

© В. М. МЕРЕЦЬКИЙ

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"

## Порушення функціонального стану прооксидантної і антиоксидантної систем у крові тварин при черепно-мозковій травмі на тлі експериментального цукрового діабету

V. M. MERETSKYI

SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky"

### VIOLATIONS OF THE FUNCTIONAL STATE OF PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN THE BLOOD OF ANIMALS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY ON THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL DIABETES

Досліджено стан прооксидантної і антиоксидантної систем у крові тварин при черепно-мозковій травмі, стрептозоточиновому цукровому діабеті та за умов поєднання цих патологій. Встановлено, що ЧМТ і ЦД призводять до значного збільшення концентрації первинних та вторинних продуктів ПОЛ та розладів стану АОС. ЧМТ у щурів із ЦД супроводжується більш інтенсивними процесами ліпопероксидації та виснаженням резервів антиоксидантної системи, ніж окремо при ЧМТ і ЦД, внаслідок взаємного обтяження двох процесів.

The state of prooxidant and antioxidant systems in the blood of animals with traumatic brain injury, and streptozotocin diabetes and in a combination of these pathologies were studied. It was found that traumatic brain injury and diabetes lead to a significant increase in the concentration of primary and secondary products of lipid peroxidation and disruption of antioxidant system status. Traumatic brain injury in rats with diabetes is accompanied by a more intensive process of lipid peroxidation and depletion of antioxidant system reserves, rather than separately for TBI and diabetes, due to the mutual burdening of these two processes.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій.** На сьогодні проблема черепно-мозкової травми (ЧМТ) не втрачає свого значення. Перш за все це пов'язано зі зростанням її частоти у розвинутих країнах, що супроводжується високою летальністю, незадовільними найближчими і віддаленими результатами лікування, тяжкою інвалідизацією [5, 12]. Патогенез травми запускається впливом механічних сил, порушенням перфузії і пошкодженнями, що виникають на біохімічному рівні. Результати можуть проявлятися у вигляді негайних (первинне пошкодження) і прогресуючих із часом (вторинне пошкодження) реакцій [2, 10, 11]. Вторинне пошкодження поглиблюється внаслідок біохімічних каскадів, які неминуче запускаються травмою, що ще більше погіршує клітинний метаболізм, оскільки ускладнює постачання клітин мозку киснем і нутрієнтами та призводить до несприятливого результату.

Активация вільнорадикальних процесів і розвиток "оксидантного стресу" – один із механізмів, що запускають каскад вторинних реакцій на молекулярному, клітинному, тканинному, органному і

системному рівнях, і є найбільш ранньою ознакою адаптаційних змін [7].

Усі компоненти клітинної системи тією або іншою мірою зазнають впливу пероксидного окиснення, але з найбільшою швидкістю це окиснення відбувається у ліпідних (фосфоліпідних) структурах, перш за все у ліпідному бішарі мембран. Процеси активації пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) мають особливе значення, оскільки його продукти змінюють структуру мембрани, її проникність, руйнують білки, інактивують ферменти, спричинюють порушення мікроциркуляції та інші патологічні зміни [2, 12].

Відомо, що в організмі існує антиоксидантна система (АОС), яка запобігає руйнівній дії продуктів ПОЛ на мембрани та інші структурні елементи клітин. Інтенсивне утворення вільних радикалів за умов недостатньої активності антиоксидантної системи бере участь у патогенезі значної кількості захворювань. Гіперглікемія спричинює розвиток оксидантного стресу та змінює активність ензимів системи антиоксидантного захисту, тому процеси ПОЛ значно активуються при тривалому

перебігу цукрового діабету (ЦД) і відіграють певну роль у розвитку пізніх його ускладнень [3, 4].

**Мета роботи:** дослідити вміст продуктів ПОЛ та активність АОС у крові тварин за умов експериментальної черепно-мозкової травми на тлі цукрового діабету в різні терміни після ЧМТ.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведені на 60 білих нелінійних щурах-самцях, поділених на експериментальні групи: I – інтактні тварини (контроль), II – щури, яким моделювали черепно-мозкову травму, III – щури з експериментальним цукровим діабетом, IV – щури, яким моделювали ЧМТ на тлі ЦД. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію відповідно до санітарно-гігієнічних норм та вимог GLP [6].

