

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

УДК 546.295:612.823:612.015.3:599.323.4.001.6

И. А. Хлусов, С. А. Наумов, В. Ю. Серебров, Б. А. Локтюшина

ВЛИЯНИЕ КСЕНОНА НА СОСТАВ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ

Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ
НИИ курортологии и физиотерапии МЗ РФ, Томск

Наркотические свойства ксенона (Xe) известны с 1946 года, а в анестезиологии первое его применение зафиксировано в 1951 году. Тем не менее до сих пор механизмы наркотического действия Xe остаются неясными. В данной работе на мышцах-самцах линии BALB/c изучено состояние и спектр липидов в мозговой ткани при воздействии ксенона *in vitro* и *in vivo*. Оказалось, что прямое действие ксенона на мозговую ткань тормозит скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ) в экстремальных условиях жизнедеятельности клеток (бедная культуральная среда). Таким образом, Xe способствует адаптации клеток мозга к стресс-фактору. Однако отмена ксенон-кислородной смеси (70:30) приводила к кратковременному усилению процессов ПОЛ. При этом обратимая деградация липидного бислоя мембран клеток мозга реализуется, по-видимому, на внутриклеточном и внеклеточном уровнях посредством прямого воздействия кислорода, активации фосфолипаз и характеризуется усилением продукции свободных радикалов через лиганд-рецепторные взаимодействия, клетки микроокружения и иммунного надзора. Для предотвращения данных эффектов ксеноновая терапия и анестезия требуют профилактического и терапевтического применения антиоксидантных фармакологических препаратов.

Ключевые слова: инертный газ, перекисное окисление липидов, мозг, *in vitro*

Ксенон – инертный газ, не подвергающийся биотрансформации, слабо растворимый в жидких средах организма, быстро элиминирующийся преимущественно через легкие [6]. Несмотря на то что наркотические свойства ксенона (Xe) известны с 1946 года [20], а в анестезиологии первое применение зафиксировано в 1951 году [6], до сих пор механизмы его наркотического действия остаются неясными [4]. Вследствие биохимической инертности Xe не обладает острой и хронической токсичностью [18], тератогенностью и эмбриотоксичностью, не является аллергеном [23], не нарушает целостность структур мозга [34], что затрудняет расшифровку эффектов на клеточном и субклеточном уровнях. Известно прямое блокирующее влияние газа на нервные клетки [29], реализующееся, по-видимому, через изменение биохимического состава клеточных мембран [30], так как Xe обладает высокой растворимостью в липидах [27].

В связи с этим изучение состояния и спектра липидов в мозговой ткани при воздействии ксенона *in vitro* и *in vivo* вызывало несомненный интерес.

Методика. Эксперименты проводились на 26 мышцах-самцах линии BALB/c массой 18–20 г. В исследованиях *in vivo* по 10 животных под-

вергались воздействию кислородовоздушной (30:70) либо ксенон-кислородной (70:30) смеси в закрытом объеме в течение 45 мин. Анестезированных и интактных (n=6) мышей декапитировали, извлекали из черепной коробки мозг и помещали в инкубационную среду, содержащую 50 мМ трис-HCl буфера, 0,25 М сахарозного буфера при pH=7,4. В исследованиях *in vitro* из головного мозга интактных животных готовили срезы и продували кислородовоздушной (30:70) либо ксенон-кислородной (70:30) смесью в течение 45 мин. Непосредственно после воздействия, через 1 и 3 часа в гомогенатах и супернатантах срезов мозга определяли состав липидов и содержание малонового диальдегида (МДА).

Для определения спектра и количества (г/л) липидов методом тонкослойной хроматографии [7] 100 мг ткани мозга заливали 8 мл инкубационной среды, гомогенизировали, процеживали, фильтрат центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. К осадку добавляли 3–5 мл реактива Фолча и 40 мкл концентрированной соляной кислоты, встряхивали в течение 15 мин и центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 5 мин. Собирали супернатант и добавляли 1/5 от его объема 50 мМ хлорида кальция. Центрифугировали, как описано выше; верхнюю фазу уда-

ляли, нижнюю выпаривали и сухой остаток разводили каплей реактива Фолча; наносили на хроматографическую пластинку. Фракционирование фосфолипидов проводили в хроматографических камерах в смеси хлороформ-метанол-ледяная уксусная кислота-вода (60:25:1:3), нейтральных липидов – в системе гексан-диэтиловый эфир-метанол-ледяная уксусная кислота (90:20:3:2). После высушивания пластин их окрашивали 10% раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле путем разбрызгивания из пульверизатора с последующим прогреванием при 100°C в течение 5 мин. Количественную обработку хроматограмм осуществляли при помощи компьютерных приложений.

