

УДК 612.826+612.8.-009

В. А. Полясный, канд. мед. наук, доц.

АКТИВАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ МЕХАНИЗМОВ МОЗГА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КЕТОГЕННОЙ ДИЕТЫ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

УДК 612.826+612.8.-009

В. О. Полясный

АКТИВАЦІЯ АНТИОКСИДАНТНИХ МЕХАНІЗМІВ МОЗКУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ КЕТОГЕННОЇ ДІЄТИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Щурів-самців лінії Вістар утримували на кетогенній дієті (КД) протягом чотирьох тижнів. За цих умов спостерігалось збільшення вмісту небілкових тиолових груп у тканині гемісфер і мозочка (у 5,1 та 5,3 разу), а також підвищення вмісту білкових тиолових груп в мозочку (в 1,32 разу) порівняно з показниками у групі контролю. Застосування КД супроводжувалося зниженням вмісту фактора некрозу пухлин-альфа у тканині мозочка в 2,2 разу, а також тіобарбітурової кислоти реактивних продуктів (ТБКРП) у тканині гемісфер і мозочку в 2,0 та 1,47 разу. Під впливом КД у тканині мозку кіндлінгових щурів зменшувався вміст ТБКРП (на 65,3 %), а також дисульфідних груп — на 53,3 %, збільшувався рівень небілкових тиолових груп (на 49,4 %).

Ключові слова: кетогенна дієта, антиоксидантні механізми, тиоли, фактор некрозу пухлин-альфа, кіндлінг, судомна активність.

UDC 612.826+612.8.-009

V. A. Polyasny

ACTIVATION OF ANTIOXIDATIVE BRAIN MECHANISMS BY KETOGENIC DIET

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Male Wistar rats have been treated with ketogenic diet (KD) during four weeks. The increase of non-protein thiol groups both in hemispheres and cerebellum (by 5.1 and 5.3 times correspondently) have been noted. Thiol protein groups raised in cerebellum as well by 1.32 times when compared to intact rats (control). KD induced decrease of tumor necrosing factor alpha in cerebellum by 2.2 times as well as the decrease of thiobarbituric acid reactive products (TBARP) in hemispheres and cerebellum by 2.0 and 1.47 times. TBARP level was reduced in brain of kindled rats by 65.3%, while disulfide groups were reduced by 53.3% with KD diet. At the same time the level of protein thiol groups raised by 49.4%.

Key words: ketogenic diet, antioxidative mechanisms, thiols, tumor necrosing factor alpha, kindling, seizure activity.

Увеличение продукции свободных радикалов представляет собой существенный элемент патогенеза эпилептического синдрома [2; 5; 8; 9]. Соответственно, повышение антиоксидантного потенциала ткани головного мозга обеспечивает реализацию антиэпилептических механизмов, ограничение и подавление эпилептогенного возбуждения [1; 4]. Установлено, что активирование структур антиэпилептической системы мозга, в частности палеоцеребеллярной коры, сопровождается увеличением уровня тиоловых групп в ткани головного мозга крыс и подавлением патологически усиленного нейронального возбуждения [1].

Предполагается, что в основе противосудорожного действия кетогенной диеты (КД) может находиться повышение активности антиоксидантных механизмов [6]. С другой стороны, в основе действия КД лежат комплексные механизмы, включающие снижение функциональной активности системы провоспалительных цитокинов [10]. Ранее не проводилось исследований состояния прооксидантно-антиоксидантной системы мозга на модели

коразолового киндлинга в условиях применения КД.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей продукции перекисных соединений, состояния тиол-дисульфидной системы мозга киндлинговых крыс, а также уровня фактора некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа) у киндлинговых животных в условиях их содержания на КД.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–270 г, содержавшихся в течение 12 ч в условиях смены света и темноты, со свободным доступом к воде и пище в стандартных условиях вивария ОНМедУ. Исследования проводили в соответствии с требованиями GLP и комиссии биоэтики ОНМедУ (протокол № 84 от 10 октября 2008 г.).

