

ДИНАМІКА ПРОДУКТІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В КРОВІ ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ РАДИКУЛОІШЕМІЇ ТА ЇЇ ПАТОГЕНЕТИЧНА КОРЕКЦІЯ

ДИНАМІКА ПРОДУКТІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В КРОВІ ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ РАДИКУЛОІШЕМІЇ ТА ЇЇ ПАТОГЕНЕТИЧНА КОРЕКЦІЯ – Метою дослідження було вивчення стану пероксидації ліпідів та антиоксидантного захисту при експериментальній дискогенній радикулоішемії у щурів та їх патогенетична корекція. В експерименті на 30 щурах лінії Вістар вивчали показники перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту під впливом альфа-ліпоєвої кислоти та мелатоніну. Введення альфа-ліпоєвої кислоти та мелатоніну окремо поліпшувало показники антиоксидантного захисту, а в їх комбінації ці зміни були більш вираженими.

ДИНАМИКА ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАДИКУЛОИШЕМИИ И ЕЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ – Целью исследования было изучение состояния пероксидации липидов и антиоксидантной защиты при экспериментальной дискогенной радикулоишемии у крыс и их патогенетическая коррекция. В эксперименте на 30 крысах линии Вистар изучались показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты под влиянием альфа-липооевой кислоты и мелатонина. Введение альфа-липооевой кислоты и мелатонина по отдельности улучшало показатели антиоксидантной защиты, а в их комбинации эти изменения были более выраженными.

DYNAMICS OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT PROTECTION IN RAT BLOOD IN EXPERIMENTAL RADICULOISCHEMIA AND ITS PATHOGENETIC CORRECTION – The aim was to study the state of lipid peroxidation and antioxidant protection in experimental discogenic radiculosis in rats and its pathogenetic correction. There were investigated 30 rats of Wistar line in the experiment. Lipid peroxidation and antioxidant protection were studied under the influence of alpha-lipoic acid and melatonin. The introduction of alpha-lipoic acid, melatonin alone improves antioxidant defense, and their combination makes these changes more pronounced.

Ключові слова: дискогенна радикулоішемія, пероксидація ліпідів, антиоксидантний захист, альфа-ліпоєва кислота + мелатонін.

Ключевые слова: дискогенная радикулоишемия, пероксидация липидов, антиоксидантная защита, альфа-липооевая кислота + мелатонин.

Key words: discogenic radiculosis, lipid peroxidation, antioxidant protection, alpha-lipoic acid + melatonin.

ВСТУП Проблема захворювання на дискогенну радикулоішемію (ДРІ) є однією з найважливіших у неврології, вертебрології та нейрохірургії. За даними ВООЗ, біль, який виникає внаслідок цієї патології, досягає розмірів пандемії і є соціально-економічною проблемою. Вона займає друге місце після ГРВІ після звернення хворих за допомогою до лікаря [1]. Незважаючи на зростаючий арсенал протизапальних та анальгезуючих лікарських засобів, традиційне лікування цього захворювання не завжди має позитивний результат.

Відомо, що посилення процесів пероксидації ліпідів відіграє істотну роль у патогенезі багатьох хвороб лю-

дини, у тому числі при формуванні запального процесу при ДРІ [2, 3]. Процеси окиснення та відновлення в нормальних умовах збалансовані, а в умовах патологічних змін при ДРІ виникає окиснювальний стрес, для якого характерним є порушення прооксидантного та оксидантного пошкодження нервової тканини [4]. Для стабілізації мембран клітин і покращення репаративних процесів тканин в останні роки все ширше використовують антиоксиданти. Одним з найактивніших антиоксидантів у хворих на ДРІ вважалась альфа-ліпоєва кислота (АЛК), але в останній час стало відомо, що мелатонін є більш активний у плані інактивації пероксильних радикалів. Крім антирадикальної дії він має протизапальну та антидегенеративну дію, стимулює активність антиоксидантних ферментів [3, 5, 6].

