

УДК [616.831-005.4: 616.379-008.64] : 577.1-019

© Т.М. Бойчук, Т.П. Савчук, 2012.

НІТРОКСИДЕРГІЧНИЙ ДИСБАЛАНС ТА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ У СТРУКТУРАХ ПРОМІЖНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ПОРУШЕННЯ КРОВООБІГУ В БАСЕЙНІ СОННИХ АРТЕРІЙ

Т.М. Бойчук, Т.П. Савчук*Буковинський державний медичний університет, кафедра гістології цитології та ембріології (зав – проф. Т.М.Бойчук), м. Чернівці.*

NITROXIDERGIC DISBALANCE AND PROTEIN FREE RADICAL MODIFICATION IN THE DIENCEPHALON STRUCTURES OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS IN ACUTE CIRCULATORY DISORDERS IN CAROTID ARTERIES BASIN

T.N. Bojchuk, T.P. Savchuk

SUMMARY

Diabetes mellitus reduces the content of nitric oxide metabolites and products of oxidative modification of proteins in all the investigated structures of the diencephalon. Carotid ischemia-reperfusion in all brain regions increases levels of nitric oxide metabolites, more significantly - in animals with diabetes mellitus, as well as the content of products of oxidative modification of proteins in brain septum in rats with diabetes.

НІТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЙ ДИСБАЛАНС И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В СТРУКТУРАХ ПРОМЕЖУТОЧНОГО МОЗГА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПРИ ОСТРОМ НАРУШЕНИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ В БАСЕЙНЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ

Т.Н. Бойчук, Т.П. Савчук

РЕЗЮМЕ

Сахарный диабет снижает содержание метаболитов оксида азота и продуктов окислительной модификации белков во всех исследованных структурах промежуточного мозга. Каротидная ишемия-реперфузия увеличивает содержание метаболитов оксида азота, более существенно – у животных с диабетом, а также содержание продуктов окислительной модификации белков в перегородке мозга крыс с диабетом.

Ключові слова: цукровий діабет, каротидна ішемія-реперфузія, мозок, оксид азоту, окиснювальна модифікація білків.

Оксид азоту є універсальним месенджером пара-і автокринної регуляції [1, 6]. Однак його роль при гіпоксичних станах неодноточна – в помірних кількостях він опосередковує вазодилататорну й збільшення кровотоку в ішемізованій зоні, гальмує агрегацію тромбоцитів і адгезію лейкоцитів до судинної стінки. Однак при перевищенні фізіологічної концентрації запускається NO-індукований нейротоксичний каскад, внаслідок якого утворюється пероксинітрид, що має здатність пошкоджувати ДНК та інші біомолекули, в тому числі й білки, пригнічує окисне фосфорилювання в мітохондріях, що ініціює утворення нових вільнорадикальних сполук [9, 12, 14]. Особливо активне утворення пероксинітриду відбувається протягом реперфузійного періоду, що поглиблює пошкодження ішемізованої тканини [14].

Нітрозергічний дисбаланс та порушення окиснювальної модифікації білків (ОМБ) є складовими патогенезу ішемічно-реперфузійних пошкоджень мозку, цукрового діабету (ЦД) та його ускладнень [1, 3, 7]. Проте, якщо за умов цих окремо взятих патологічних станів показники оксидативного стресу вивчені достатньо, то зміни в структурах мозку

при поєднанні ішемії-реперфузії та діабету досліджені мало. Між тим, саме у хворих на ЦД гострі розлади церебрального кровообігу зустрічаються в декілька разів частіше, ніж без цього захворювання, а смертність при інсультах на тлі діабету в декілька разів вища [8, 15]. Тому ми поставили за мету визначити вміст метаболітів оксиду азоту та продуктів окиснювальної модифікації білків в лімбіко-гіпоталамічних структурах мозку щурів із цукровим діабетом, ускладненим ішемією-реперфузією мозку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Цукровий діабет моделювали однократним внутрішньочеревним введенням стрептозоточину (Sigma, США, 60 мг на 1 кг маси тіла) двомісячним нелінійним білих лабораторним самцям-щурам [11]. Термін спостереження – три місяці. Упродовж цього часу тричі глюкозооксидазним методом визначали рівень глікемії, у дослід брали тварин, в яких рівень глікемії становив 10 ммоль/л та вище. П'ятимісячним щурам контрольної групи та щурам із ЦД здійснювали 20-хвилинне припинення кровотоку по обох загальних сонних артеріях шляхом їх кліпсування [4]. Тварин виводили з експерименту декапітацією під

каліпсоловим наркозом через одну год. після відновлення кровотоку. Усі втручання та забій тварин проводили під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг) із дотриманням основних положень GLP (1981 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Мозок виймали на холоді, користуючись атласом стереотаксичних координат [10] забирали преоптичну ділянку (ПД), вентромедіальний гіпоталамус (ВМГ), комплекс ядер перегородки (ПМ) та мигдаликоподібних ядер (МЯ). Продукти ОМБ визначали в гомогенатах означених структур мозку щурів контрольних і дослідних серій за вмістом альдегідо- та кетоніоходних нейтрального й основного характеру [5]. Сумарний вміст метаболітів монооксиду нітрогену – нітратів та нітритів (NOx) –

визначали методом фотометрії з використанням реактиву Грейса [5].

