

И.А. Тараканов¹, Л.Н. Тихомирова¹, А.Г. Жукова², В.А. Сафонов¹

Устойчивость нервной ткани ствола мозга к свободнорадикальному окислению у крыс при периодическом дыхании после введения оксибутирата

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, Москва, 125315, Балтийская ул., 8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новокузнецк, 654041, ул. Кутузова, 23

У беспородных белых крыс-самцов под пентобарбиталовым наркозом оценивали резистентность ткани к свободнорадикальному окислению при возникновении у них патологического периодического дыхания после введения оксибутирата. Показали, что оксибутират модулирует про- и антиоксидантный статус в ткани мозга. У крыс без периодического дыхания оксибутират вызывал меньшее снижение резистентности мембранных структур ткани продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления. У крыс с периодическим дыханием при действии оксибутирата повышалась чувствительность мембранных структур ткани продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления. Полагают, что в патогенезе формирования патологических типов дыхания принимают участие клеточные метаболические и/или мембранные механизмы, активация которых в сетях генерации дыхательного ритма приводит к формированию патологического типа дыхания.

Ключевые слова: дыхательный центр, резистентность к свободнорадикальному окислению, периодическое дыхание, оксибутират, крыса

I.A. Tarakanov¹, L.N. Tikhomirova¹, A.G. Zhukova², V.A. Safonov¹

The resistance of low brainstem tissue to free radical oxidation in rats during periodic breathing following hydroxybutyrate treatment

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases SB RAMS, 23, Kutuzov street, Novokuznetsk, 654041

We evaluated tissue resistance to free radical oxidation, in pentobarbital-anesthetized mongrel albino male rats during pathologic periodic breathing following hydroxybutyrate (GHBA) administration. It was shown that GHBA modulated pro- and antioxidant status of brain tissue. In the absence of periodic breathing after GHBA, decreases in resistance of brainstem tissue membranes to induction of free radical oxidation were slightly pronounced. Rats with GHBA-induced periodic breathing exhibited increased membrane sensitivity of medullar neurons to induction of free radical oxidation. We suggest that cellular metabolism and/or membrane mechanisms of respiratory rhythm-generating neurons play a role in the pathogenesis of periodic breathing.

Key words: respiratory center, resistance to free radical oxidation, periodic breathing, hydroxybutyrate, rat

Ранее нами было показано, что системное введение крысам оксибутирата вызывает резкое замедление частоты дыхательных движений, которое впоследствии у большинства животных сменяется специфическим типом дыхания, характеризующимся периодическими задержками дыхания в фазе спокойного выдоха [3]. Эти наблюдения согласуются с разработанной нами концепцией [6] о нейрогуморальных механизмах нарушений регуляции дыхания центрально-

го генеза, в соответствии с которой в формировании патологических типов дыхания важнейшую роль играют изменения состава внеклеточной жидкости и ликвора в области дыхательного центра и, прежде всего, увеличение содержания тормозных медиаторов, таких, как ГАМК [4, 5]. Можно полагать, что в механизме формирования патологического периодического дыхания при гипоксии мозга важное значение имеют энергетическое состояние и баланс про- и антиоксидантных систем центрального регулятора дыхания. Выяснение возможного участия ГАМК-позитивных препаратов в этих процессах важно еще и по-

Для корреспонденции: Тараканов Игорь Анатольевич, д-р биол. наук, главн. науч. сотр. лаб. патофизиологии дыхания ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: inspiration@mtu-net.ru

тому, что участие ГАМК является дополнительным подтверждением адекватности этого способа моделирования терминальных типов дыхания, наблюдаемых у больных в коматозном состоянии, характеризующемся дефицитом энергии и повышением уровня окислительных процессов, в том числе перекисным окислением липидов.

Цель исследования — оценка резистентности структур продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению при возникновении у них патологического периодического дыхания с задержками в фазу спокойного выдоха после введения оксибутирата.