Мелатонін входить у природну систему захисту нейронів від агресії оксиду азоту (NO), накопичення якої підсилює нейротоксичність. Підвищення продукції NO пов'язане з індукцією NO-синтазою (iNOS), основними регуляторами якої є мелатонін, протизапальні цитокіни та індуктори оксидативного стресу. Зниження рівня NO під впливом мелатоніну, в тому числі за рахунок інгібування iNOS запобігає апоптозу та пригнічує фрагментацію ДНК нейронів. Це призводить до функціональних та структурних змін [3, 5].

Мелатонін зв'язує найтоксичніші гідроксильні радикали, пероксинітрил, NO, синглетний кисень та пероксильний радикал. Він є активним донором електронів і активно перехоплює активні форми кисню та знешкоджує радикали NO. Крім цього, він діє як вторинний антиоксидант, який стимулює активність глутатіон-пероксидази, яка перетворює перекис водню у воду, активує супероксиддисмутазу (СОД) і NOS та зв'язує іони металів з перемінною валентністю Fe²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, які мають прооксидантні властивості. Він взаємодіє практично з усіма субклітинними структурами, включно з ядром. Таким чином, мелатонін може бути однією з основних ланок у захисті організму від оксидативного стресу. Його антиоксидантні ефекти попереджають пошкодження нейроцитів різними агресивними продуктами деградації міжхребцевих дисків [3–5].

Метою роботи стало вивчення стану пероксидації ліпідів та антиоксидантного захисту при експериментальній дискогенній радикулоішемії у щурів та їх патогенетична корекція.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Моделювання дискогенної радикулоішемії. В експерименті використовували 30 щурів інбредної лінії Вістар масою (180,0±5,36) г. Тварин поділили на 5 груп по 6 щурів у кожній. Перша група (група порівняння) – інтактні тварини. Для відтворення дискогенної радикулоішемії у другій, третій, четвертій та п'ятій групах в експерименті проводили резекцію хвоста щура, з якого вилучали міжхребцевий диск та імплантували в хребцевий ка-

нал на рівні міжхребцевого диска L4-L5. Для проведення цих маніпуляцій тварин вводили у кетаміновий наркоз. У всіх щурів другої, третьої, четвертої та п'ятої груп розвивалась гостра радикулошемія, що проявлялась у порушенні рухової функції нижніх кінцівок, тобто парепарезом. Тварини в другій групі не отримували лікарські засоби. В третій групі тварини отримували альфа-ліпоєву кислоту (АЛК) у дозі 8,5 мг/кг діючої речовини у фізіологічному розчині підшкірно, в четвертій – водний розчин мелатоніну (Melaxen®, "Unifarm", USA) у дозі 30 мг/кг підшкірно, в п'ятій групі тварини отримували АЛК + мелатонін у вище приведені дози. На 10 добу щурам вводили надмірну дозу тіопенталу, що спричиняла смерть. Для оцінювання результатів експерименту вивчали стан показників оксидантної та антиоксидантної систем в крові [7–9].

Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), Гельсінської декларації (1964), уставу Української асоціації з біоетики і норм GLP (1992), Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експеримент відповідав вимогам Закону України № 3447-1 від 21. 02. 06 р. Про захист тварин від жорстокого поводження [10].

Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в крові оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА). Ак-

тивність СОД та каталази в крові визначали спектрометричним методом. Ферментативну активність NOS та кількість метаболітів NO визначали за модифікованим методом, запропонованим О. М. Ковальовою та співавт. (2007). Активність церулоплазміну визначали за методом Равіна з використанням субстрату парафенілендіаміну [11, 12]. Крім цього, вивчали рівень кортизолу в крові імуноферментним методом. Мелатонін у сироватці крові визначали імуноферментним методом за допомогою набору Melatonin ELISA KIT.

Статистичну обробку матеріалу здійснювали на основі формалізованих протоколів обстеження на персональному комп'ютері за допомогою програм Stat. Graphics і Excel з використанням традиційних методів параметричної та непараметричної статистики [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Відповідь організму на моделювання гострої радикулошемії проявляється розвитком пероксидації ліпідів і є ніщо інше як асептичне запалення (лейкоцитоз, еозинопенія, ШОЕ та ін.), а зміни деяких показників пероксидації (ДК, МДА в другій групі спостереження) як розгорнутий оксидативний стрес, комбінований зі стресом емоційної напруги, що представлено в таблицях 1–3. Клінічна картина експериментальної ДРІ, яку спостерігали у щурів, характеризувалась наявністю вираженого набряку та гіперемією оболонок поперекових корінців спинного мозку на рівні L4, L5 хребців, парепарезом задніх кінцівок та зниженням активності тварин, що виявлено при огляді тварин на другий день моделювання ДРІ.