Експериментальний ЦД моделювали одноментним введенням стрептозотоцину (Sigma, США) в черевну порожнину в дозі 60 мг/кг (Rees D. A., Alcolado J. C., 2005; Полторак В. В., 1991). Діабетиками вважали тварин із рівнем глюкози понад 14–16 ммоль/л. Закрити черепно-мозкову травму моделювали за допомогою відомої методики [5]. Експериментальних тварин виводили з експерименту через 3 і 24 год (період гострої реакції на травму), 5 і 14 діб (період ранніх проявів) після травми [5].

Тварин виводили з експерименту в умовах тіопентало-натрієвого наркозу (40 мг/кг) шляхом тотального кровопускання із серця.

Стан ПОЛ оцінювали за вмістом у крові малнового діальдегіду (МДА) та дієнових кон'югатів

(ДК). Стан антиоксидантної системи визначали за активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази (КТ), церулоплазміну (ЦП) та рівнем SH-груп. Визначення показників проводили за стандартними методиками. Розраховували сумарну антиоксидантну активність інгібіторів вільнорадикальних реакцій – загальну антиоксидантну активність плазми крові (ЗАОА) [8] та інтегральний індекс Ф, який характеризує співвідношення прооксидантних та антиоксидантних властивостей крові.

Одержані експериментальні дані опрацьовували статистично із застосуванням критерію Стьюдента за стандартною методикою.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Як свідчать літературні дані, ЧМТ є неспецифічним патологічним процесом, у патогенезі якого оксидантний стрес відіграє важливу роль [10]. Результати нашого дослідження показали, що вже через 3 год після травми у крові спостерігається накопичення як первинних, так і вторинних продуктів ПОЛ (табл. 1). Встановлено, що ЧМТ достовірно ( $p < 0,001$ ) підвищує вміст МДА та ДК на 104,9 і 132,5 % через 3 і 24 год відповідно. Вказані явища розвиваються на тлі порушеної активності процесів АОС. Стан ферментативної АОС оцінювався за вмістом каталази, СОД та церулоплазміну. Період гострої реакції після травми характеризується різноспрямованими змінами вказаних ферментів. Так, спостерігалось вірогідне ( $p < 0,001$ ) зниження активності каталази на 28,2 % через 3 год і тільки

**Таблиця 1. Вміст показників ПОЛ та АОС у крові тварин із черепно-мозковою травмою на тлі цукрового діабету (період гострої реакції), М $\pm$ m**

Показник	Контроль (n=10)	ЧМТ, час після травми (n=10)		ЦД (n=10)	ЧМТ і ЦД, час після травми (n=10)	
		3 год	24 год		3 год	24 год
МДА, мкмоль/л	2,43 $\pm$ 0,13	4,98 $\pm$ 0,18***	5,65 $\pm$ 0,25***	4,33 $\pm$ 0,16***	10,44 $\pm$ 0,73### <sup>^^</sup>	11,57 $\pm$ 1,02### <sup>^^</sup>
ДК, $\times 10^3$ ум. од./л	3,12 $\pm$ 0,24	6,43 $\pm$ 0,26***	6,92 $\pm$ 0,30***	5,07 $\pm$ 0,28***	11,87 $\pm$ 0,92### <sup>^^</sup>	12,68 $\pm$ 1,07### <sup>^^</sup>
SH-групи, ммоль/л	49,44 $\pm$ 2,68	37,71 $\pm$ 2,12**	36,22 $\pm$ 1,45***	39,57 $\pm$ 2,12**	32,58 $\pm$ 1,41 <sup>^</sup>	30,27 $\pm$ 1,35## <sup>^^</sup>
Каталаза, мкат/л	24,76 $\pm$ 1,05	17,79 $\pm$ 1,27***	21,97 $\pm$ 1,01	19,24 $\pm$ 0,97**	15,33 $\pm$ 0,87 <sup>^^</sup>	13,74 $\pm$ 0,85### <sup>^^</sup>
СОД, ум. од.	41,85 $\pm$ 2,45	13,83 $\pm$ 1,10***	20,73 $\pm$ 1,07***	25,61 $\pm$ 1,30***	17,72 $\pm$ 1,20 # <sup>^^</sup>	15,57 $\pm$ 1,16## <sup>^^</sup>
Церулоплазмін, мг/л	288,59 $\pm$ 6,34	356,94 $\pm$ 6,58***	329,55 $\pm$ 6,56***	198,96 $\pm$ 4,83***	207,15 $\pm$ 5,19###	210,87 $\pm$ 4,97###
ЗАОА, %	43,04 $\pm$ 2,53	51,64 $\pm$ 3,34	48,35 $\pm$ 3,23	29,52 $\pm$ 1,90***	33,02 $\pm$ 2,47###	27,89 $\pm$ 2,08###
Ф	431,15 $\pm$ 28,36	49,07 $\pm$ 5,21***	82,38 $\pm$ 6,90***	113,59 $\pm$ 7,06***	26,69 $\pm$ 2,77## <sup>^^</sup>	19,06 $\pm$ 1,87### <sup>^^</sup>