Методика

Опыты выполнены на 19 беспородных белых крысах-самцах массой от 400 до 600 г под пентобарбиталовым наркозом (этамилал натрия, 45-50 мг/кг внутривенно). При появлении реакции на сжатие конечности внутривенно дополнительно вводили пентобарбитал из расчета 5-10% от исходной дозы. Температуру тела поддерживали на уровне $38,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с помощью инфракрасной лампы. Хирургическая подготовка животных к эксперименту

аналогична описанной ранее [7]. Для получения доступа к заднему мозгу удаляли затылочную и части теменных костей черепа. Крысы были разбиты на 3 группы:

- А — без введения оксибутирата (контроль);
- Б — без развития периодического дыхания (только с замедлением дыхательного ритма) после введения оксибутирата;
- В — с устойчивым развитием периодического дыхания после введения оксибутирата.

Оксибутират лития вводили внутривенно медленно в дозе 750 мг/кг [8]. Забор ткани мозга осуществляли пересечением ствола мозга на уровне от 5 мм выше задвижки до уровня затылочного отверстия. Таким образом, для последующего биохимического анализа использовали участок ствола мозга, включающий нижнюю часть варолиева моста и продолговатый мозг, в котором расположены основные структуры автоматического центрального регулятора дыхания. Указанный участок мозга извлекали у крыс контрольной группы — без введения оксибутирата, у остальных крыс — через 30—45 мин после введения препарата.

