

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ОТДАЛЕННОМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ (экспериментальное исследование)

А. Г. Жукова, Т. Г. Сазонтова¹, Ю. В. Архипенко¹, А. В. Волков²

НИИ Комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН, Москва

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

² НИИ Общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

Gender Differences in the Pro- and Antioxidant Systems of the Brain in the Late Postresuscitative Period (an experimental study)

A. G. Zhukova, T. G. Sazontova¹, Yu. V. Arkhipenko¹, A. V. Volkov²

Research Institute of Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases,

Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

² V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Цель исследования — изучение половых различий в уровне про- и антиоксидантных систем мозга в отдаленном пост-реанимационном периоде после клинической смерти. **Материал и методы.** У 40 взрослых белых крыс обоего пола в контроле и после перенесенной 12-мин остановки сердца через 4 месяца постреанимационного периода в ткани мозга исследовали резистентность мембранных структур к свободнорадикальному окислению и уровень белков с антиоксидантной активностью. **Результаты.** Показаны половые различия в уровне защитных белков и резистентности мембранных структур мозга в контроле и на отдаленных сроках после реанимации. Кроме того, в постреанимационный период выявлены не только количественные сдвиги в уровне защитных белков, но и изменение их спектра. **Заключение.** Необходимы дальнейшие исследования зависимых от пола молекулярных механизмов развития постреанимационной болезни для разработки специфических методов ее терапии и профилактики. **Ключевые слова:** остановка системного кровообращения, кора головного мозга, свободнорадикальное окисление, защитные системы организма — ферменты антиоксидантной защиты, HSP70, гем-оксигеназа-1, пероксиредоксин.

Objective: to study gender differences in the pro- and antioxidant systems of the brain in the late postresuscitative period after clinical death. **Materials and methods.** The brain tissue was studied for the resistance of membrane structures to free radical oxidation and the level of proteins with antioxidant activity in 40 adult albino rats of both sexes in the control and after experienced 12-minute cardiac arrest 4 months of the postresuscitative period. **Results.** There were gender differences in the level of protective proteins and in the resistance of brain membrane structures in the control and in the late postresuscitative periods. Furthermore, not only quantitative changes in the level of protective proteins, but also their spectrum alteration, were revealed in the postresuscitative period. **Conclusion.** Further investigations of gender-dependent mechanisms for the occurrence of postresuscitative diseases are needed to develop specific methods for its therapy and prevention. **Key words:** systemic circulatory arrest; cerebral cortex; free radical oxidation; the body's protective systems: antioxidant defense enzymes, HSP70, heme oxygenase-1, peroxiredoxin.

Известно, что острые гипоксические, ишемические повреждения головного мозга, вызванные, в том числе и остановкой системного кровообращения, опосредованы активными формами кислорода (АФК), способными повреждать мембранные структуры клетки [1–3]. В настоящее время повреждающий эффект повышенного уровня АФК достаточно хорошо изучен. Однако последними работами показано, что именно

свободнорадикальный сигнал является индуктором синтеза множества защитных систем клетки [4, 5]. В частности, активируется синтез HSP70, гем-оксигеназы-1 (НОх-1) и пероксиредоксинов (Prx). Эти белки, с одной стороны, являются маркерами повреждения, а с другой — выполняют защитную функцию от действия АФК в клетке. Кроме того, имеются данные, что HSP70, НОх-1 и Prx дополняют действие антиоксидантных ферментов в качестве модуляторов внутриклеточных редокс-зависимых сигнальных путей [6, 7].

В настоящее время важной проблемой является исследование различий в реакции организма на экстремальное воздействие, которые зависят от генетически

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Жукова Анна Геннадьевна
E-mail: nyura_g@mail.ru

обусловленных индивидуальных физиолого-биохимических характеристик. Так, в ряде экспериментальных и клинических исследований выявлен половой диморфизм развития и исхода критических, терминальных и постреанимационных состояний [8, 9]. Кроме того, показаны половые отличия темпов неврологического восстановления и выраженности структурных изменений мозга на 7-е сутки [10] и через 3 месяца [11] после перенесенной клинической смерти в эксперименте. Однако внутриклеточные механизмы, определяющие половой диморфизм в устойчивости к ишемическим повреждениям мозга, вызванным остановкой системного кровообращения, мало изучены.