Таблиця 1. Показники перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові експериментальних тварин та їх зміни під впливом лікарських засобів (M±m)

Показник	Група				
	перша (n=6)	друга (n=6)	третья (n=6)	четверта (n=6)	п'ята (n=6)
ДК (ммоль/л)	13,60±0,11	42,51±0,97*	15,47±0,36**	17,79±1,33**	13,21±1,14**
МДА (мкмоль/л)	6,95±0,29	9,80±0,43*	8,76±0,09**	7,91±0,15**	7,23±0,17**

Примітка. p<0,05; відмінності вірогідні: * – вірогідність різниці показників порівняно з інтактною групою; ** – вірогідність різниці показників порівняно з другою групою.

Таблиця 2. Показники антиоксидантної системи в сироватці крові експериментальних тварин та їх зміни під впливом лікарських засобів (M±m)

Показник	Група				
	перша (n=6)	друга (n=6)	третья (n=6)	четверта (n=6)	п'ята (n=6)
СОД (ум. од.)	5,21±0,23	2,77±0,18*	3,97±0,22**	4,09±0,13**	4,54±0,26**
NOS (нмоль/хв-мг білка)	6,31±1,52	29,11±2,11*	17,33±2,32**	13,22±1,89**	9,23±2,35**
Каталаза (ум. од.)	4,53±0,31	1,86±0,35*	3,07±0,14**	4,11±0,13**	3,63±0,25**
Церулоплазмін (мг/%)	29,13±2,2	61,21±3,9*	36,22±1,7**	34,19±1,5**	30,33±2,4**

Примітка. p<0,05; відмінності вірогідні: * – вірогідність різниці показників порівняно з інтактною групою; ** – вірогідність різниці показників порівняно з другою групою.

Таблиця 3. Показники гормонів сироватки крові експериментальних тварин та їх зміни під впливом лікарських засобів (M±m)

Показник	Група				
	перша (n=6)	друга (n=6)	третья (n=6)	четверта (n=6)	п'ята (n=6)
Кортизол (нмоль/л)	41,70±2,11	89,67±2,24*	46,12±1,49**	47,8±1,32**	43,68±1,44**
Мелатонін (пг/мл)	26,30±4,4	11,12±1,21*	14,15±1,11**	19,71±2,13**	23,95±3,24**

Примітка. p<0,05; відмінності вірогідні: * – вірогідність різниці показників порівняно з інтактною групою; ** – вірогідність різниці показників порівняно з другою групою.

З приводу оцінки дії NO, як головного нейромедіатора, необхідно сказати, що патологічна стимуляція нейронів супроводжується активацією iNOS та вивільненням NO, підвищення продукції якого супроводжується індукцією нітрозилуючого стресу, головним регулятором якого може бути мелатонін, що представлено в таблиці 3. Тобто інгібування iNOS мелатоніном знижує рівень NO та його нейротоксичні прояви, гальмує механізми запалення і апоптоз нейронів. Проведене дослідження показало підвищення рівня NOS в другій групі, порівняно з інтактними тваринами, та його зниження у третій і четвертій та особливо у п'ятій, після застосування АЛК у комбінації з мелатоніном, що представлено в таблиці 2. Крім цього, в таблиці 2 показано, що в другій групі експериментальних тварин у відповідь на модульоване запалення відмічається зниження показників ферментативного антиоксидантного захисту (СОД, каталаза) та підвищення активності церулоплазміну. Застосування АЛК в комбінації з мелатоніном сприяло нормалізації цих показників у третій–п'ятій групах спостереження, що представлено в таблиці 2.

