МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕРФТОРАНА НА СООТНОШЕНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ

А. Г. Жукова, Т. Г. Сазонтова¹, И. В. Аркадьева, В. В. Мороз²

ГУ НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, ¹ МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва,

² ГУ НИИ Общей реаниматологии РАМН

The Modulating Effect of Perfluorane on the Ratio of Pro- to Antioxidative Systems in Different Organs

A. G. Zhukova, T. G. Sazontova¹, I. V. Arkadyeva, V. V. Moroz²

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences,

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;

² Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences

В эксперименте продемонстрировано модулирующее действие антигипоксического препарата — кровезаменителя с полифункциональными свойствами — перфторана на соотношение про- и антиоксидантных систем в разных органах. В сердце при стрессе перфторан предотвращал активацию свободнорадикального окисления за счет увеличения активности супероксиддисмутазы и других ферментов антиоксидантной защиты. В печени, менее резистентной к свободнорадикальному окислению ткани, острый стресс на фоне введения перфторана снижал активность СОД на 37%, что сопровождалось неизменным начальным уровнем продуктов окисления и повышенной чувствительностью мембранных структур к индукции свободнорадикального окисления. Проксанол при стрессе в сердце и печени защищал мембранные структуры от действия АФК-индуцируемых повреждающих факторов без существенной активации ферментов антиоксидантной защиты. Сделан вывод о необходимости выбора оптимальной дозировки препаратов, модулирующих соотношение про- и антиоксидантов в клетке, с учетом состояния органов, наиболее чувствительных к действию активных форм кислорода. **Ключевые слова:** перфторан, проксанол, стресс, свободнорадикальное окисление, антиоксидантные ферменты.

The experiment demonstrated the modulating effect of the antihypoxic agent perfluorane, a blood substitute having multifunctional properties, on the ratio of pro- to antioxidative systems in different organs. In the heart, perfluorane prevented the activation of free radical oxidation under stress, by increasing the activity of superoxide dismutase (SOD) and other enzymes of antioxidative defense. In the liver less resistant to free radical tissue oxidation, acute stress lowered the activity of SOD by 37% during administration of perfluorane, which was followed by the unchanged baseline level of oxidation products and by the hypersensitivity of membranous structures to induction of free radical oxidation. Under stress, proxanol in the heart and liver protected membranous structures from the influence of APK-induced damaging factors without substantially activating the enzymes of antioxidative defense. It is concluded that it is necessary to choose the optimum dosage of the drugs modulating the ratio of pro- to antioxidants in the cell, by taking into account the state of organs that are most sensitive to active oxygen forms. **Key words:** perfluorane, proxanol, stress, free radical oxidation, antioxidative enzymes.

Перфторан (ПФ), препарат на основе эмульгированных перфторуглеродов, является кровезаменителем с функцией транспорта кислорода. Показано, что ПФ обладает полифункциональными свойствами, а именно увеличивает транспорт кислорода, улучшает центральную гемодинамику и микроциркуляцию, стабилизирует клеточные мембраны [1, 2]. В последние годы обнаружено протекторное действие ПФ от биоокислителей и его стимулирующий эффект на цитохром р-450 [3]. Однако отсутствуют работы по системному исследованию тканеспецифических особенностей действия перфторана. В соответствии с этим, цель настоящей работы состояла в изучении модулирующего действия перфторана и его компонента — проксанола на

про- и антиоксидантную систему в сердце и печени при стрессорном воздействии.