Результати досліджень опрацьовано за допомогою пакета прикладних програм “Statistica (“Statsoft”, США). За тестом Шапіро-Уїлка групи порівняння мали нормальний розподіл. Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних виборок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Каротидна ішемія-реперфузія підвищила вміст NOx в усіх досліджених структурах мозку, проте достовірно не змінила вміст продуктів ОМБ в жодній із них (таблиця 1). ЦД достовірно зменшує вміст NOx у всіх структурах, продуктів ОМБ нейтрального й основного характеру – в ПМ, ПД та ВМГ, продуктів основного характеру – в ядрах МК.

Таблиця 1

Уміст метаболітів оксиду азоту та продуктів окиснювальної модифікації білків у структурах проміжного мозку щурів із поєднанням цукрового діабету та каротидної ішемії-реперфузії (M±m, n=10)

Група спостереження	Уміст альдегідо- та кетоніоходних		Уміст метаболітів NO (NOx, (мкмоль/л)
	нейтрального характеру (о.о.г./г білка, 370 нм)	основного характеру (о.о.г./г білка, 420 нм)	
Комплекс септальних ядер			
Контроль	9,36±0,21	4,54±0,08	37,43±0,94
Ішемія-реперфузія	8,97±0,300	4,53±0,12	47,67±1,09 p<0,001
Цукровий діабет	7,32±0,278 p<0,009	3,17±0,388 p<0,003	30,23±0,89 p<0,001
Цукровий діабет та ішемія-реперфузія	9,31±0,216 p ₁ <0,05	4,40±0,127 p ₁ <0,04	61,72±5,35 p ₁ <0,001
Комплекс мигдалеподібних ядер			
Контроль	9,08±0,269	4,59±0,130	35,11±1,03
Ішемія-реперфузія	9,72±0,263	4,32±0,118	47,28±0,79 p<0,001
Цукровий діабет	8,09±0,751	3,64±0,379 p<0,03	31,18±1,26 p<0,05
Цукровий діабет та ішемія-реперфузія	8,36±0,537	3,96±0,271	58,60±2,85 p ₁ <0,001
Преоптична ділянка			
Контроль	8,49±0,23	4,22±0,10	38,04±0,83
Ішемія-реперфузія	8,94±0,25	4,05±0,09	46,99±0,93 p ₁ <0,001
Цукровий діабет	7,05±0,21 p<0,05	3,11±0,300 p<0,002	29,67±1,06 p<0,001
Цукровий діабет та ішемія-реперфузія	7,83±0,38	3,76±0,22	61,37±4,91 p ₁ <0,001
Вентромедіальний гіпоталамус			
Контроль	9,06±0,25	4,61±0,12	37,32±0,89
Ішемія-реперфузія	9,60±0,27	4,43±0,13	48,43±0,96 p<0,001
Цукровий діабет	7,85±0,74 p<0,009	3,48±0,40 p<0,02	32,41±1,12 p<0,005
Цукровий діабет та ішемія-реперфузія	8,70±0,51	4,24±0,20	60,30±3,89 p ₁ <0,005

Примітки: p – достовірність змін щодо показників у контрольних щурів; p₁ – щодо показників у щурів із діабетом.

Більшість літературних даних свідчать, що розвиток ЦД супроводжується зменшенням вмісту NOx та зростанням продуктів ОМБ у крові та тканинах внутрішніх органів [1, 13]. Що стосується останнього твердження, слід зазначити, що більшість експериментаторів обмежується короткими термінами спостереженнями (2-4 тижні), що пов'язано зі зростанням летальності щурів по мірі розвитку ЦД, тому в літературі визначення показників окисного стресу за умов довготривалого діабету обмежені. Однак відомо, що інсулін є загальноанаболічним гормоном, а його тривалий дефіцит призводить до посилення катаболічних процесів, що може частково, пояснити наші результати. Крім того, відомо, що окисне пошкодження білків значною мірою ініціюється високореактивними продуктами ліпопероксидації [11], тому для трактовки отриманих результатів їх необхідно співставити з результатами визначення інтенсивності ліпопероксидації.

