



СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МОЗГА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ МИНДАЛИНЫ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ПОВРЕЖДЕННЫЙ УЧАСТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ МОЗГОВОЙ ТКАНИ

ГУЛЯЕВА Н. В., ЕРМАКОВА И. В., КУРБАТОВА М. Б.,

ЛОСЕВА Е. В., ЛУЦЕКИНА Е. А., ОБИДИН А. Б., ХОНИЧЕВА Н. М.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

В работе использовали 2 типа повреждения амигдалы у крыс: прокол стек-
лянной иглой с введением 0,1 мл физиологического раствора (I) и электрокоагу-
ляцию амигдалы (II). Через 10 дней после повреждения I или через 2 месяца после
повреждения II наблюдали достоверное снижение продуктов свободнорадикаль-
ного окисления липидов, сопровождающееся активацией перехвата супероксидных
радикалов в гомогенатах коры больших полушарий мозга. Сходные изменения на-
блюдали и в сыворотке крови животных. Через 1 месяц после повреждения I все
изученные параметры были в пределах нормы. В липидных экстрактах коры боль-
ших полушарий после повреждений I и II наблюдали снижение содержания хо-
лестерина и повышение содержания фосфолипидов. Трансплантация эмбриональ-
ной мозговой ткани в область повреждения усиливала все эффекты повреждения
миндалины. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в отдаленные сро-
ки после повреждения миндалины происходят генерализованные адаптивно-компен-
саторные сдвиги в ткани мозга, усиливающиеся при трансплантации.

Известно, что повреждение мозга, наряду с непосредственным
повреждающим действием, вызывает мобилизацию компенсаторно-
адаптивных механизмов. Так, показано, что повреждение мозга ока-
зывает эффекты, свидетельствующие о зависимом от времени после
повреждения повышении нейротрофной активности ткани мозга [1].
В определенный период после повреждения мозга мышцей (например,
через 1 неделю) увеличивается выживаемость животных в условиях
ишемического инсульта [2]. Эти и другие факты демонстрируют
реализацию адаптивно-компенсаторных процессов в реакции орга-
низма на повреждение. Мозговая ткань, введенная в поврежденный
мозг, способна усиливать в нем компенсаторно-восстановительные
процессы [3].

Ранее было показано, что снижение уровня свободнорадикаль-
ного окисления (СРО) в мозгу и сыворотке крови является биохимическим
коррелятом состояния адаптации животных к экстремаль-
ным условиям [4, 5], что позволяет предположить наличие опреде-
ленных компенсаторных сдвигов СРО при компенсаторно-регенератив-
ных процессах после повреждения мозга. Задачей настоящей ра-

боты была оценка состояния СРО липидов мозга при повреждении миндалины и трансплантации в поврежденный участок эмбриональной мозговой ткани.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 70 белых беспородных крысах-самцах (масса к началу эксперимента 150—200 г). В работе использовали 2 типа повреждения мозга: 1) односторонний прокол стеклинной иглой диаметром 0,8 мм с введением 0,1 мл физиологического раствора в область миндалевидного комплекса; 2) обширное двустороннее удаление миндалины коагуляцией (ток 3,0 мА, 25—30 с). Частично животных с повреждением миндалины одновременно с введением физиологического раствора вводили 0,1—0,2 мм³ мозговой ткани из области миндалины 18—20-дневных эмбрионов крыс. В случае электрокоагуляции трансплантацию проводили через 5 дней. Все операции производили стерестактически под нембуталовым наркозом (40 мг/кг массы внутривенно). Правильность повреждения или удаления миндалины, а также приживление трансплантата подтверждали морфологически.

Животных декантировали через 10 суток или 1 месяц после прокола и через 2 месяца после коагуляции. Выделяли кору больших полушарий, в гомогенатах которой определяли содержание продуктов СРО, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [6], диеновых конъюгатов и кетодиенов [7], а также супероксиддисмутазную активность [8]. В липидных экстрактах мозга [9] измеряли содержание флюоресцирующих продуктов СРО [10], антиокислительную активность в кумольной модели [11], содержание холестерина и фосфолипидных фракций [12]. В одной из экспериментальных серий дополнительно определяли содержание ТБК-активных продуктов [6], конъюгированных диенов и кетодиенов [7] и неферментативную супероксидперехватывающую активность [8] в сыворотке периферической крови.