Цель работы — изучение половых различий в резистентности мембранных структур и уровне внутриклеточных защитных систем мозга в норме и в отдаленном постреанимационном периоде после клинической смерти.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены в зимний период на 40 белых крысах обоего пола массой 200–250 г. Остановку кровообращения длительностью 12 мин у крыс, наркотизированных эфиром, вызывали внутриторакальным пережатием сосудистого пучка сердца [12]. Животных оживляли с помощью наружного массажа сердца с интратрахеальным введением адреналина в дозе до 0,1 мг/кг и искусственной вентиляцией легких воздухом. Во время сердечно-легочной реанимации регистрировали время возобновления жизненных функций. Далее ежедневно оценивали общее состояние и неврологический статус животных [13]. Через две недели после клинической смерти на фоне внешнего восстановления неврологического статуса животных начинали исследование их поведения, которое продолжалось в течение 3-х месяцев. Аналогичные исследования проводили и у интактных животных (контроль).

Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом через 3,5–4 месяца после клинической смерти для биохимических исследований. Извлекали кору головного мозга и замораживали в жидком азоте. В коре головного мозга определяли активность ферментов антиоксидантной защиты с помощью общепринятых методов: СОД — методом Fridovich [14] спектрофотометрически по разнице между скоростью образования супероксидного радикала в системе ксантин — ксантиноксидаза до

и после добавления пробы; активность каталазы — методом Luck [15] по потреблению H_2O_2 , регистрируемому при 240 нм; активность глутатионредуктазы — методом Beutler [16] по потреблению NADPH в присутствии окисленного глутатиона. Уровень защитных белков — HSP70, гемоксигеназы-1 (НОх-1) и пероксиредоксина (Prx II) определяли в цитозольной фракции ткани мозга (для этого суммировали образцы ткани мозга контрольных и экспериментальных крыс) методом Western-блот анализа с использованием моноклональных (HSP70) и поликлональных (НОх-1, Prx II) антител (Stressgen, Канада; Santa Cruz, США) и вторых антител с пероксидазной меткой (Jackson Immuno Research). Детекцию белков проводили по хемилюминесценции с использованием реактивов ECL (Amersham) на рентгенографическую пленку (Kodak film). О содержании HSP70, НОх-1 и Prx II судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Количественная обработка полученных иммуноблотов проводилась путём сканирования полос связывания антител с белком с помощью компьютерной программы Photoshop. Результаты сканирования выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

Резистентность ткани коры мозга к свободнорадикальным процессам оценивали *in vitro*, индуцируя окисление в системе, содержащей аскорбат (0,05–0,3 мМ) при концентрации белка не выше 2,5 мг/мл. Концентрацию продуктов свободнорадикального окисления, индуцированного *in vitro*, оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой по классическому методу Ohkava [17] в модификации Kikugava [18].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0 согласно рекомендациям по проведению биомедицинской статистики [19]. Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический Mann-Whitney U-Test. Результаты исследований в табл. 1 представлены в виде тройки цифр — нижний квартиль (25% перцентиль) — медиана — верхний квартиль (75% перцентиль), а на рис. 1 в виде медианы.

Результаты и обсуждение

Исходно контрольные крысы разного пола достоверно отличаются по уровню защитных систем в клетках коры головного мозга. Так, у самок по сравнению с самцами активность СОД ниже на 30%, а каталазы — выше на 29% (табл. 1). Кроме того, в коре мозга контрольных самок выше уровень и других защитных белков — HSP70 (на 42%), НОх-1 (на 81%) и Prx II (в 4 раза) (табл. 2).