Определение концентрации (мкМ/чг_{липидов}) МДА проводили в тесте с 0,8% тиобарбитуровой кислотой по образованию окрашенного комплекса, содержащего 1 молекулу МДА и 2 молекулы кислоты с последующим колориметрированием при длине волны 532 нм [7].

Статистическую обработку результатов осуществляли согласно U-критерию Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ [10].

Результаты. Воздействие на вещество головного мозга кислородвоздушной смесью как *in vivo*, так и *in vitro* (табл. 1) приводило в динамике эксперимента к статистически значимому нарастанию в ткани уровня малонового диальдегида, продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран, ускоряющего старение клеток, точно отражающего интенсивность процесса в изолированных системах [3]. Известно, что свет и повышение концентрации кислорода усиливают окисление фосфолипидов [8]. При этом уровень МДА увеличивался как в цитоплазматической мембране, так и внутри клетки, по-видимому, вследствие обусловленного стрессом интенсивного окисления и набухания липидных слоев клеточных органелл, прежде всего митохондрий [14].

Поскольку ткань мозга, особенно богатая фосфолипидами [8], культивировалась в обедненной культуральной среде без антиоксидантов и макроэргов, можно предполагать, что прогрессирование перекисного окисления липидов имеет в системе *in vitro* необратимый характер и закончится в конечном итоге гибелью клеток [37] путем апоптоза либо, что более вероятно для выбранных экспериментальных условий, посредством некроза [36]. Так, уменьшение (в 1,5–2,5 раза; $P < 0,05$) содержания фосфатидилинозитола в динамике культивирования (табл. 2) может быть связано с прямой и опосредованной через образование инозиттрифосфата активацией ферментов (фосфатидилинозитол-3-киназа, протеинкиназа C), участвующих при неблагоприятных условиях в реализации клеточной смерти [25]. О деградации мембран свидетельствовало также увеличение содержания лизофосфолипидов с постоянной скоростью около 0,24 г/л в час (рис. 1). При этом в каждый последующий срок величины показателя статистически значимо превышал предыдущие значения (табл. 2).

Лизофосфолипиды – метаболиты фосфолипидов, образующиеся при активации фосфолипаз, в больших концентрациях весьма токсичны для клеточных мембран [5, 8]. В наших экспериментах субстратом образования лизофосфолипидов могли быть фосфатидилинозитол, в меньшей степени фосфатидилсерин(холин) и сфингомиелин (табл. 2). В норме существует асимметрия расположения фракций липидов в наружном и внутреннем слоях клеточных мембран, имеющая важное значение для их функционирования. Фосфатидилхолин и сфингомиелин локализуются преимущественно в наружном липидном слое; фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол – во внутреннем. Содержание холестерина увеличивается по направлению к наружной стороне цитоплазматической мембраны [1, 8, 13, 19]. Поэтому зафиксированное падение уровней фосфолипидов в сочетании

Таблица 1

Содержание (мкМ/чг) малонового диальдегида в мозговой ткани мышей, подвергшейся воздействию ксенон-кислородной смеси *in vivo* и *in vitro*, X

| Время исследования, ч | Группы | Супернатанты срезов головного мозга | | Гомогенаты мозговой ткани | |
|-----------------------|----------|-------------------------------------|--|----------------------------|--|
| | | Воздействие <i>in vivo</i> | Воздействие <i>in vitro</i> , $\times 10^{-3}$ | Воздействие <i>in vivo</i> | Воздействие <i>in vitro</i> , $\times 10^{-3}$ |
| 0 | Контроль | 0,700 | 38 | 0,433 | 110 |
| | Ксенон | 1,367 | 0,5 * | 0,944 * | 54 |
| 1 | Контроль | 1,633 # | 72 # | 2,722 # | 160 |
| | Ксенон | 2,444 | 140 ** | 1,833 * | 142 # |
| 3 | Контроль | 1,956 # | 140 # | 3,189 # | 270 |
| | Ксенон | 1,944 | 70 ** | 3,400 # | 174 ** |

Примечание. Контроль – воздействие кислородвоздушной смеси. # – отмечены достоверные различия ($P < 0,05$) с точкой 0; * – с контролем, согласно U-критерию Манна–Уитни.