Результаты исследования

В табл. 1 представлены данные о содержании в коре больших полушарий продуктов СРО и супероксиддисмутазной активности, а также характеристики липидного состава ткани мозга у крыс, взятых через 10 суток после прокола мозга и через 2 месяца после электрокоагуляции. Видно, что в обоих случаях повреждение мозга вызывает снижение уровня продуктов СРО, сопровождающееся активацией перехвата супероксидных радикалов. Трансплантация в поврежденный участок эмбриональной мозговой ткани усиливает эти изменения (исключение составляет лишь уровень кетодиенов). В серии исследований с электрокоагуляцией миндалины дополнительно исследовали уровень СРО в сыворотке крови (табл. 2). Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крыс с коагуляцией миндалины составляло 54,5, а с трансплантацией—16,7% от контрольного уровня, содержание конъюгированных диенов—47,3 и 24,3%, кетодиенов—33,5 и 12,5%, интенсивность неферментативного перехвата супероксидных радикалов 192,6 и 296,6% (все различия между группами достоверны при $p < 0,01$). Поскольку изменения в крови близки к изменениям в мозгу, эффект повреждения мозга и нейротрансплантации на СРО можно считать генерализованным.

Влияние повреждения миндалин на характеристику свободнорадикального окисления и спектр липидов компоненты больших полушарий мозга крыс

Показатель	Условия опыта			
	прокол n=7	прокол + трансплан- тация n=7	электроко- агуляция n=19	электрокоа- гуляция + трансплантация n=5
ТБК-активные продукты	43.0** (29.2—54.2)	15.4*** (11.3—18.8)	56.1** (19.4—68.2)	18.3*** (12.9—21.2)
Конъюгированные ли- пены	83.3** (55.6—97.2)	38.9*** (27.8—55.6)	50.7** (41.1—61.6)	27.4*** (20.6—34.2)
Кетодиены	53.9** (38.5—76.9)	18.5** (—76.9)	36.8** (26.3—52.6)	13.2*** (0—26.3)
Основа Шиффа	87.4** (84.5—90.1)	77.9*** (75.4—80.6)	94.0** (90.2—96.3)	86.4*** (83.5—89.9)
Супероксидперехваты- вающая активность	179.7** (171.9—187.5)	209.4*** (200.0—218.8)	174.3** (160.1—188.1)	260.0*** (256.1—264.1)
Антиокислительная ак- тивность липидов	90.6** (85.6—98.4)	68.8*** (63.9—74.2)	71.9** (66.2—75.0)	62.4*** (58.9—65.7)
Окисляемость фосфоли- пидов	108.9 (100.0—112.1)	117.8*** (111.9—120.1)	117.1** (109.3—121.6)	120.4** (118.3—126.0)
Суммарные фосфоли- пиды	114.3** (110.4—119.3)	126.2*** (124.0—130.9)	112.6** (109.6—116.1)	126.0*** (123.0—130.9)
Холестерин	94.5** (91.1—96.3)	87.2*** (81.9—90.3)	80.1** (75.9—83.9)	64.7*** (60.3—69.5)
Холестерин / фосфоли- пиды	81.8** (78.3—83.1)	69.1*** (65.5—74.9)	71.1** (66.9—75.0)	51.5*** (49.0—55.1)
Сфингомиелин	70.6** (63.9—76.3)	31.4*** (26.9—33.0)	7.4** (62.4—75.0)	29.7*** (26.6—33.4)
Фосфатидилхолин	104.0** (100.0—107.3)	115.3*** (111.4—120.9)	101.5 (100.0—103.4)	115.8*** (112.8—120.6)
Фосфатидилсерин	106.8** (100.0—109.9)	110.0*** (109.9—112.6)	108.0** (100.0—110.3)	120.0*** (114.5—122.7)
Фосфатидилэтаноламин	106.2** (100.0—110.4)	115.4*** (111.1—119.9)	110.5** (103.5—112.6)	113.5*** (112.6—116.3)
Фосфатидилинозит	87.5** (80.1—93.1)	72.7*** (68.9—74.4)	74.8** (72.0—77.4)	45.6*** (40.3—49.9)

