 1,45^{**}$	$53,3 \pm 2,65^{**}$	$57,0 \pm 1,16^{**}$
	через 90 сут		
МДА нмоль/мг белка	$5,32 \pm 0,20^{**}$	$5,84 \pm 0,19^{**}$	$5,64 \pm 0,09^{**}$
ДК нмоль/мг белка	$1,28 \pm 0,07$	$1,46 \pm 0,13$	$1,24 \pm 0,11^{**}$
NOx (мкМ) Мкмоль/л	$47,3 \pm 2,34^{**}$	$53,0 \pm 1,21^{**}$	$53,2 \pm 1,76^{**}$

Примечание. * – $p \leq 0,01$; ** – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольными данными.

После трансплантации МНК исследования гомогената мозга показали увеличение содержания суммарных продуктов NOx, в среднем за весь период наблюдений – на 30% у молодых крыс и 25% – у зрелых животных, в то время как в мозговой ткани старых крыс уровень активности ПОЛ увеличился всего на 7-8% по отношению к контрольным данным (таблица).

Следует отметить, что старые 24-мес. животные изначально отличались повышенным уровнем продуктов NOx. После введения МНК наблюдали менее значимые изменения в накоплении суммарных продуктов оксида азота – превышение контрольных показателей составляло всего от 4 до 8%.

Таким образом, введение МНК вызвало увеличение активности ПОЛ в мозговой ткани животных разных возрастных групп. На первом этапе исследования – 30 сут после введения МНК, повышение оксида азота в мозговой ткани животных сопровождалось повышенным уровнем диеновых конъюгатов, то есть промежуточного продукта окисления липидов. Через 60 дней после введения МНК была выявлена тенденция к снижению уровня ДК и суммарных продуктов NOx во всех возрастных категориях на фоне сниженных значений конечного продукта окислительных реакций в мозговой ткани – МДА, в сравнении с контрольными данными. Спустя 90 дней после введения МНК, во всех возрастных группах животных на фоне небольшого превышения (7-8%) содержания NOx над контрольными данными, уровень ДК нор-

мализовался, а уровень МДА оставался сниженным.

Выводы

На протяжении 60 сут после введения аллогенной мнуклеарной фракции костного аспирата в мозговой ткани экспериментальных животных сохраняется высокий уровень перекисного окисления липидов. Только через 90 сут после введения МНК отмечается снижение активности ПОЛ в тканях мозга крыс.

Список литературы

1. Lankin V.Z. Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2007. – Vol. 72, № 10. – P. 1081–1090.
2. Filaire E., Rouveix M., Massart A. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running // *Eur.J.Appl. Physiol.* – 2009. – № 107(2). – P. 243–250.
3. Флеров М.А., Вьюшина А.В. Свободнорадикальное окисление липидов в гипоталамусе крыс при стрессе после введения кортизола // *Российский физиологический журнал им. И. Сеченова*. – 2011. – Т. 97, № 9. – С. 898–902.
4. Флеров М.А., Вьюшина А.В. Свободнорадикальное окисление липидов в гипоталамусе крыс при стрессе после введения кортизола // *Российский физиологический журнал им. И. Сеченова*. – 2011. – Т. 97, № 9. – С. 898–902.
5. Kolbay I.S., Seitkulova L.M. Level of total proteolytic activity in rat intestinal lymph, lymph nodes, and lymphocytes // *Acta Medica et Biologica (Japan)*. – 2002. – Vol. 50, № 3. – P. 111–116.
6. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. – М., 1975. – 89 с.
7. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. – М.: Медпрактика, 2004. – 179 с.
8. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* – 1968. – Vol. 21 – Suppl. 97. – P. 1–9.