Примітки: у таблицях 1–2:

- 1) \* – достовірність змін щодо показників у контрольних тварин;
- 2) # – достовірність змін щодо показників у тварин із ЧМТ;
- 3) ^ – достовірність змін щодо показників у тварин із ЦД (\*#<sup>^</sup> –  $p < 0,05$ ; ###<sup>^^</sup> –  $p < 0,01$ ; #####<sup>^^</sup> –  $p < 0,001$ ).

на 11,3 % – через 24 год після травми щодо показників контролю. Подібна динаміка відзначалась щодо активності СОД у крові – на 67 і 50,5 % ( $p<0,001$ ) відповідно до термінів. Що стосується вмісту ЦП, слід відзначити зростання активності цього ферменту щодо показників у контрольних тварин, причому більш виражене через 3 год – на 23,7 % і на 14,2 % через 24 год ( $p<0,001$ ). Досліджувались зміни вмісту антиоксидантів-неферментів, зокрема встановлено зниження кількості SH-груп на 23,7 і 26,7 % ( $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) щодо показників контролю через 3 і 24 год відповідно.

Звертає увагу підвищення загальної антиоксидантної активності крові у тварин з ЧМТ на 20 %

через 3 год після нанесення ЧМТ і дещо менше – на 12,3 % – через 24 год відносно показників у контрольних тварин. Для більш детальної характеристики стану ПОЛ та системи АОЗ були проаналізовані показники інтегрального коефіцієнта  $\Phi$ . При цьому встановлено, що у періоді гострої реакції цей показник мав чітко виражену тенденцію до зниження у 8,8 і 5,2 раза через 3 і 24 год після травми відповідно ( $p<0,001$ ), що свідчить про дисбаланс показників ПОЛ/АОЗ.

Аналіз отриманих даних дозволив встановити, що у наступному періоді ЧМТ (періоді ранніх проявів) спостерігається зниження вмісту продуктів пероксидації ліпідів (табл. 2). Проте, незважаючи

**Таблиця 2. Вміст показників ПОЛ та АОС у крові тварин із черепно-мозковою травмою на тлі цукрового діабету (період ранніх проявів),  $M \pm m$**