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов (мг/белка) и уровень защитных белков в коре головного мозга контрольных и реанимированных крыс

Ферменты	Значения показателей в группах			
	Контроль-самцы (n=10)	РНМ-самцы (n=10)	Контроль-самки (n=10)	РНМ-самки (n=10)
СОД, у. е.	10,4 – 11,2 – 12,6 [#]	9,2 – 11,0 – 12,6	6,2 – 7,8 – 8,3	11,5 – 11,9 – 12,5*
Каталаза, мкМ H_2O_2 /мин	0,97 – 0,996 – 1,1 [#]	1,45 – 1,49 – 1,66* [#]	1,24 – 1,28 – 1,3	1,14 – 1,2 – 1,23

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольными крысами; [#] — по сравнению с крысами-самками (Mann-Whitney U-Test).

Таблица 2

Уровень защитных белков в коре головного мозга контрольных и реанимированных крыс

Ферменты	Значения показателей в группах			
	Контроль-самцы (n=10)	РНМ-самцы (n=10)	Контроль-самки (n=10)	РНМ-самки (n=10)
HSP70, ОДЕ	12,57	11,3	17,79	45,1* [#]
НОх-1, ОДЕ	1,16	2,92*	2,17 [#]	1,6
Prx II, ОДЕ	30,58	23,24	127,1 [#]	77,23* [#]

Примечание. ОДЕ — относительные денситометрические единицы. Данные получены после суммирования образцов ткани мозга.

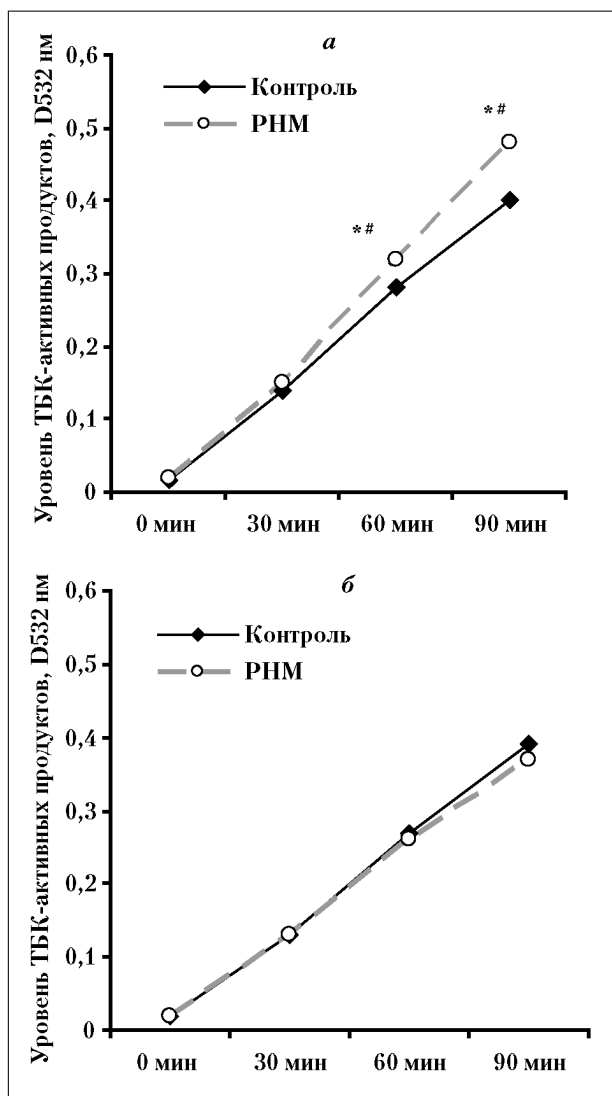


Рис. 1. Уровень продуктов свободнорадикального окисления в коре головного мозга крес-самцов (а) и крес-самок (б). * — достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольными кресами; # — по сравнению с кресами-самками (Mann-Whitney U-Test).

При этом уровень продуктов свободнорадикального окисления в мозге у крес разного пола поддерживается на одном и том же уровне (рис. 1, а и б).