Материалы и методы

Исследование проведено на крысах самцах Вистар ($n=40$) массой 250 г. Животные были разделены на 6 групп: 1 — контроль ($n=5$); 2 — Проксанол (ПР) ($n=5$); 3 — Перфторан (ПФ) ($n=5$); 4 — Стресс ($n=8$); 5 — Проксанол + Стресс ($n=8$); 6 — Перфторан + Стресс ($n=8$). Перфторан или Проксанол вводили в/б в дозе 2 мл/200 г массы тела, что соответствует широко используемой дозе перфторана — 10 мл/кг массы тела. Стресс проводили через 1 ч после введения препаратов, а декапитацию животных — через 1 ч после окончания стресса. Стресс проводили с помощью методики «Свободное плавание в клетке» [4]. Экспериментальная установка представляла собой стандартную пластиковую клетку ($50 \times 30 \times 20$), заполненную водой (температура 22°C). Расстояние от сетки до поверхности воды — 5 см. В клетку

Активность ферментов антиоксидантной защиты в миокарде крыс

Серия эксперимента	СОД, у. е./г ткани	Каталаза, мкМН ₂ O ₂ /мин/г ткани
Контроль	65,2–65,5–65,9	189,7–209,9–235,2
Стресс	60,9–65,9–70,2	249,2–278,6–307,8* ($p \leq 0,05$)
Перфторан	73,7–85,9–86,4* ($p \leq 0,05$)	220,0–227,6–278,2
Перфторан + Стресс	67,3–70,7–74,9	279,1–330,1–347,1* ^{*,#} ($p \leq 0,05$)
Проксанол	69,1–70,0–83,2	170,0–172,0–200,0
Проксанол + Стресс	63,9–72,6–77,3	246,6–290,9–364,3* ^{*,#} ($p \leq 0,01$)

Примечание. * — достоверность отличий по сравнению с контролем; ** — достоверность отличий по сравнению с серией «Перфторан» или «Проксанол»; # — достоверность отличий по сравнению с серией «Стресс» (Mann-Whitney U Test).

помещали по 5 крыс и закрывали сверху сеткой. Животные имели возможность стоять, ухватившись за сетку, висеть на ней, а также плавать, не мешая друг другу. Время стрессирования — 30 минут. После окончания эксперимента извлекали сердце и печень, промывали физиологическим раствором и замораживали в жидком азоте до исследования. Измельчение ткани сердца проводили гомогенизатором Ultra-Turrax TP-18/10 ножом 25N-10 при 6500 об/мин в течение 60 сек (2 раза по 30 сек) с интервалом 15 сек, а печени в гомогенизаторе тефлон — стекло в 3 приема, в течение 30 сек, при соотношении ткань — среда, равном 1:8 — для сердца и 1:12 — для печени. Среда гомогенизирования содержала 30 мМ Tris, 100 мМ NaCl (pH 7,4 при 4 °C). Активность каталазы определяли по методу [5] с учетом модификации для определения в гомогенатах. Активность общей супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу [6] спектрофотометрически по скорости ингибирования образования супероксидного радикала в системе ксантин — ксантиноксидаза. Резистентность тканей к действию активных форм кислорода (АФК) определяли *in vitro*, индуцируя окисление в гомогенатах в присутствии аскорбата (0,05–0,3 мМ) при концентрации белка не выше 3 мг/мл. Концентрацию продуктов окисления, индуцированного АФК, оценивали по характерному спектру поглощения в соответствии с классическим методом [7] в модификации [8] на спектрофотометре Hitachi-557.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0 согласно рекомендациям по проведению биомедицинской статистики [9]. Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический Mann-Whitney U Test. Результаты исследований в таблицах представлены в виде тройки цифр — нижний квартиль (25% перцентиль) — медиана — верхний квартиль (75% перцентиль), дающих представление о центральной тенденции, ширине и асимметрии распределения результатов. Результаты экспериментов на рисунках представлены в виде медианы.

Рис. 1. Влияние перфторана и проксанола *in vitro* на уровень свободнорадикального окисления в печени. D532 — Оптическая плотность при 532 нм.

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах было показано, что перфторан в дозе 2 мл/200 г массы тела снижает интенсивность свободнорадикального окисления, индуцированного в модельных системах *in vitro* (рис. 1), то есть повышает устойчивость ткани печени к действию АФК.