Показник	Контроль (n=10)	ЧМТ, час після травми (n=10)		ЦД (n=10)	ЧМТ і ЦД, час після травми (n=10)	
		5 діб	14 діб		5 діб	14 діб
МДА, мкмоль/л	2,43±0,13	5,11±0,22***	2,91±0,14*	4,33±0,16***	11,73±1,06### ^^	8,37±0,69### ^^
ДК, $\times 10^3$ ум. од./л	3,12±0,24	6,18±0,28***	3,48±0,25	5,07±0,28***	12,80±1,22### ^^	8,96±0,71### ^^
SH-групи, ммоль/л	49,44±2,68	37,16±2,10 **	42,72±2,64	39,57±2,12 **	27,03±1,32 ##^^	27,94±1,77### ^^
Каталаза, мкат/л	24,76±1,05	22,44±1,07	23,20±1,01	19,24±0,97 **	14,41±0,95### ^^	15,73±1,01### ^
СОД, ум. од.	41,85±2,45	24,03±1,03***	36,67±2,43	25,61±1,30***	14,40±1,15### ^^	18,75±1,23### ^^
Церулоплазмін, мг/л	288,59±6,34	279,82±5,85	291,32±5,41	198,96±4,83***	146,81±4,67### ^^	163,15±4,89### ^^
ЗАОА, %	43,04±2,53	37,79±2,51	42,78±2,55	29,52±1,90***	20,64±1,10### ^^	22,46±1,52### ^^
$\Phi$	431,15±28,36	74,75±5,38***	302,35±32,97**	113,59±7,06***	18,19±1,91### ^^	37,27±4,47### ^^

на зниження, на 5-ту добу посттравматичного періоду рівень МДА і ДК залишався підвищеним, відповідно, на 110,3 і 98 % ( $p<0,001$ ) та 19,7 ( $p<0,05$ ) і 11,5 % на 14-ту добу порівняно з контролем. Вказана динаміка ПОЛ супроводжувалась зростанням активності каталази через 5 діб після ЧМТ на 26,1 % відносно цього показника у тварин на 3 год посттравматичного періоду і на 30,4 % – через 14 діб. Активність СОД у сироватці крові на 5-ту і 14-ту доби посттравматичного періоду збільшилась на 73,7 і 165,1 % порівняно з тваринами через 3 год після ЧМТ. З переходом у період ранніх проявів після травми активність ЦП знизилась на 5-ту добу посттравматичного періоду на 3 % щодо контролю і наблизилась до рівня контрольних величин через 14 діб після ЧМТ. Таким чином, показники активності ферментної АОС наближались до показників контролю і статистично вірогідно не відрізнялись від них. На 5-ту добу після травми визначалось зниження вмісту нефермента-

тивного показника АОС – SH-груп на 24,8 % відносно контролю ( $p<0,01$ ) із подальшим зростанням на 15 % на 14-ту добу експерименту.

У результаті проведеного дослідження встановлено, що показник ЗАОА був зниженим на 12,2 % щодо контролю через 5 діб після ЧМТ і практично піднявся до рівня інтактних тварин через 14 діб. Інтегральний коефіцієнт  $\Phi$  у тварин досліджуваних груп був зниженим у 4 ( $p<0,001$ ) і 1,4 ( $p<0,01$ ) раза через 5 і 14 діб відповідно.

Отримані нами дані не суперечать численним роботам, які переконливо доводять, що ЧМТ призводить до значного збільшення концентрації продуктів ПОЛ та розладів стану АОС [9]. Порушення вільнорадикальних процесів після ЧМТ відображають формування вторинного ураження мозку і проявляються адаптаційними змінами з боку системи вільнорадикального окиснення і АОС: спостерігається максимальний ріст показників ПОЛ (МДА і ДК) до 24 год після травми, зі зниженням

активації з 5-ї до 14-ї доби травматичного періоду, а також різноспрямованими змінами активності АОС (зниження вмісту SH-груп, активності каталази і СОД та зростання активності ЦП) у періоді гострої реакції та відновлення кількості SH-груп, збільшення активності каталази і СОД, зниження активності ЦП протягом періоду ранніх проявів, а саме до 14-ї доби після ЧМТ. Виходячи з отриманих результатів, виявлено вірогідне порівняно з контрольними показниками підвищення рівня ЦП у періоді гострої реакції, що здатний діяти як сироватковий антиоксидант та інгібітор вільнорадикальних реакцій. Можливо, такі зміни є компенсаторними за гострого періоду захворювання.