Эти результаты согласуются с данными других авторов, которые также показали, что в женском организме уровень защитных систем повышен за счет антиоксидантных ферментов, α -токоферола, эстрогенов, обладающих антиоксидантными свойствами, а также более высокого уровня глюкокортикоидов [20]. Ранее было показано, что у контрольных пассивных крес активность СОД выше на 13%, а каталазы — ниже на 21% по сравнению с контрольными активными кресами [21]. Эти данные позволили предположить, что одним из факторов, обуславливающих отличие по уровню синтеза защитных белков, является существенная разница в поведенческой активности между животными разного пола — самки по сравнению с самцами характеризуются повышенной поведенческой активностью

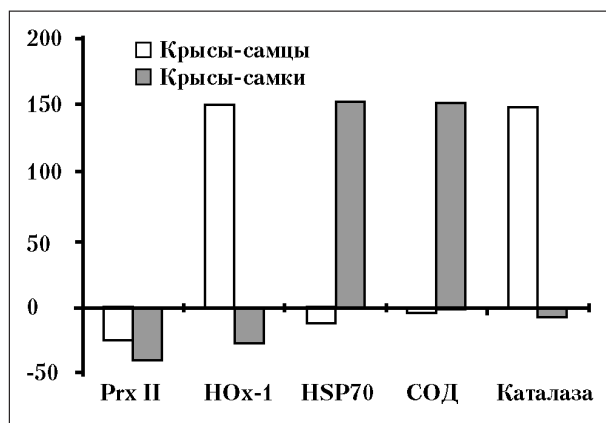


Рис. 2. Изменение уровня и спектра синтезируемых белков в коре головного мозга крес в отдаленном постреанимационном периоде (в % от контроля).

[22]. Возможно, что повышенный уровень антиоксидантной защиты в клетках коры головного мозга крес-самок будет создавать более благоприятные условия для восстановительных процессов при интенсивном и длительном действии прооксидантных факторов.

Действительно, изменение уровня защитных белков и продуктов свободнорадикального окисления в коре головного мозга подтверждает половые различия в активности компенсаторных процессов в постреанимационный период. Так, выявлены существенные половые различия в направлении и выраженности синтеза HSP70, HOx-1, Prx II и антиоксидантных ферментов в постреанимационном периоде (рис. 2). У крес-самок снижается экспрессия Prx II, и увеличиваются синтез HSP70 в 2,5 раза и активность СОД в 1,5 раза. У крес-самцов уровень этих защитных белков не отличается от контрольных значений, однако повышается активность каталазы в 1,5 раза и активируется синтез индуцибельной формы HOx-1 (в 2,5 раза).

Поскольку синтез HOx-1, HSP70, Prx II и антиоксидантных ферментов является ответом клетки на различные АФК-индуцированные воздействия, в том числе ишемические, ясно, что изменение уровня этих белков может сопровождать как повышение, так и снижение активности свободнорадикальных процессов. Так, через 3,5 месяца постреанимационного периода у крес-самок уровень свободнорадикального окисления в коре головного мозга не отличается от контрольных значений, тогда как у крес-самцов, напротив, снижается резистентность этой ткани к индукции свободнорадикальных процессов (на 20–30%; рис. 1). Эти результаты согласуются с данными нейроморфологического исследования — в отдаленном постреанимационном периоде у экспериментальных крес выявлены изменения в плотности и составе нейрональных популяций мозжечка и гиппокампа. При этом у реанимированных крес-самцов нейродистрофические и нейродегенеративные изменения развивались в большей степени, чем у реанимированных крес-самок по сравнению с соответствующим контролем [11]. Кроме того, было показано, что улучшение состава нейрональных популяций в

отдаленном постреанимационном периоде связано с активацией синтеза различных защитных белков и, в частности, HSP70 [23].