Моделирование киндлинга осуществляли путем повторных ежедневных, на протяжении трех недель внутрибрюшинных (в/бр) введений коразола в подпороговой дозе (25,0 мг/кг) [4]. В исследовании использовали тех крыс, которые в

течение последних трех инъекций эпилептогена демонстрировали генерализованные судорожные реакции (всего 65 животных)

Кетогенная диета включала 80 % липидов, а также 3,3 % углеводов и 16,7 % белков [4]. Эффекты КД исследовали следующим образом: после завершения киндлинга в течение четырех недель животных удерживали на КД, после чего соответственно на 29-е сутки с момента начала КД вводили тестирующую дозу коразола (25,0 мг/кг, в/бр) и через 2,5 ч с момента применения эпилептогена осуществляли эвтаназию животных с последующим забором тканей для исследований. Группой контроля служили киндлинговые животные, которые в течение аналогичного срока находились в обычных условиях содержания и кормления и которым также осуществляли тестирующее введение коразола в аналогичных условиях.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрическим методом [7] по уровню вторичных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРП). Данные выражали в наномолях на грамм влажной ткани [7].

Уровень ФНО-альфа определяли иммуноферментным методом (ELISA). Ткань мозга быстро извлекали при 4 °С и замораживали на сухом льду. Гомогенаты готовили на холоду в фосфатном буферном растворе (5 г/мл), после чего их центрифугировали при 5000 об./мин в течение 10 мин и отбирали 100 мкл супернатанта для определения уровня цитокина, которое осуществляли с помощью селективных антител (“Biotrak”-система “Amersham Pharmacia Biotech”, Великобритания). Абсорбцию определяли спектрофотометрически при 450 нм. Точность определения составила 4,0 пг/мл. Данные выражали в пикограммах на миллиграмм влажной ткани.

Уровень тиолов осуществляли методом амперометрического титрования («Хемлаб-прибор», ТУ 25-11-364-69) с помощью азотнокислого серебра [3]. Принцип метода заключается в компенсации тиолами диффузионного электрического тока, который индуцирует Ag⁺ на поверхности платинового электрода. Для исследования небелковой фракции забирали 200 мкл супернатанта и добавляли 100 мкл 5 % метафосфоновой кислоты, после чего проводили центрифугирование при 3000 об./мин в течение 30 мин. Данные выражали в микромолях на литр гомогената.

Для статистической оценки результатов исследований применяли Mann–Whitney тест, а также метод ANOVA + Kruscal–Wallis тест.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение динамики содержания белковых тиоловых групп интактных крыс, содержав-

шихся на КД, показало незначительную тенденцию к увеличению их содержания как в ткани гемисфер, так и в ткани мозжечка в сравнении с интактными крысами — соответственно на 8,8 % (P>0,05) и 32,4 % (P<0,05; табл. 1). Со стороны дисульфидных групп отмечалась тенденция к снижению их содержания: в полушариях на 4,1 % и в мозжечке на 10,8 % (P>0,05). При этом в условиях применения КД регистрировалось достоверное, в сравнении с показателями у крыс группы контроля, увеличение содержания небелковых тиоловых групп, уровень которых в гемисферах был выше, чем в контроле, в 5,1 раза, а в ткани мозжечка – в 5,25 раза (P<0,05; см. табл. 1).

В гемисферах содержание белковых тиоловых групп и дисульфидных групп в мозжечке превышало соответствующие показатели, регистрировавшиеся в ткани гемисфер у интактных крыс в 1,6 и в 3,0 раза (P<0,05). На фоне применения КД достоверные различия сохранялись и соотношение аналогичных показателей составило соответственно 2,0 и в 2,8 раза (P<0,05; см. табл. 1).

У интактных крыс уровень ФНО-альфа в мозжечке превышал соответствующий показатель в гемисферах в 1,82 раза (P<0,05; табл. 2). Содержание ФНО-альфа в ткани гемисфер интактных животных, получавших КД, было меньше, чем в ткани мозжечка, на 25,2 % (P>0,05). В то же время в ткани мозжечка содержание ФНО-альфа уменьшалось в 2,2 раза (P<0,05; см. табл. 2).