Примечание. Все показатели даны в % от контроля (n=15), принятого за 100% (в скобках—минимальные и максимальные величины). В соответствии с непараметрическим критерием Уилкоксона-Манна-Уитни обозначены достоверные отличия от группы «контроль» *p<0.01, **p<0.001 и от группы «прокол» или «электрокоагуляция» соответственно *p<0.01, **p<0.001. Срок наблюдения после прокола—10 суток, после коагуляции—2 месяца.

Таблица 2

Влияние электрокоагуляции миндалин и трансплантации на состояние свободнорадикального окисления в сыворотке крови животных

Показатель	Контроль n=12	Электрокоа- гуляция n=19	Электрокоагуля- ция + трансплан- тация, n=5
ТБК-активные продукты (ед. опт. пл./мл сыворотки)	2.7±0.1 100%	1.5±0.1** 54.5%	0.5±0.1*** 16.7%
Конъюгированные липиды (ед. опт. пл./мл сыворотки)	0.52±0.07 100%	0.25±0.05** 47.3%	0.13±0.04*** 24.3%
Кетодиены (ед. опт. пл./мл сыво- ротки)	0.20±0.05 100%	0.07±0.02* 33.5%	0.03±0.01*** 12.5%
Неферментативный перекисный супер- оксидных радикалов (усл. ед.)	40±3 100%	77±6** 192.5%	119.±9*** 296.6%

Примечание. Достоверность различий обозначена как в табл. 1.

Содержание различных продуктов СРО коррелировало в мозгу животных; обнаружена также корреляция между уровнями одномоментных продуктов СРО в мозгу и крови. Так, в серии экспериментов с проколом мозга и нейротрансплантацией, включавшей 19 животных (группы «контроль», «прокол» и «прокол+трансплантация»), обнаружены следующие корреляции: ТБК-активные продукты—конъюгированные дисны, мозг $r=0,83$; ТБК-активные продукты—основания Шиффа, мозг $r=0,87$; ТБК-активные продукты—перехват супероксидных радикалов, мозг $r=0,80$; ТБК-активные продукты—мозг—кровь $r=0,90$; конъюгированные дисны—мозг—кровь $r=0,85$.

Из представленных в табл. 2 данных о состоянии липидной компоненты мозга крысы видно, что на изученных сроках повреждение мозга вызывает накопление фосфолипидов, снижение уровня холестерина и отношения холестерин—фосфолипиды. Окисляемость (расчетная величина, характеризующая отношение содержания легкоокисляемых липидов фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозита к содержанию трудноокисляемых фосфатидилхолина и сфингомиелина) возрастает, что, очевидно, вносит определенный вклад в снижение антиокислительной активности липидных экстрактов. Корреляционный анализ позволил выявить обратную линейную зависимость между антиокислительной активностью и содержанием фосфолипидов, прямую—между антиокислительной активностью и содержанием холестерина и обратную—между содержанием суммарных фосфолипидов и холестерина (коэффициенты корреляции в серии из 19 животных контрольных, с проколом и трансплантацией составляют соответственно $r=-0,81$, $-0,82$ и $-0,85$).

Изменения фосфолипидного спектра липидных экстрактов мозга в результате прокола или электрокоагуляции включали накопление фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и (недостовверное в случае коагуляции) фосфатидилхолина. Более выраженным было снижение содержания фосфатидилинозита и сфингомиелина. Трансплантация в поврежденный мозг эмбриональной мозговой ткани усиливала эффекты, выявленные после повреждения мозга, причем эффект трансплантации, как правило, был статистически достоверным (за исключением повышения окисляемости при коагуляции).