Таблица 2

Содержание (г/л) нейтральных липидов и фосфолипидов в мозговой ткани мышей в различные сроки после воздействия ксенон-кислородной смеси, X

| Время исследования, ч | Группы | Лизофосфолипиды | Сфингомиелин | Фосфатидилы | | | Холестерин | Триглицериды |
|-----------------------|----------|-----------------|--------------|-------------|---------------|------------|------------|--------------|
| | | | | Инозитол | Холин (серин) | Этаноламин | | |
| 0 | Контроль | 0,238 | 0,329 | 0,637 | 0,330 | 0,430 | 2,220 | 1,260 |
| | Ксенон | 0,560 * | 0,360 | 0,700 | 0,300 | 0,180 | 2,430 | 1,215 |
| 1 | Контроль | 0,688 # | 0,343 | 0,270 # | 0,274 | 0,535 | 2,420 | 1,103 |
| | Ксенон | 0,323 ** | 0,231# | 0,346 # | 0,470* | 0,375 # | 2,700 | 1,497 |
| 3 | Контроль | 0,990 # | 0,250 | 0,427 # | 0,220 | 0,470 | 1,900 | 1,320 |
| | Ксенон | 0,775 ** | 0,195 # | 0,354 # | 0,655** | 0,850 ** | 3,037 * | 1,490 |

Примечание. Контроль – воздействие кислородвоздушной смеси. # – отмечены достоверные различия ($P < 0,05$) с точкой 0; * – с контролем, согласно U-критерию Манна–Уитни.

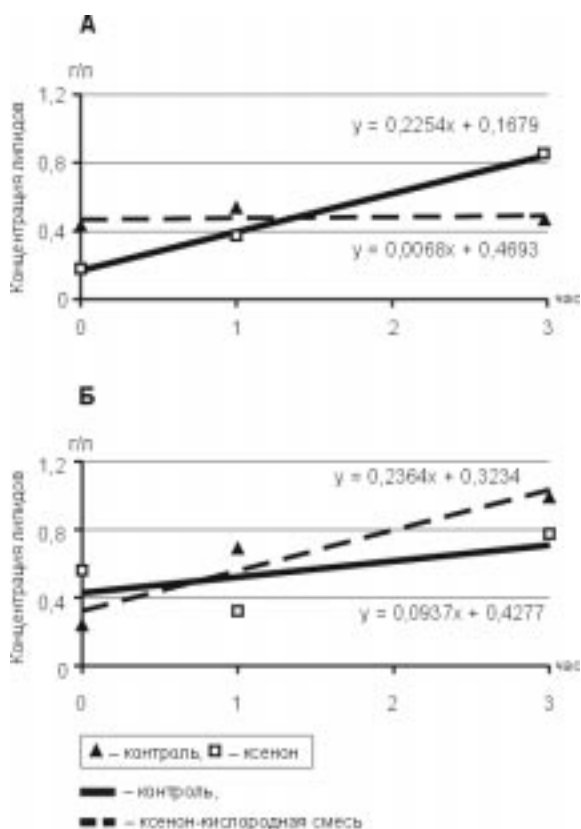


Рис. 1. Уровни фосфатидилэтаноламина (А) и лизофосфолипидов (Б) в мозговой ткани мыши BALB/c в различные сроки после воздействия ксенон-кислородной смеси

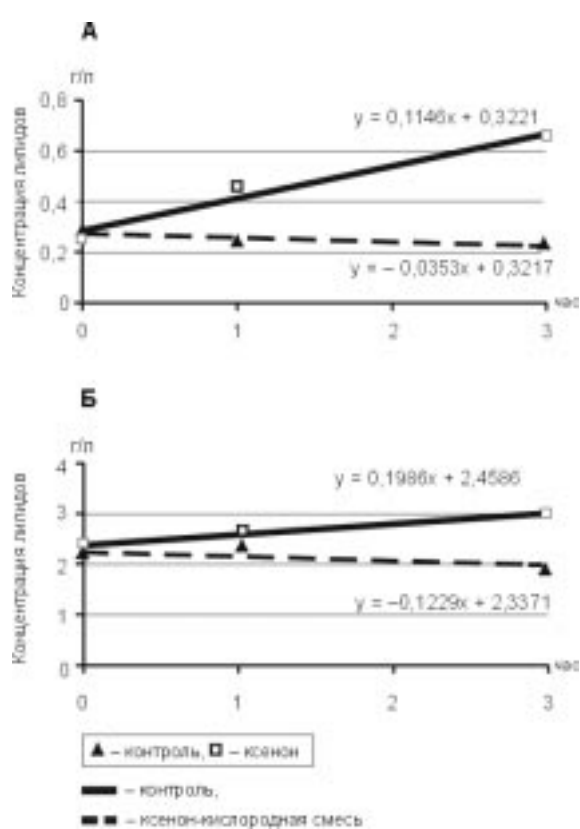


Рис. 2. Содержание фосфатидилхолина (серина) (А) и холестерина (Б) в мозговой ткани мышей BALB/c в различные сроки после воздействия ксенон-кислородной смеси