Таким чином, отримані результати в період проведеного експериментального дослідження свідчать, що поряд з нітрозилуючим стресом, тобто підвищення агресії NO в результаті його накопичення, мають місце оксидативний та стрес емоційної напруги, на тлі яких відмічались генералізована активація ПОЛ та зменшення антиоксидантних ферментів: СОД, NOS, каталази та підвищення церулоплазміну. Введення АЛК експериментальним тваринами в третій, мелатоніну в четвертій та АЛК+мелатонін у п'ятій групах суттєво поліпшило показники АОЗ на 10 добу. Отримані результати дозволяють вважати патогенетично спрямованим застосування альфа-ліпоєвої кислоти + мелатоніну в терапії в умовах гострої та хронічної дискогенної радикулоїшемії.

ВИСНОВКИ 1. В умовах експериментальної гострої дискогенної радикулоїшемії у щурів мали місце зміни, які відображають посилення процесів окиснювального метаболізму та зниження антиоксидантного захисту. Ці зміни посилюються вторинним функціональним пошкодженням, яке проявляється розвитком парапарезу та розвивається впродовж доби.

2. На тлі застосування в експериментальній моделі альфа-ліпоєвої кислоти і мелатоніну в третій та четвертій групах відмічалось більш виражене покращення рухових функцій порівняно з другою групою. Це підтверджувалось лабораторними показниками оксидантного та антиоксидантного метаболізму, які отримували на 10 добу. Покращення цих показників, особливо в четвертій групі, пов'язано переважно з тим, що мелатонін має крім перерахованих властивостей ще й антистресорні.

3. Застосування альфа-ліпоєвої кислоти в комбінації з мелатоніном в експерименті дискогенної ра-

дикулоїшемії сприяло підсиленню та прискоренню нормалізації показників антиоксидантного захисту та зменшенню проявів парапарезу.

Перспективи подальшого дослідження Виявлені позитивні зміни в показниках оксидантно-антиоксидантної системи під впливом застосування альфа-ліпоєвої кислоти та мелатоніну в експериментальних тварин з дискогенною радикулоїшемією дають змогу екстраполювати їх у клінічну практику як засіб патогенетичної терапії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Поворознюк В. В. Боль в нижней части спины. Распространенность, причины, механизмы развития и особенности диагностики [Електронний ресурс] / В. В. Поворознюк // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2011. – 1 (1). – Режим доступу до журна. : <http://www.mif-ua.com/archive/issue-16166/>
2. Дослідження пероксидної оксидзації ліпідів та антиоксидантного захисту організму в клінічній практиці : методичні рекомендації. – Львів, 2002. – С. 19–24.
3. Погорелов В. В. Патогенетичні взаємозв'язки між оксидантною та антиоксидантною системами в розвитку дискогенної радикулоїшемії / В. В. Погорелов, В. І. Жуков // Експериментальна і клінічна медицина. – 2012. – № 2 (55). – С. 91–96.
4. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / [Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин и др.]. – Новосибирск : АРТА, 2008. – 284 с.
5. Тюпка Т. І. Стан пероксидації ліпідів та ефективність антиоксидантної терапії при експериментальному гінгівіті / Т. І. Тюпка, А. І. Лабунець // Вісник біології і медицини. – 2013. – Вип. 1, Т. 2 (99). – С. 166–168.
6. Парахонский А. П. Влияние мелатонина на иммунную систему / А. П. Парахонский // Современные наукоёмкие технологии. – 2007. – № 11. – С. 56–59.
7. Experimental model to study intervertebral disc herniation / A. de Suoza, L. Fernando, C. Amilcar, L. A. Helton // Rev. Bras. Orthop. – 2008. – Vol. 43, № 4.
8. Экспериментальные аспекты моделирования грыжи межпозвоночного диска / В. А. Радченко, Н. В. Дедух, Л. М. Бенгус, М. В. Шимон // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2011. – № 2. – С. 88–93.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 210–222.
10. Науково-практичні рекомендації з утриманням лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
11. Лабораторные методики для изучения состояния антиоксидантной системы организма и уровня перекисного окисления липидов // Методические рекомендации для докторантов, аспирантов, магистров, исполнителей НИР. – Харьков : ХГМУ, 2004. – 36 с.
12. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Сеней // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 16–18.
13. Гойко О. В. Практичне використання пакета STATISTIKA для аналізу медико-біологічних даних / О. В. Гойко. – К., 2004. – 76 с.

Отримано 10.01.14