Таблица 1

Содержание SH- и SS-групп в образцах ткани мозга в условиях применения кетогенной диеты, мкмоль/л гомогената, n=6

Вид SH- или SS-группы	Группа исследования	
	Контроль	КД
Ткань гемисфер		
Белковые SH-группы	34,2 (14,3–62,5)	37,2 (23,7–75,0)
SS-группы	12,3 (9,2–14,1)	11,8 (7,2–31,6)
Небелковые SH-группы	1,5 (1,0–2,1)	7,7 (1,8–9,5) [#]
Мозжечок		
Белковые SH-группы	55,2 (27,3–73,2)	73,1 (58,4–102,4) ^{##}
SS-группы	37,2 (19,5–59,2) [*]	33,2 (23,5–48,0) [*]
Небелковые SH-группы	1,2 (0–2,7)	6,3 (2,0–11,1) [#]

Примечание. [#] — P<0,05 в сравнении с контролем; ^{*} — P<0,05 в сравнении с данными исследований ткани гемисфер в той же группе (ANOVA + Kruscal–Wallis тест).

Таблица 2

Содержание фактора некроза опухолей-альфа в образцах ткани мозга в условиях применения кетогенной диеты, пг/мг влажной ткани

Группа	Интактные крысы (ткань гемисфер)	Киндлинг (мозжечок)
Контроль	26,47 (13,3–45,2) (n = 6)	48,3 (22,5–91,4)* (n = 7)
КД	19,8 (6,5–37,4) (n = 6)	22,1 (14,3–55,6)# (n = 6)

Примечание. * — $P < 0,05$ в сравнении с уровнем ФНО-альфа в ткани гемисфер; * — $P < 0,05$ в сравнении с данными исследований ткани гемисфер в той же группе контролем (ANOVA + Kruscall–Wallis тест).

Таблица 3

Содержание ТБКРП в образцах ткани мозга интактных крыс в условиях применения кетогенной диеты, нмоль/г

Группа	Ткань гемисфер	Мозжечок
Контроль	74,9 (32,2–102,6) (n = 7)	53,2 (28,2–63,7) (n = 6)
КД	37,1 (14,5–56,8)* (n = 7)	36,2 (24,2–71,2)* (n = 7)

Примечание. * — $P < 0,05$ — в сравнении с контролем (ANOVA + Kruscall–Wallis тест).

В условиях применения КД уровень ТБКРП в ткани гемисфер превышал таковой в ткани мозжечка интактных крыс на 40,8 % ($P > 0,05$). Содержание ТБКРП в ткани гемисфер на фоне содержания крыс на КД уменьшалось в два раза ($P < 0,05$; табл. 3), а в ткани мозжечка — в 1,47 раза в сравнении с соответствующими показателями в группе контроля ($P < 0,05$; см. табл. 3).

У крыс с коразол-индуцированным киндлингом в структурах полушарий мозга отмечалось увеличение содержания ТБКРП, которое на 75,6 % было выше показателя в группе контроля ($P < 0,05$; рис. 1). Кроме того, имело место снижение уровня небелковых тиоловых групп и увеличение уровня дисульфидных групп соответственно на 54,4 и на 33,7 % ($P < 0,05$). При содержании киндлинговых животных на КД уровень ТБКРП уменьшался на 65,3 % в сравнении с таковым у киндлинговых крыс ($P < 0,05$) и оставался более высоким, чем у интактных животных, на 10,3 % ($P > 0,05$). Содержание небелковых тиоловых групп увеличивалось и превышало их уровень в группе киндлинговых крыс на 49,4 % ($P < 0,05$). При этом их содержание было выше, чем у интактных крыс, на 15,8 % ($P > 0,05$). Уровень дисульфидных групп уменьшался на 53,3 % в сравнении с аналогичным показателем в группе киндлинговых животных ($P < 0,05$). Различия, в сравнении с группой интактных крыс, составили 19,6 % ($P < 0,05$; см. рис. 1).