Заключение

Таким образом, выявлены половые различия в уровне защитных белков и резистентности мембранных структур мозга в контроле и на отдаленных сроках после реанимации. В головном мозге контрольных крыс-самок уровень HSP70, HOx-1, Prx II и каталазы выше по срав-

нению с крысами-самцами. На отдаленных сроках после реанимации у крыс-самок в коре головного мозга поддерживается высокий уровень синтеза HSP70 и СОД, что позволяет защитить эту ткань от чрезмерной активации свободнорадикального окисления. У крыс-самцов, несмотря на активацию синтеза HOx-1 и каталазы зарегистрировано снижение резистентности ткани мозга к индукции свободнорадикальных процессов. Кроме того, в отдаленном постреанимационном периоде выявлены не только количественные сдвиги в уровне белка, но и изменение спектра синтезируемых защитных белков.

Литература

- Halliwel B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 1992; 59 (5): 1609–1623.
- White B. C., Daya A., DeGracia D. J. et al. Fluorescent histochemical localization of lipid peroxidation during brain reperfusion following cardiac arrest. *Acta Neuropathol.* 1993; 86 (1): 1–9.
- Gulyaeva N. V., Stepanichev M. Yu., Onufriev M. V. et al. Cardiac arrest induces decrease of nitric oxide synthase activity and increase of free radical generation in rat brain regions. *Neurosci. Lett.* 1996; 220 (3): 147–150.
- Semenza G. L. Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 1999; 98 (3): 281–284.
- Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В. Роль свободнорадикальных процессов в адаптации организма к изменению уровня кислорода. В кн.: Проблемы гипоксии: Молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. Лукьянова Л. Д., Ушаков И. Б. (ред.). М.; 2004. 112–137.
- Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах. *Успехи биол. химии* 2008; 48: 319–358.
- Маргулис Б. А., Гужова И. В. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс. *Цитология* 2009; 51 (3): 219–228.
- Roof R. L., Hall E. D. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J. Neurotrauma* 2000; 17 (5): 367–388.
- Du L., Bayir H., Lai Y. et al. Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (37): 38563–38570.
- Волков А. В., Аврущенко М. Ш., Баранник А. П. и соавт. Половой диморфизм структурно-функциональных изменений мозга в раннем постреанимационном периоде после остановки сердца. *Общая реаниматология* 2006; II (2): 9–13.
- Волков А. В., Аврущенко М. Ш., Горенкова Н. А. и соавт. Половые различия отсроченных постреанимационных изменений головного мозга. *Общая реаниматология* 2007; III (5–6): 97–102.
- Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиология и эксперим. терапия* 1982; 3: 78–80.
- Лысенков С. П., Корпачев В. Г., Тель Л. З. Балльная оценка общего состояния крыс, перенесших клиническую смерть. В кн: Клиника, патогенез и лечение неотложных состояний. Новосибирск; 1982. 8–13.
- Fridovich I. Superoxide dismutase. *Accounts Chem. Res.* 1972; 5: 321–326.
- Luck H. Catalase. In: *Method of enzymatic analysis.* Bergmeyer H. U. (ed.). New York: Verlag-Chemie Academic Press; 1963. 885–888.
- Beutler E. Red cell metabolism. *A manual of biochemical methods.* Orlando, FL: Gune and Stratton, Inc.; 1984. 188.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95 (2): 351–358.
- 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. *Anal. Biochem.* 1992; 202 (2): 249–255.
- Платонов А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.; 2000. 51.
- Анищенко Т. Г., Бриль Г. Е., Романова Т. П., Шорина Л. Н. Половые различия в степени активации перекисного окисления липидов и устойчивости к сердечно-сосудистым повреждениям у крыс при стрессе. *Бюл. эксперим. биологии и медицины* 1995; 119 (4): 354–357.
- Жукова А. Г., Сазонтова Т. Г., Заржецкий Ю. В. и соавт. Тканеспецифичность ответа системы про- и антиоксидантов после реанимации. *Общая реаниматология* 2005; I (3): 46–53.
- Аврущенко М. Ш. Постреанимационные изменения мозга на уровне нейрональных популяций: значение в формировании постгипоксических энцефалопатий. *Neuroxia Med. J.* 2003; 4: 34–53.

Поступила 30.11.09