В серии, включавшей группу животных, подвергнутых проколу мозга в области миндалины с последующей трансплантацией, и соответствующую контрольную группу (всего 17 животных), не было обнаружено достоверных различий между подопытной и контрольной группами ни по одному из изученных параметров через 1 месяц после прокола (данные не приводятся).

Обсуждение результатов

Представленные результаты свидетельствуют о том, что повреждение мозга, в данном случае включающее и селективное повреждение миндалины, в отдаленные сроки после воздействия вызывает снижение интенсивности СРО, отмечаемое в мозгу и в крови и, следовательно, имеющее генерализованный характер. При этом происходит накопление фосфолипидов, прежде всего легкоокисляемых, и снижение доли холестерина в составе общих липидов мозга, следовательно, снижение отношения холестерин—фосфолипиды. Такие изменения окисляемости липидов и доли холестерина при снижении СРО соответствуют схеме Бурлаковой, согласно которой уровни СРО, индивидуальных липидов и их окисляемости являются взаимосвязанными переменными [13]. Повышение окисляемости фосфолипидов и источника холестерина неизбежно приводят к наблюдаемо-

му нами снижению антиокислительной активности липидов мозга. По данным Бурлаковой и соавт. [14] и нашим собственным данным, основные изменения липидного состава и фосфолипидного спектра в гомогенатах мозга при изменении интенсивности СРО соответствуют таковым в мембранных фракциях мозга, например, в синапсомах. В связи с этим полученные нами на гомогенатах коры больших полушарий результаты правомерно рассматривать относительно свойств мембран мозга.

Важно отметить, что изменения, подобные выявленным при повреждении мозга, соотношения СРО, интенсивности перехвата супероксидных радикалов и липидного состава гомогената, клеточных и субклеточных фракций мозга наблюдались нами ранее в условиях долговременной адаптации животных к хроническому эмоционально-болевого стрессу, когда развитию стадии адаптации соответствовало стабильное и длительное снижение уровня СРО на фоне усиленного перехвата супероксидных радикалов и снижения отношения холестерин-фосфолипиды. В соответствии с существующей точкой зрения [15], компенсаторные процессы—важные адаптивные реакции систем организма на повреждение—реализуются на основе тех же закономерностей, что и другие адаптационные реакции организма. Снижение СРО и липидные перестройки, наблюдаемые нами после повреждения мозга, могут быть рассмотрены как нейрохимические корреляты долговременной компенсации организма в ответ на это воздействие. Естественно, что степень компенсации и ее длительность зависят от характера повреждения. Из данных табл. I видно, что степень ингибирования СРО в мозгу и степень изменения липидной компоненты очень близки через 10 суток после прокола и через 2 месяца после коагуляции миндалин (второе воздействие значительно сильнее). При этом продолжительность компенсаторных изменений в ответ на более слабое воздействие (прокол) значительно меньше: через 1 месяц после прокола изменения отсутствуют, а через 2 месяца после коагуляции ярко выражены.

Трансплантация эмбриональной ткани в поврежденный участок мозга усиливает все изменения, вызываемые повреждением на стадии компенсации: ингибирование СРО, активацию супероксидперехватывающей активности, снижение уровня холестерина, отношения холестерин-фосфолипиды, антиокислительной активности, содержания сфингомиелина и фосфатидилинозита, повышение содержания суммарных фосфолипидов, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхоллина. Основываясь на упомянутой выше трактовке полученных данных в рамках реализации стадии долговременной компенсации, можно заключить, что эти результаты указывают на повышение уровня компенсации при трансплантации в поврежденный участок эмбриональной мозговой ткани. Этот вывод полностью подтверждает известный факт об усилении компенсаторно-регенеративных процессов в мозгу реципиента под влиянием нейротранспланта [3].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что параметры СРО и липидный состав мозга являются нейрохимическими коррелятами компенсаторно-регенеративных процессов в мозгу.