Таким образом, в условиях применения КД у интактных крыс отмечается увеличение антиоксидантного потенциала ткани мозга, что проявляется в повышении уровня тиоловых белковых и небелковых групп, снижении содержания ТБКРП, а также количества дисульфидных групп. Данные эффекты отмечаются на фоне снижения уровня ФНО-альфа, содержание которого возрастает в условиях моделирования хронической эпилептизации мозга методом киндлинга, что представляет собой существенно важный патогенетический механизм эпилептического киндлингового синдрома [1; 4; 11].

Полученные результаты позволяют полагать, что реализация антиэпилептических эффектов КД осуществляется в связи со снижением активности эндогенной системы провоспалительных цитокинов. Следует отметить, что действие провоспалительных цитокинов сопровождается активированием прооксидантных механизмов мозга, повышением проницаемости нейрональных мембран и развитием эпилептогенных эффектов [5; 8]. Напротив, повышение антиоксидантного потенциала, в том числе за счет тиол-дисульфидной окислительно-восстановительной системы, представляет собой механизм подавления эпилептической активности [1].

Установленное в настоящем исследовании снижение содержания ТБКРП в структурах мозга киндлинговых крыс, вызываемое КД, может быть вторичным как по отношению к эф-

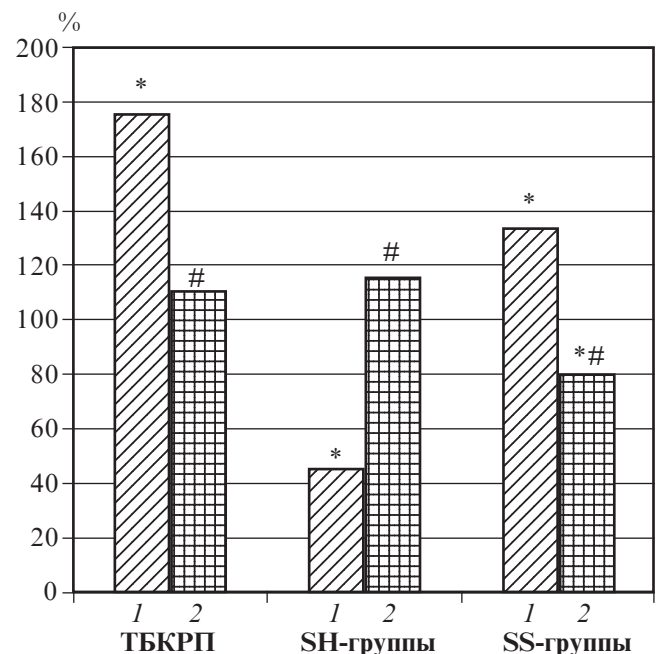


Рис. 1. Влияние кетогенной диеты на показатели про- и антиоксидантного контроля ткани мозга киндлинговых животных: 1 — киндлинг без лечения; 2 — киндлинг с применением КД; * — $P < 0,05$ в сравнении с показателем в группе интактных крыс; # — $P < 0,05$ в сравнении с показателем в группе киндлинговых животных без лечения (ANOVA + Newman–Keuls тест)

фекту снижения содержания провоспалительных цитокинов, вызываемого КД, так и по отношению к стимулируемому КД увеличению синтеза тиолсодержащих соединений в ткани мозга.

Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о возможности активирования антиэпилептической системы мозга в условиях применения КД, выражающееся в увеличении продукции тиоловых соединений, снижении уровня провоспалительных цитокинов в структурах мозга интактных и киндлинговых животных. Это предположение подтверждается ранее установленными эффектами активирования палеоцереbellлярной коры — составной части антиэпилептической системы мозга при ее электрической стимуляции, выразившимися в увеличении продукции тиоловых соединений в структурах мозга [1].