с высокой концентрацией МДА в ткани мозга могло быть маркером активного двустороннего окисления липидов мембран, преимущественно внутреннего слоя, вызывающего нарушения функций клетки в целом [2, 16].

Известно, что при усилении ПОЛ клетка защищается увеличением синтеза и ресинтеза фракций липидов и холестерина, повышающих микровязкость мембран [11]. Однако концентрация холестерина в мембранах при продувании кислородвоздушной смеси статистически не ме-

нялась в динамике эксперимента (табл. 2, рис. 2), что при высоком уровне МДА может говорить об увеличении проницаемости мембран клеток [17], приводящем к их лизису в культуре [13]. По-видимому, использованные в работе экстремальные факторы превышали компенсаторные возможности клеток мозга.

Прямое воздействие ксенона на нервную ткань в системе *in vitro* вызывало снижение уровня МДА (табл. 1). Протекторное действие инертного газа при исследовании гомогенатов моз-

говой ткани носило длительный характер с достижением статистических различий через 3 часа после воздействия. Вероятно, ксенон стабилизирует внутриклеточные процессы вследствие диполь-дипольного взаимодействия с молекулами свободной воды и образования конгломератов (микрорекристаллов клатратного типа), приводящих к снижению ее подвижности. На уровне нейрона, состоящего на 78% из воды и на 12% из липидов, это приводит к стабилизации мембран, сопровождающейся блокированием ионных каналов, снижением их электропроводности и возбудимости [4, 6].

В то же время обусловленная ксеноном регуляция концентрации МДА в супернатантах срезов головного мозга имела неоднозначный характер (табл. 1). На фоне значительного снижения уровня субстрата (точки 0 и 3 часа) через 2 часа после продувания инкубационной среды ксенон-кислородной смесью наблюдался овершут с двукратным увеличением показателя по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Увеличение МДА в межклеточном пространстве является маркером окисления наружного липидного слоя и может быть связано как с нейронами, так и другими клетками, присутствующими в срезах головного мозга. По крайней мере значительное количество МДА в инкубационной жидкости при ксеноновом наркозе *in vivo* (табл. 1, точки 0 и 1 час), увеличивающем мозговой кровоток [28], частично может быть обусловлено окислением мембран клеток крови.

Кратковременное и мощное повышение содержания МДА в инкубационной жидкости *in vitro* позволяет считать наиболее вероятной его причиной “респираторный взрыв” нейтрофилов, клеток системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов/макрофагов, микроглиальных клеток) [12], обусловленный кислородом и возникающий, по-видимому, в результате снятия блокирующего влияния ксенона после его естественного удаления из культуры. Это сопровождается продукцией свободных радикалов, перекисей и окиси азота в межклеточное пространство [24], стимулирующих перекисное разрушение мембран нервных и других типов клеток.

С другой стороны, сразу после воздействия ксенон-кислородной смеси *in vivo* (точка 0) отмечалось непродолжительное повышение (по сравнению с кислородовоздушной смесью) концентрации лизофосфолипидов в мембранах (на 135%, $P < 0,05$) и продукта ПОЛ в гомогенате тканей мозга (на 118%; $P < 0,05$) (табл. 1, 2).

Хотя на уровне макроорганизма не выявлены побочные эффекты ксенона [18], на клеточном уровне, по-видимому, существует период последействия, связанный с его отменой и сопровождающийся кратковременным усилением свободнорадикальных процессов. Так, некоторое паде-

ние содержания фосфатидилэтаноламина (табл. 2) могло быть обусловлено активацией фосфолипазы D, обнаруженной в растворимой фракции и микросомах мозговых клеток и расщепляющей субстрат с отделением этаноламина [8] как источника оксида азота [39]. В системе *in vivo* отмена ксенона, являющегося антагонистом NMDA (N-methyl-D-aspartate)-рецепторов [21], может реализоваться их сенситизацией к субстратам (глутамат, аспартат), гиперактивацией с увеличением концентрации внутриклеточного мессенджера (оксида азота, NO), запускающего ПОЛ самостоятельно и совместно с активными формами кислорода (через образование пероксинитрита ONOO⁻) [24, 26, 35].