LIPID PEROXIDATION INDUCED BY DAMAGE OF AMYGDALA AND TRANSPLANTATION OF EMBRYONIC BRAIN TISSUE INTO DAMAGE AREA

GULYAEVA N. V., ERMAKOVA I. V., KURBATOVA M. B., LOSEVA E. V.,
LUSHCHEKINA E. A., OBIDIN A. B., KHONICHEVA N. M.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR Academy of
Sciences, Moscow

Two types of rat amygdala damage were experimentally studied: (1) a puncture followed by injection of physiological solution (0.1 ml) into the damaged area and (2) electrocoagulation. Ten days after type 1 damage or two months after type 2 damage a stable LPO inhibition and increase of superoxide scavenging in cerebral cortex was observed. One month after type 1 damage these parameters returned to the normal level. A decrease in cholesterol level and increase in phospholipids were detected in lipid extracts of the cortex. Both types of damage decreased lipid peroxidation and increased non-enzymatic superoxide scavenging in the serum. Transplantation of embryonic brain tissue into the damaged area stimulated these effects. The data suggest that the damage of amygdala results in adaptive compensating generalized changes, which are stimulated by transplantation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nieto-Sampedro M., Lewis E. R., Cotman C. W., Manthorpe M., Skaper S. D., Barlin G., Longo F. M., Varon S. *Science*, v. 217, № 3, p. 860—861, 1982.
2. Takahata Y., Shimoi K. *Brain Res.*, v. 381, № 2, p. 368—371, 1986.
3. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии. М., Наука, 1986.
4. Гуляева Н. В., Левшина И. П., Обидин А. Б. — В сб.: Фундаментальные достижения нейробиологии—медицине, с. 181—182, Горький, 1987.
5. Обидин А. Б. — В сб.: Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов, с. 202, Алма-Ата, 1987.
6. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. *Anal. Biochem.*, v. 95, № 2, p. 351—358, 1979.
7. Костюк В. А., Потанович А. И., Лунец Е. Ф. *Вопр. мед. химии*, т. 30, № 4, с. 125—127, 1983.
8. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 46, № 2, p. 843—854, 1972.
9. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. *J. Biol. Chem.*, v. 226, № 3, p. 497—509, 1957.
10. Fletcher B. L., Dillard C. J., Tappel A. L. *Anal. Biochem.*, v. 52, № 1, p. 1—9, 1973.
11. Кудрик А. Н., Смоленский В. Ф., Хусаинов В. И., Абиндер А. А. *Авт. свидетельство СССР № 1273801*, 1985. *Бюлл. изобр.* № 44, 1986.
12. Osborn N. N. — In: *Mitrochemical analysis of nervous tissue*, p. 122—152. New York, Pergamon Press, 1974.
13. Бурлакова Е. Б. — В сб.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии, с. 74—83, М., Наука, 1978.

14. Буракова Е. Б., Архипова Г. В., Чернявская Л. Н. Биол. мембраны, т. 4, № 2, с. 165—171, 1987.
15. Меерсон Ф. З. — В сб.: Физиология адаптационных процессов, с. 481—491, М., Наука, 1986.

Поступила 20.XII.1989

Calcium and Calcium Binding Proteins. Molecular and Functional Aspects. Springer—Verlag, Berlin, 260 p., 1988.

Кальций и кальцийсвязывающие белки. Молекулярные и функциональные аспекты.

Книга является актуальным обзором существующих сведений о роли кальция и кальцийсвязывающих белков в некоторых биологических системах, в том числе в скелетных, сердечной и гладких мышцах. Особое внимание уделяется EF—и кальцийсвязывающим белкам (парвальбумину, кальмодулину), их роли в различных внутриклеточных процессах в связи с особенностями их молекулярного строения. Рассматриваются различные механизмы регуляции концентрации внутриклеточного кальция на молекулярном уровне, в том числе модуляция перемещения кальция между вне- и внутриклеточным пространством, а также между цитоплазмой и другими клеточными образованиями, например, митохондриями, саркоплазматическим ретикуломом.