Выводы

1. Кетогенная диета вызывает увеличение продукции тиоловых групп, снижение дисульфидных групп в ткани мозжечка интактных животных на фоне снижения уровня фактора некроза опухолей-альфа и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

2. В полушариях головного мозга под влиянием КД отмечается увеличение продукции тиоловых небелковых групп и снижение содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой

3. Применение КД у киндлинговых животных вызывает снижение повышенного в связи с развитием хронического эпилептического синдрома содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, увеличение продукции небелковых тиоловых групп и снижение дисульфидных групп в ткани мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Моделирование* и механизмы подавления экспериментального эпилептического синдрома / Л. С. Годлевский, Е. В. Кобольев, В. Ф. Мустяца, Г. А. Дроздова. – Одесса : КПОГТ, 2010. – 350 с.
2. *Григорова И. А.* Изменение показателей оксидантно-антиоксидантной системы у больных с эпилептическими тонико-клоническими судорогами / И. А. Григорова, А. Р. Ескин, Л. В. Тихонова // *Вісник психіатрії та психофармакотерапії.* – 2006. – № 2 (10). – С. 127–129.
3. *Соколовский В. В.* Тиосульфидное соотношение крови как показатель состояния специфической резистентности организма / В. В. Соколовский. – СПб., 1996. – 33 с.
4. *Шандра А. А.* Киндлинг и эпилептическая активность / А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. И. Брусенцов. – Одесса : Астропринт, 1999. – 270 с.
5. *Devi P. U.* Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researches / P. U. Devi, A. Manocha, D. Vohora // *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* – 2008. – Vol. 9, N 18. – P. 3169–3177.
6. *Ketogenic diet: effects on expression of kindled seizures and behavior in adult rats* / A. Hori, P. Tandon, G. L. Holmes, C. E. Stafstorm // *Epilepsia.* – 1997. – Vol. 38, N 7. – P. 750–758.
7. *Ohgawa H.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohgawa, N. Ohishi, K. Yagi // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95, N 2. – P. 351–358.
8. *Role of oxidative stress in epileptic seizures* / E. J. Shin, J. H. Jeong, Y. H. Chung [et al.] // *Neurochem. Internat.* – 2011. – Vol. 59, N 2. – P. 122–137.
9. *Sharma A.* Oxidative stress after lithium – pilocarpine induced status epilepticus in mice brain / A. Sharma, R. Sandhir // *Annals of Neurosci.* – 2006. – Vol. 13, N 1. – P. 1–4.
10. *The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects* / J. Freeman, P. Veggiotti, G. Lanzi [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2006. – Vol. 68. – P. 145–180.
11. *TNF- α in cerebral cortex and cerebellum is affected by amygdalar kindling but not by stimulation of cerebellum* / L. S. Godlevsky, A. A. Shandra, A. A. Oleinik [et al.] // *Polish J. of Pharmacology.* – 2002. – Vol. 54. – P. 655–660.

УДК 616.1:616-006

Д. Г. Гавриченко

РОЛЬ ПРОДЛЕННОЙ ЭПИДУРАЛЬНОЙ АНЕСТЕЗИИ В ПРОФИЛАКТИКЕ ТРОМБОГЕМОРАГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ НА ПЕРИОПЕРАЦИОННОМ ЭТАПЕ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

УДК 616.1:616-006

Д. Г. Гавриченко

РОЛЬ ПРОДОВЖЕНОЇ ЕПІДУРАЛЬНОЇ АНЕСТЕЗІЇ В ПРОФІЛАКТИЦІ ТРОМБОГЕМОРАГІЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ НА ПЕРІОПЕРАЦІЙНОМУ ЕТАПІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК ЕНДОМЕТРІЯ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

У статті висвітлено питання тромбогеморагічних ускладнень в онкогінекологічних хворих з екстирпацією матки на етапах хірургічного лікування. Досліджено 88 хворих на рак тіла матки, шийки матки і яєчників, яким була проведена екстирпація матки за період з 2008 по 2010 рр. Ви-