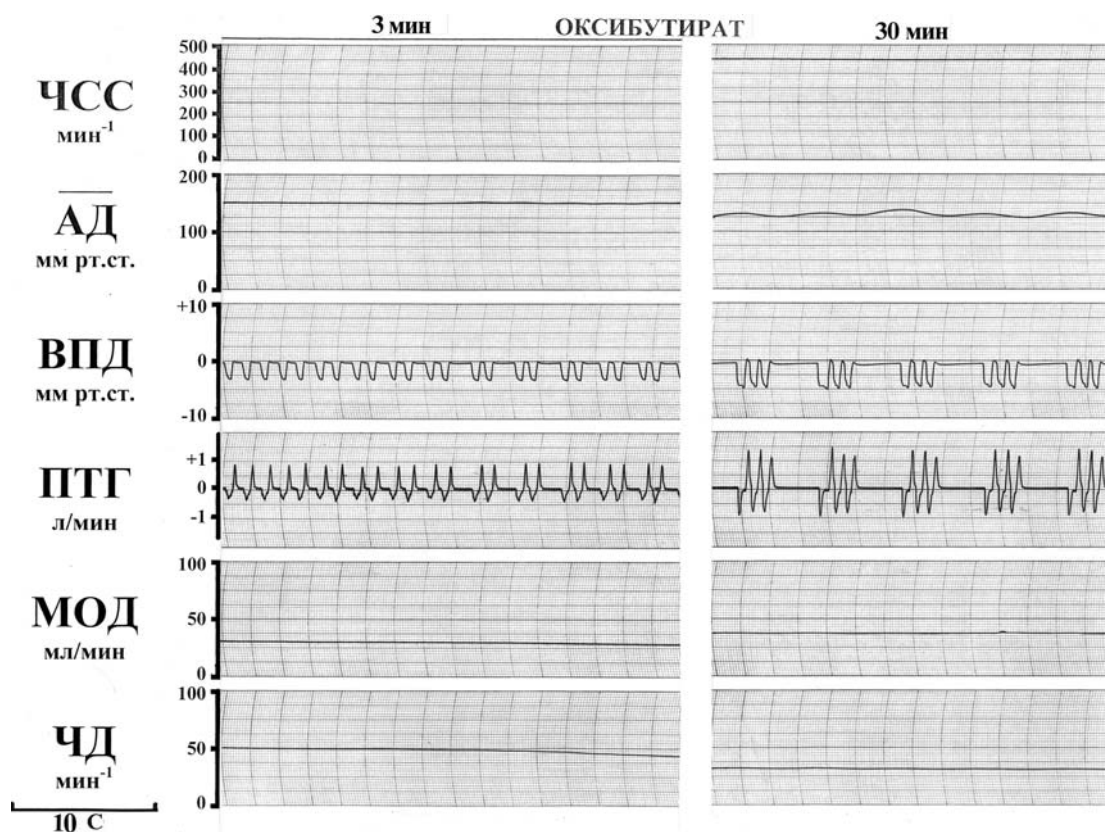


Рис. 1. Изменения внешнего дыхания и гемодинамики у крысы группы (в) после введения оксибутирата: ЧСС — частота сердечных сокращений (мин^{-1}); АД — среднее системное артериальное давление (мм рт.ст.); ВПД — внутрипищеводное давление (мм рт.ст.); ПТГ — пневмотахограмма (л/мин); МОД — минутный объем дыхания (мл/мин); ЧД — частота дыхания (мин^{-1}). Внизу — отметка времени. Сверху указано время после введения оксибутирата.

Выделенный участок продолговатого мозга замораживали в жидком азоте до исследования. Измельчение ткани продолговатого мозга проводили в гомогенизаторе тефлон—стекло в 3 приема в течение 30 с при соотношении ткань—среда, равном 1:10. Среда гомогенизирования содержала 30 мМ Tris, 100 мМ NaCl (рН 7,4 при 4°C).

Резистентность ткани продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению определяли *in vitro*, индуцируя окисление в системе, содержащей аскорбат (0,2 мМ) при концентрации белка не выше 3 мг/мл.

Концентрацию продуктов свободнорадикального окисления оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по классическому методу [10] в модификации [9] на спектрофотометре Hitachi-557.

Концентрацию белка измеряли, используя подход [11], по амплитуде 4-й производной спектра поглощения в области 240—320 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни U-test согласно рекомендациям по проведению биомедицинской статистики [2].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен пример патологического дыхания, развивающегося у большинства крыс в возрасте старше 3 мес. после введения оксибутирата и характеризующегося группировкой дыхательных движений, разделенных периодами удлинённого спокойного выдоха. Обычно число дыхательных движений в группе колебалось от 2 до 4 (чаще всего по 2) и в некоторых опытах могло изменяться. Животных с таким типом дыхания относили к группе В. Если после введения препарата изменения ограничивались только замедлением частоты дыхательных движений, что наблюдали у меньшего количества животных, то их относили к группе Б (рис. 2).

Чрезмерная активация свободнорадикального окисления является ранним универсальным, неспецифическим показателем наличия повреждения и характерна для самых различных заболеваний. О состоянии свободнорадикальных процессов в ткани продолговатого мозга при введении оксибутирата судили на основании показателя состояния антиоксидантной защиты — скорости индуцибельного накопления продуктов свободнорадикального окисления.