Сердце. Введение перфторана контрольным крысам приводило к увеличению в миокарде активности СОД на 31% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. Острый стресс вызывал увеличение активности каталазы в миокарде животных на 33% (табл. 1) и дополнительно активировал этот фермент на 18% ($p \leq 0,05$) у животных, перенесших стресс на фоне перфторана (выше на 57% по сравнению с контролем). Острый стресс вызывал также увеличение активности каталазы на 39% ($p \leq 0,01$) по сравнению с контролем и у животных, получавших проксанол. Такая значительная активация ферментов антиоксидантной защиты при введении проксанола и перфторана, свидетельствует о том, что эти препараты являются модуляторами свободнорадикальных процессов в клетке, по-видимому, индуцируя ее редокс-сигнальную систему. Увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты всегда связано с ростом концентрации субстратов для этих ферментов, а именно, повышением уровня АФК. Именно они являются сигналом к увеличению синтеза новых молекул антиоксидантов [10]. При этом клеточный ответ будет зависеть от чувствительности ткани к индукции свободнорадикального окисления.

Введение перфторана, проксанола контрольным животным не приводило к изменению начального уровня продуктов АФК-индуцированного окисления. Однако введение перфторана контрольным животным приводило к увеличению чувствительности ткани сердца к свободнорадикальному окислению — через 40 мин после индукции окисления *in vitro* уровень АФК-продуктов на 25% ($p \leq 0,05$) выше по сравнению с контролем (табл. 2).

Острый стресс вызывал повышение чувствительности ткани миокарда к свободнорадикальным процессам — увеличивался начальный уровень продуктов окисления на 33% ($p \leq 0,05$) и уровень

Таблица 2

Влияние перфторана и проксанола на уровень свободнорадикального окисления в миокарде крыс при стрессе

Серия эксперимента	0 мин	20 мин	40 мин
Контроль	0,08–0,12–0,12	0,62–0,88–0,90	1,16–1,52–1,51
Стресс	0,12–0,16–0,15*	0,74–0,86–1, 1	1,62–1,81–2,02*
Перфторан	0,1–0,12–0,18	0,55–0,98–1,28	1,71–1,89–2,0*
Перфторан + Стресс	0,1–0,15–0,12	0,55–0,7–0,93	1,1–1,66–1,76
Проксанол	0,07–0,12–0,12	0,41–0,86–0,80	1,2–1,2–1,2
Проксанол + Стресс	0,11–0,15–0,16	0,53–0,77–0,93	1,0–1,22–1,38#

Примечание. * — достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем; # — по сравнению с серией «Стресс» (Mann-Whitney U Test).

Таблица 3

Активность ферментов антиоксидантной защиты в печени крыс

Серия эксперимента	СОД, у. е./г ткани	Каталаза, $\mu\text{MnH}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{г ткани}$
Контроль	113,7–125,0–133,4	8,6–9,8–9,8
Стресс	79,9–83,7–88,7* ($p \leq 0,01$)	9,0–11,1–11,6
Перфторан	89,0–91,0–106,7* ($p \leq 0,01$)	9,0–11,2–12,2
Перфторан + Стресс	71,2–78,9–105,4* ($p \leq 0,05$)	7,1–9,8–12,5
Проксанол	67,7–130,0–133,4	7,8–13,3–13,6
Проксанол + Стресс	88,2–91,7–97,7# ($p \leq 0,05$)	9,2–10,2–11,2

Примечание. * — достоверность отличий по сравнению с контролем; # — достоверность отличий по сравнению с серией «Стресс» (Mann-Whitney U Test).

окисленных продуктов через 40 мин инкубации на 20% (табл. 2; $p \leq 0,05$). Острый стресс на фоне введения перфторана не вызывал такого эффекта — чувствительность ткани сердца к действию АФК оставалась на контрольном уровне за счет повышенного уровня ферментов антиоксидантной защиты. Проксанол защищал ткань миокарда от действия АФК при стрессе — через 40 мин инкубации содержание продуктов окисления в сердце оставалось на контрольном уровне и оказалось на 27% ($p \leq 0,05$) ниже по сравнению со стрессом.