Експериментальний ЦД, спричинений введенням стрептозотоцину, супроводжується підвищенням вмісту первинних та вторинних продуктів ліпопероксидації. При аналізі отриманих даних встановлено збільшення вмісту ДК на 62,5 % та МДА на 78,2 % щодо показників контрольних тварин в крові ( $p < 0,001$ ). Викликана патологія супроводжується ознаками порушення з боку ферментативної АОС. Так, активність каталази, СОД і ЦП знизилась на 22,3 % ( $p < 0,01$ ), 38,8 % ( $p < 0,001$ ) і 31,1 % ( $p < 0,001$ ) відповідно. Кількість SH-груп зазнала подібних змін – зменшилась на 20 % ( $p < 0,01$ ). Виявлено також зниження ЗАОА на 31,4 % та інтегрального індексу Ф у 3,8 раза ( $p < 0,001$ ). Отримані результати збігаються з думкою дослідників, що у патогенезі ЦД 1 типу важлива роль належить активації процесів ПОЛ, а також дисбалансу між прооксидантами й антиоксидантами, що призводить до надлишку вільних радикалів і накопичення високотоксичних продуктів [1]. Останні чинять пошкоджувальну дію на ліпопротеїди, білки, ферменти і нуклеїнові кислоти. Посилення процесів пероксидації призводить до глибоких порушень спектра ліпідів та ендотелію, структурної та функціональної дестабілізації. У свою чергу, наявна нестача інсуліну за умов ЦД 1 типу знижує утилізацію ліпопероксидів. Крім цього, негативний вплив інтенсифікації процесів ПОЛ призводить до активації імунних розладів за умов ЦД 1 і може слугувати поштовхом до розвитку автоімунних реакцій та запуску механізмів автоагресії [4].

Результати нашого дослідження показали, що відтворення ЧМТ на тлі експериментального ЦД викликає прогресивне підвищення концентрації продуктів ПОЛ. Отримані показники, які характеризують інтенсивність процесів ліпопероксидації при ЧМТ, поєднаній з ЦД, статистично вірогідно перевищували вихідні показники відносно як самостійної ЧМТ, так і ЦД. Так, наприклад, при моделюванні ЧМТ на тлі ЦД кількість первинного

продукту ПОЛ ДК була більшою на 84,6, 83,2, 107,1 і 157,5 % ( $p < 0,001$ ) від рівня ДК у тварин із ЧМТ через 3, 24 год, 5 і 14 діб. Рівень МДА за умов комбінованого ураження перевищував цей показник при ізольованій ЧМТ на 109,6, 104,8, 129,5 і 214,7 % ( $p < 0,001$ ) відповідно до термінів. Активність каталази в умовах поєднаної патології була меншою від аналогічного показника при ЧМТ на 13,8, 37,5, 35,8 і 32,2 % згідно з термінами експерименту. Активність СОД у сироватці крові експериментальних тварин з ЧМТ на тлі ЦД через 3 год після травми була більшою на 28 % ( $p < 0,05$ ) від аналогічного показника при ЧМТ і меншою на 24,9 ( $p < 0,01$ ), 40 і 48,9 % ( $p < 0,001$ ), відповідно, на 24-ту год, 5-ту і 14-ту добу посттравматичного періоду. Спостерігалось пригнічення активності ЦП на 42, 36, 47,5 і 44 % ( $p < 0,001$ ) відповідно до термінів порівняно з тваринами після травми без ЦД. При комбінуванні ЧМТ із ЦД відзначено зниження вмісту антиоксидантів-неферментів за кількістю SH-груп на 13,6, 16,4, 27,3 і 34,6 % згідно з вказаними термінами посттравматичного періоду порівняно з тваринами без ЦД. Показник сумарної антиоксидантної активності ЗАОА у групах, які порівнюються, був меншим, відповідно, на 36,1, 42,3, 45,4 і 47,5 % ( $p < 0,001$ ). Інтегральний коефіцієнт Ф за умов ЧМТ на тлі ЦД був зниженим відповідно до термінів експерименту в 1,8 ( $p < 0,01$ ), 4,3, 5,9 і 8,1 раза ( $p < 0,001$ ) порівняно з тваринами після ЧМТ.