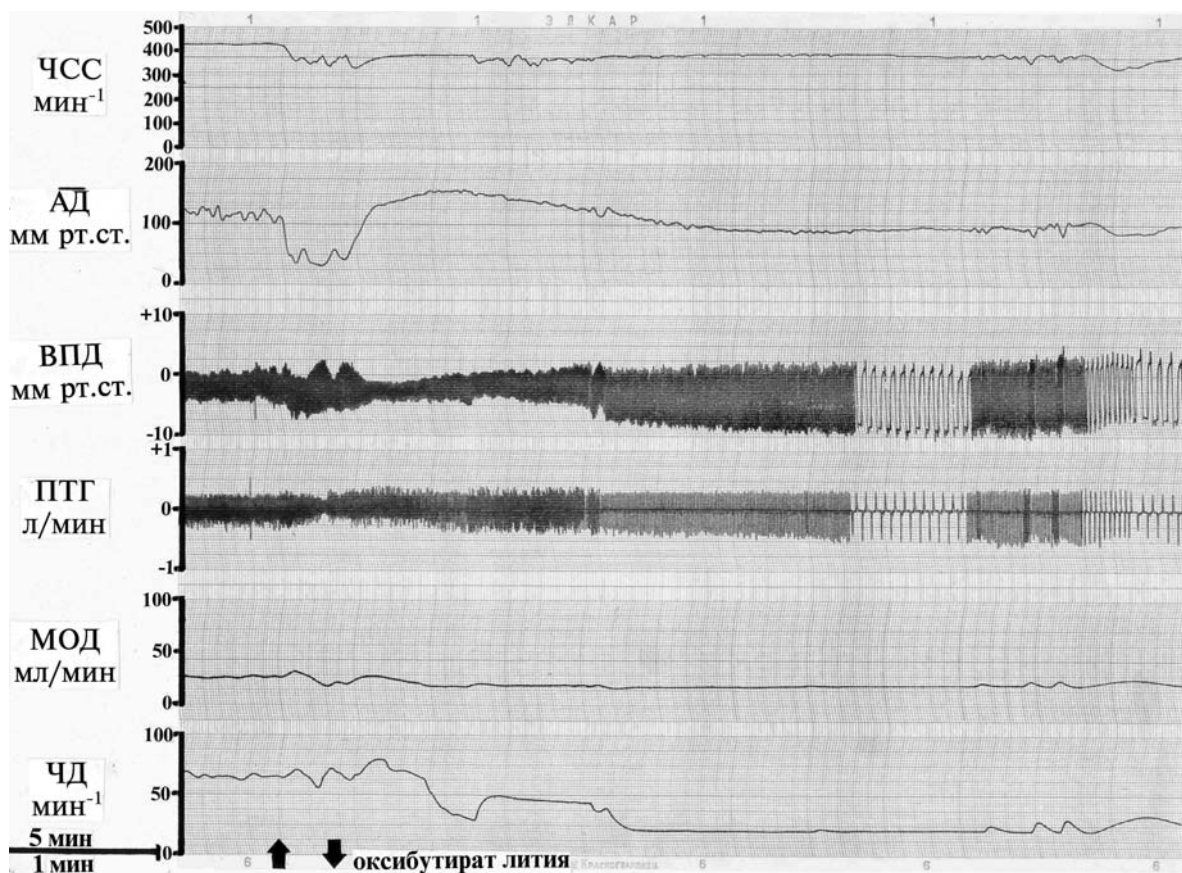


Рис. 2. Изменения внешнего дыхания и гемодинамики у крысы группы (б) после введения оксибутирата. Обозначения см. на рис. 1. Стрелками снизу показан период введения оксибутирата.

Уровень ТБК-активных продуктов окисления в продолговатом мозге крыс

Группа животных	0 мин	30 мин	60 мин	90 мин
Группа А. Контроль (n=8)	0,015±0,005	0,073±0,004	0,155±0,005	0,238±0,010
Группа Б. Без периодического дыхания (n=5)	0,012±0,002	0,082±0,004* p≤0,05	0,174±0,005* p≤0,01	0,252±0,020
Группа В. С периодическим дыханием (n=6)	0,017±0,005	0,087±0,020	0,197±0,050* p≤0,05	0,273±0,030 p≤0,05

Примечание. Достоверность отличий: * — по сравнению с контролем

Данные по скорости индуцибельного накопления продуктов окисления и по изменению уровня ТБК-активных продуктов в ткани продолговатого мозга представлены в таблице. Видно, что введение оксибутирата крысам не приводило к изменению начального уровня продуктов индуцированного окисления активными формами кислорода (АФК). Однако введение оксибутирата крысам повышало чувствительность ткани продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению: через 60 мин и 90 мин после индукции окисления *in vitro* скорость накопления АФК-продуктов была на 15—29% выше по сравнению с контролем в обеих группах. Важно отметить, что наибольшая активация свободнорадикальных процессов *in vitro* зарегистрирована у крыс с развитием периодического дыхания.