Печень. Введение перфторана контрольным животным не приводило к изменению устойчивости мембранных структур печени к индукции свободнорадикального окисления, однако вызывало снижение активности СОД на 27% (табл. 3). После стресса зарегистрировано повышение чувствительности мембранных структур печени к индукции свободнорадикальных процессов на фоне значительного снижения активности СОД на 33% ($p \leq 0,01$), по сравнению с контролем (рис. 2, табл. 3). Острый стресс на фоне введения перфторана также

Рис. 2. Влияние перфторана (а) и проксанола (б) на уровень свободнорадикального окисления в печени крыс при стрессе.

D_{532} — оптическая плотность при 532 нм; * — достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем; # — по сравнению с серией «Стресс» (Mann-Whitney U Test).

снижал активность СОД (на 37%), что приводило к повышению чувствительности мембранных структур печени к свободнорадикальным процессам.

При стрессе проксанол предотвращал снижение активности СОД в печени и повышал устойчивость ее мембранных структур к действию АФК. После индукции окисления *in vitro* уровень АФК продуктов в печени стрессированных животных на фоне проксанола был снижен — через 20 мин на 28% ($p \leq 0,01$) и через 40 мин — на 16% ($p \leq 0,01$) (рис. 2).

Таким образом показано, что и проксанол, и перфторан модулируют про- и антиоксидантный статус организма. При этом клеточный ответ на стресс и введение проксанола и перфторана зависит от чувствительности ткани к индукции свободнорадикального окисления. В сердце, наиболее устойчивом к свободноради-

кальным реакциям, перфторан компенсировал стрессорную активацию свободнорадикального окисления на фоне повышенного уровня ферментов антиоксидантной защиты. В печени перфторан при стрессе снижал активность СОД и устойчивость мембранных структур к индукции свободнорадикального окисления. Проксанол при стрессе в сердце и печени защищал мембранные структуры от действия АФК-индуцируемых повреждающих факторов без существенной активации ферментов антиоксидантной защиты. Эти результаты в целом ставят вопрос о необходимости выбора оптимальной дозировки препаратов, имеющих модулирующее действие на соотношение про- и антиоксидантов в клетке. Особенно важно при этом учитывать состояние органов, наиболее чувствительных к действию активных форм кислорода.

Литература

1. Голубев А. М. Перфторан — плазмозаменитель с функцией транспорта кислорода. Бюл. эксперим. биологии и медицины 1998; 125 (5): 484—492.
2. Ковеленов А. Ю. Перфторорганические соединения в биологии и медицине. Пушино; 2001. 70—76.
3. Софронов Г. А., Селиванов Е. А. Новые кровезаменители полифункционального действия. Вестн. РАМН 2003; 10: 48—51.
4. Бондаренко О. Н., Бондаренко Н. А., Манухина Е. Б. Влияние различных методик стрессирования на поведенческие и соматические показатели у крыс. Бюл. эксперим. биологии и медицины 1999; 128 (8): 157—160.
5. Luck H. Catalase. In: Method of enzymatic analysis (ed. H. U. Bergmeyer). N. Y.: Verlag-Chemie Academic Pres; 1963. 885—888.
6. Fridovich I. Superoxide dismutase. Accounts Chem. Res. 1972; 5: 321—326.
7. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analyt. Biochem. 1979; 95: 351—358.
8. Kikugawa K., Kojima T., Yamaki S., Kosugi H. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. Analyt. Biochem. 1992; 202: 249—255.
9. Платонов А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.; 2000.
10. Sazontova T. G. Regularity of the modulation of cell antioxidative status in response of the activation of free radical oxidation. Hypoxia Med. J. 2002; 1—2: 2—9.

Поступила 14.11.05