Виходячи з отриманих результатів, встановлено, що пероксидне окиснення ліпідів при ЧМТ у щурів зі стрептозотоциновим ЦД, яке є одним із ключових механізмів патогенезу і ЧМТ, і ЦД, суттєво погіршує перебіг посттравматичного патологічного процесу за основними показниками прооксидантної та антиоксидантної систем, що в результаті призводить до вторинного пошкодження тканин на системному рівні [7].

**Висновки.** 1. Після ЧМТ спостерігається максимальний ріст показників ПОЛ до 24 год після травми, зі зниженням активації з 5-ї до 14-ї доби травматичного періоду, а також різноспрямованими змінами активності АОС (зниження вмісту SH-груп, активності каталази і СОД та зростання активності ЦП) у періоді гострої реакції та відновлення кількості SH-груп, збільшення активності каталази і СОД, зниження активності ЦП до 14-ї доби після ЧМТ.

2. Стрептозотоциновий ЦД призводить до значного збільшення концентрації первинних та вторинних продуктів ПОЛ та зниження показників АОС.

3. ЧМТ у щурів із ЦД супроводжується більш інтенсивними процесами ліпопероксидації та розладами антиоксидантної системи, ніж окремо при ЧМТ і ЦД, внаслідок взаємного обтяження двох процесів.

**Перспективи подальших досліджень.** Вважаємо доцільним подальше вивчення процесів вільнорадикального окиснення за умов поєднаної дії ЧМТ та ЦД для оцінки ступеня структурних і метаболічних порушень мозку і внутрішніх органів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балаболкин М. И. Патогенез сахарного диабета / М. И. Балаболкин, И. И. Дедов // Медицинский академический журнал. – 2006. – № 3. – С. 3–15.
2. Некоторые аспекты патофизиологии травматического повреждения и регенерации спинного мозга [Электронный ресурс] / И. А. Борщенко, А. В. Басков, А. Г. Коршунов, Ф. С. Сатанова // Журнал "Вопросы нейрохирургии". – № 2. – 2000. – Режим доступа : <http://sci-rus.com/pathology/index.htm>.
3. Дедов И. И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете : пособие для врачей / И. И. Дедов. – М., 2003. – 40 с.
4. Децик О. І. Активність NO-синтаз, вміст нітрогену оксиду та процеси ліпопероксидації у шлунку та товстій кишці за умов стрептозотоциніндукованої гіперглікемії / О. І. Децик, І. С. Фоменко, О. Я. Склярів // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2011. – № 3. – С. 7–12.
5. Ельский В. Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В. Н. Ельский, С. В. Зяблицев. – Донецк : Изд-во "Новый мир", 2008. – 140 с.
6. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.
7. Зяблицев С. В. Синдром посттравматичної ендогенної інтоксикації при черепно-мозковій травмі / С. В. Зяблицев, В. М. Сельський, О. Д. Якубенко // Нейронауки: теор. клін. асп. – 2005. – Т. 1, № 1. – С. 28–34.
8. Мещишен І. Ф. Метод визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові / І. Ф. Мещишен, В. П. Пішак, В. П. Польовий // Буковинський медичний вісник. – 2007. – Т. 11, № 3. – С. 165–167.
9. Biomarkers for the Diagnosis, Prognosis, and Evaluation of Treatment Efficacy for Traumatic Brain Injury / K. Pramod Dash, Jing Zhao, Georgene Hergenroeder, N. Anthony Moore // Neurotherapeutics. – 2010. – Vol. 7, No. 1. – P. 100–114.
10. Closedhead injury in a mouse model results in molecular changes indicating inflammatory responses / C. Israelsson, Y. Wang, A. Kylberg [et al.] // J. Neurotrauma. – 2009. – № 26. – P. 1307–1314.
11. Experimental traumatic brain injury [Електронний ресурс] / Christiane Albert-Weissenberaer, Anna-Leena Siren // Experimental & Translational Stroke Medicine. – 2010. – № 2. – P. 16. – Режим доступу до журн.: <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/16>
12. Vytautas Ragaisis. Brain contusion: morphology, pathogenesis, and treatment / Vytautas Ragaisis // MEDICINA. – 2002. – Vol. 38, No. 3. – P. 243–249.

Отримано 20.08.12