Таким образом, нами показано, что оксибутират модулирует про- и антиоксидантный статус в ткани мозга. При этом клеточный ответ на введение оксибутирата зависит от индивидуальной устойчивости крыс. Так, у крыс без периодического дыхания оксибутират приводил к меньшему снижению резистентности (т.е. к меньшему повреждению) мембранных структур продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления. У крыс с периодическим дыханием при действии оксибутирата повышалась чувствительность мембранных структур ткани продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления (и, вероятно, к повреждению) по сравнению с крысами без периодического дыхания. Следовательно, после введения оксибутирата в нервной ткани нижней части ствола головного мозга крыс, судя по уровню ТБК-активных продуктов окисления, происходят выраженные изменения баланса про- и антиоксидантных систем. Эти изменения могут отражаться как на энергетическом состоянии нервных клеток, так и на свойствах их мембран. Характерно, что выявленные изменения были более значительными у крыс группы В, демонстрировавших отчетливое периодическое дыхание с задержками в фазе спокойного выдоха. Можно полагать, что имеется некоторый критический уровень сдвига резистентности тка-

ни продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению, при котором формируется указанный тип патологического периодического дыхания.

Предотвращение и устранение активации свободнорадикального окисления помогает во многих случаях предотвратить прогрессирование патологического процесса или облегчает его течение. В связи с этим важно установить, как влияют препараты, применяемые для лечения тех или иных заболеваний, на уровень про- и антиоксидантов в тканях, так как характер изменений свободнорадикальных процессов под влиянием лекарственных средства может являться одним из показателей, определяющих выбор препарата при той или иной патологии [1].

Проведенное исследование свидетельствует о том, что в патогенезе формирования патологических типов дыхания, характеризующихся нарушениями дыхательного ритма, кроме накопления нейромедиаторов в спинно-мозговой жидкости в зоне дыхательного центра, дополнительное участие принимают и клеточные метаболические и/или мембранные механизмы, активация которых в сетях генерации дыхательного ритма приводит к переходу от одного типа патологического дыхания к другому, что нередко наблюдается в клинике. Дальнейшее изучение состояния метаболизма и мембранных структур мозга будет способствовать разработке патогенетических методов коррекции дыхания у тяжело больных с центральными нарушениями дыхания и, тем самым, к повышению эффективности их лечения.

Список литературы

1. **Моругова Т.В., Лазарева Д.Н.** Влияние лекарственных средств на свободнорадикальное окисление // Эксперим. и клин. фармакология. — 2000. — Т. 63, №1. — С. 71—75.
2. **Платонов А.Е.** Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. — М.: Изд-во РАМН, 2000. — 51 с.
3. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** Сравнительный анализ изменений дыхания и системного кровообращения у кошек и крыс при активировании ГАМК-рецепторов // Физиол. журн. — 1998. — Т. 84, №4. — С. 300—308.

4. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** ГАМКергическая система и ее значение для регуляции дыхания // Физиология человека. — 1998. — Т. 24, №5. — С. 116—128.

5. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** ГАМКергические механизмы нарушений дыхательного ритма // Патол. физиол. exper. тер. — 1998. — №2. — С. 48—54.

6. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** Нейрогуморальная концепция нарушений центральной регуляции дыхания // Патогенез. — 2003. — №2. — С. 11—24.

7. **Тараканов И.А., Тихомирова Л.Н., Лебедева М.А., Тарасова Н.Н., Сафонов В.А.** Нарушения характера дыхания, возникающие под действием ГАМК-ергических веществ // Патогенез. — 2005. — №3. — С. 52—58.

8. **Hedner J.A., Jonason J., Lundberg D.** Respiratory effects of gamma-hydroxybutyric acid in anesthetized rats // Neural. Transm. — 1980. — Vol. 49. — P. 179—186.

9. **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. — Vol. 202. — P. 249—255.

10. **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.

11. **Padros E., Dunach M., Morros A., Sabes M., Manosa J.** 4-th-derivative spectrophotometry of proteins // Trends in Biochem. Sci. — 1984. — Vol. 9, №12. — P. 508—510.

Поступила 03.07.13

Сведения об авторах:

Сафонов Виктор Авраамович, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. патофизиологии дыхания ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Людмила Николаевна Тихомирова, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. патофизиологии дыхания ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Жукова Анна Геннадьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «НИИКППИЗ» РАМН