NMDA-рецепторы располагаются на мембране нейронов, микроглиальных клеток, нейтрофилов и моноцитов/макрофагов [24], поэтому ПОЛ будет протекать как внутри, так и снаружи липидного бислоя за счет прямых и опосредованных через микроокружение эффектов.

В то же время кратковременность усиления ПОЛ после воздействия ксенона и кислорода, в отличие от кислородовоздушной смеси, говорит о способности мозговых клеток адаптироваться к экстремальным условиям. Через 3 часа после прямого и опосредованного воздействия ксенона на головной мозг уровни МДА либо достоверно снижены, либо не отличаются от контрольного уровня (табл. 1); скорость прироста лизофосфолипидов составляет 40% таковой в контроле (рис. 1). При этом клетки после отмены ксенона адекватно реагировали на усиление ПОЛ повышением в липидном бислое содержания фосфатидилсерина(холина), фосфатидилэтаноламина и холестерина (рис. 1, 2), что сохраняет упорядоченность состава липидов, необходимую для рационального функционирования клеток, даже в обедненной культуральной среде.

Подобный “адаптогенный” эффект ксенона на клеточном уровне базируется, вероятно, на толерантной (гипобиотической) стратегии адаптации [9] к стрессу (голодание клеток+гипероксигенация), усиливающему процессы ПОЛ [14]. Это может лежать в основе выявленных у благородного газа радиопротекторных свойств [15], способности ограничивать инфаркт миокарда [31] и реакцию стресса со стороны других систем жизнеобеспечения человека [38].

Добавление антиоксидантов в профилактическом и терапевтическом режимах может нивелировать свободнорадикальные процессы, активирующиеся после отмены ксенона, и, таким образом, оптимизировать ксеноновую терапию и анестезию. Даже в том случае, если повышение уровня фосфатидилсерина, обусловленное ксеноном, реализуется на наружной стороне цитоплазматической мембраны, что является биохимическим маркером апоптоза [19, 33], для тка-

ней, находящихся в экстремальных условиях, данную форму гибели клеток можно считать позитивной по сравнению с некрозом, так как она не сопровождается интенсивным воспалением и генерализацией процесса [22, 32].

Выводы. Прямое действие ксенона на клетки мозговой ткани тормозит скорость ПОЛ в экстремальных условиях жизнедеятельности.

Отмена ксенон-кислородной смеси приводит к кратковременному усилению процессов ПОЛ. Обратимая деградация липидного бислоя мембран клеток мозга может реализоваться на внутриклеточном и внеклеточном уровнях посредством прямого воздействия кислорода, активации фосфолипаз и характеризуется, по-видимому, усилением продукции свободных радикалов через лиганд-рецепторные взаимодействия, клетки микроокружения и иммунного надзора.

Ксенон способствует адаптации клеток мозга к неблагоприятным условиям жизнедеятельности.

В целях предотвращения побочных эффектов ксеноновая терапия и анестезия требуют профилактического и терапевтического применения антиоксидантных фармакологических препаратов.

Исследования поддержаны Томским региональным некоммерческим фондом "Сибирь без наркотиков и болезней. Новые медицинские технологии".
Благодарим за содействие.

XENON EFFECT ON COMPOSITION AND PEROXIDATION OF LIPIDS IN MICE BRAIN

I.A. Khlusov, S.A. Naumov, V.Yu. Serebrov, B.A. Loktyushina

The Xenon (Xe) anesthetic properties have been known since 1946 and its first using in anesthesiology fixed in 1951. Nevertheless the mechanisms of Xe anesthetic influence are not clear still. In this study a state and spectrum of lipids in brain tissue affected by Xe in vitro and in vivo have been studied on BALB/c male mice. The Xe direct effect on brain was found to block the rate of lipid peroxidation (LPO) under extreme conditions of cell life activity (poor cultural medium). Thus Xe promotes the brain cells adaptation to the stress factor. However the Xe-oxygen mixture (70:30) abolition led to short-term acceleration of LPO processes. For all this reversible degradation of brain cells membranes lipid bilayer is apparently realized on intracellular and extracellular levels by means of direct action of oxygen, phospholipase activity and is characterized by enhancing production of free radicals through ligand-receptor interactions, microenvironment, and immune cells. To prevent these effects Xe therapy and anesthesia are in need of prophylactic and therapeutic employment of antioxidant pharmacological drugs.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия человека / Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэл В. М., 1993.

2. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М., 1985.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
4. Годин А.В., Титов В.А., Стамов В.И. и др. // Анестезиология и реаниматология. 1999. № 5. С. 56–59.
5. Грибанов Г.А. // Вопр. мед. химии. 1991. № 4. С. 2–10.
6. Дамир Е.А., Буров Н.Е., Макеев Г.Н., Джабаров Д.А. // Анестезиология и реаниматология. 1996. № 1. С. 71–75.
7. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск, 2000.
8. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб., 1999.
9. Кулинский В.И., Ольховский И.А. // Успехи современной биологии. 1992. Т. 112. Вып. 5–6. С. 697–713.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1990.
11. Мажуль Л.М., Давидович К.К., Гулько В.В. // Вопр. мед. химии. 1990. № 4. С. 10–11.
12. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, 1989.
13. Молекулярная биология клетки / Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. М., 1986. Т. 2.
14. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск, 1983.
15. Тестов Б.В., Ефимов В.В., Сурнин А.Г. // Третье рабочее совещание "Новые медицинские технологии", 12–15 ноября 2000 г., Томск–Москва, 2000. С. 35–39.
16. Эритроциты и злокачественные новообразования / Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е. и др. Томск, 2000.
17. Bretscher M.S., Munro S. // Science. 1993. Vol. 261. P. 1280–1281.
18. Burov N.E., Makeev G.N., Potapov V.N. // Applied Cardiopulmonary Pathophysiology. 2000. Vol. 9. P. 132–133.
19. Fadok V.A., Bratton D.L., Frasch C. et al. // Cell Death and Differentiation. 1998. Vol. 5. P. 551–562.
20. Ferrari A., Erdmann W., Del Tacca M. et al. // Applied Cardiopulmonary Pathophysiology. 1998. Vol. 7. P. 153–155.
21. Goto T. Xenon anesthesia – results from human studies // Applied Cardiopulmonary Pathophysiology. 2000. Vol. 9. P. 129–131.
22. Haslett C. // British Medical Bulletin. 1997. Vol. 53. P. 669–683.
23. Joyce J.A. // AANA J. 2000. Vol. 68. № 3. P. 259–264.
24. Kobayashi H., Suzuki T., Saito S. et al. // Toxicology & Ecotoxicology News / Reviews. 1997. Vol. 4. № 1. P. 15–19.
25. Lavin M.F., Watters D., Song Q. // Experientia. 1996. Vol. 52. P. 979–994.
26. Linn W.S., Wong K.Y. // FASEB Journal. 1995. Vol. 9. P. 1147–1156.
27. Marx T., Wagner D., Baeder S. et al. // Applied Cardiopulmonary Pathophysiology. 1998. Vol. 7. P. 215–221.
28. Marx T., Kotzerke J., Musati S. et al. // Applied Cardiopulmonary Pathophysiology. 2000. Vol. 9. P. 91–96.

29. Miyazaki Y., Adachi T., Utsumi J. et al. // *Anesth Analg.* 1999. Vol. 88. P. 893.
30. Natale G., Ferrari E., Pellegrini A. et al. // *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology.* 1998. Vol. 7. P. 227–233.
31. Preckel B., Mullenheim J., Moloschavij A. et al. // *Anesth Analg.* 2000. Vol. 91. P. 1327–1332.
32. Samali A., Gorman A.M., Cotter T.G. // *Experientia.* 1996. Vol. 52. P. 933–941.
33. Savill J. // *British Medical Bulletin.* 1997. Vol. 53. P. 491–508.
34. Schmidt M., Papp-Jambor C., Schirmer U. et al. // *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology.* 2000. Vol. 9. P. 87–90.
35. Sies H., de Groot H. // *Toxicology Letters.* 1992. Vol. 64/65. P. 547–551.
36. Tan S., Wood M., Maher P. // *J. of Neurochemistry.* 1998. Vol. 71. P. 95–105.
37. Tong L., Toliver-Kinsky T., Taglialatela G. et al. // *J. of Neurochemistry.* 1998. Vol. 71. P. 447–459.
38. Vovk S., Lukinov A.V., Naoumov S.A. et al. // *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology.* 2000. Vol. 9. P. 169.
39. Wink D.A., Cook J.A., Pacelli R. et al. // *Toxicology Letters.* 1995. Vol. 82/83. P. 221–226.