Однак наші дані узгоджуються з результатами визначень продуктів ОМБ в гіпокампі, який вважається особливо чутливою структурою до ішемічно-реперфузійних ушкоджень [2].

В усіх структурах мозку щурів із поєднанням ЦД та ішемії-реперфузії головного мозку значно зріс вміст NOx. Можна думати, що ЦД пригнічує активність конститутивної NO-синтази, однак активність індукційної її форми за цих умов не тільки не страждає, але й підвищується. У тварин даної групи лише в ядрах ПМ зростає вміст продуктів ОМБ нейтрального й основного характеру стосовно показників у щурів із ЦД.

ВИСНОВКИ

1. Цукровий діабет знижує вміст метаболітів монооксиду нітрогену та окиснювальної модифікації білків в усіх досліджених структурах проміжного мозку.

2. Двадцятихвилинна каротидна ішемія з одноденною реперфузією суттєво підвищує вміст метаболітів монооксиду нітрогену в усіх досліджених структурах мозку контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом і продуктів окиснювальної модифікації білків у перегородці мозку щурів із цукровим діабетом

ЛІТЕРАТУРА

1. Барінова М.Э. Роль внутриклеточной сигнальной системы ENOS-протеинкиназа G в развитии дисрегуляторного синдрома у больных сахарным диабетом / М.Э.Барінова // Архив клин.и эксперим.мед. -2008.-Т.17, №1.-С.66-69.

2. Леньков О.М. Вплив двобічної каротидної ішемії-реперфузії на вміст продуктів окиснювальної модифікації білків у корі головного мозку і гіпокампі при експериментальному цукровому діабеті в самців-щурів / О.М.Леньков, С.С.Ткачук // Клін. та

эксперим. патол. – 2009. –Т.VIII, № 3(29). – С.37-39.

3. Окислительный стресс при атеросклерозе и диабете / В.З.Ланкин, М.О.Лисина, А.К.Тихазе, Ф.Т.Агеев [и др.]. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2005. – Т. 140, №7. – С. 48-51.

4. Скибо Г.Н. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г.Н. Скибо // Патология. – 2004. – Т.1, №1. – С. 22-30.

5. Сучасні методи експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / В.М.Магальяс, А.О.Міхєєв, Ю.Є.Роговий [та ін.]. – Чернівці, 2001. – 42 с.

6. Титов В.Н. Анатомические и функциональные основы эндотелий-зависимой вазодилатации, оксид азота и эндотелий / В.Н.Титов // Росс. кардиол. журн. - 2008. - №1(69). - С.71-85.

7. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells / A.I.Krizbai, H.Bauer, N.Bresgen [et al.] // Cell. Moll. Neurobiol. – 2005 – Vol. 25, №1. – P. 129-139.

8. Glymour M.M. Can Self-Reported Strokes Be Used to Study Stroke Incidence and Risk Factors? / M.M.Glymour, M.Avendano // Stroke. – 2009. – Vol.40, №3. – P.873-879.

9. Inducible nitric oxide synthase expression in the ischemic core and penumbra after transient focal cerebral ischemia in mice / D.Y.Zhu, Q.Deng, H.H.Yao [et al.] // Life Sci. - 2002. - № 71. - P.1985-1996.

10. Kunig J.F. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem / J.F.Kunig, P.A.Klippel. – Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1963. – 162 p.

11. Lipid-Derived Modifications of Plasma Proteins in Experimental and Human Diabetes / A.S.Januszewski, A.J.Jenkins, J.W.Baynes [et al.] // Ann.N.Y.Acad.Sci. – 2010. – Vol.1043, №7 – P.404-412.

12. MCI-186 reduces oxidative cellular damage and increases DNA repair function in the rabbit spinal cord after transient ischemia / G.Takahashi, M. Sakurai, K. Abe [et al.] // Ann. Thorac. Surg. – 2004. – Vol.78, №2. – P.602-607.

13. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies / M.D.Rees, E.C.Kennett, J.M.Whitehead, M.J.Davies // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – Vol.44, №12. – P. 1973-2001.

14. Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited / I.G.Obrosova, V.R.Drel, P.Pacher [et al.] // Diabetes. – 2005. – Vol.54, №12. – P. 3435-3441.

15. Risk-factor profile for the incidence of subarachnoid and intracerebral haemorrhage, cerebral infarction, and unspecified stroke during 21 years' follow-up in men / L.L.Haheim, I.Holme, I.Hjermann [et al.] // Scand.J.Public Health. – 2006. – № 34. – P.589-597.