

## ПРЯМАЯ ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСА И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ПОДКЛЮЧЕНИИ ОСЕВОГО НАСОСА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

*Кунцевич Н.В., Иткин Г.П., Коньшова Е.Г., Макарова Л.В., Шевченко О.П.*

ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»  
Минздравсоцразвития РФ, г. Москва

Оксидативный стресс возникает при нарушении баланса между активными формами кислорода (супероксид анион, перекись водорода, гидроксильные радикалы азота и др.) и антиоксидантной способностью. Целью работы явилось изучение параметров оксидативного статуса и антиоксидантной защиты при подключении осевого насоса у экспериментальных животных. Исследование проведено на 7 телятах в возрасте от 110 до 130 дней и массой тела от 95 до 105 кг. Прямую оценку оксидативного стресса (FORT) и антиоксидантной защиты (FORD) проводили на анализаторе «FORM Plus CR3000» («Callegary», Италия). У здоровых животных показатели оксидативного равновесия отличаются от таковых у человека. FORT у телят ниже ( $0,42 \pm 0,11$  против  $1,74 \pm 0,32$  ммоль/л  $H_2O_2$ , соответственно,  $p < 0,05$ ), а показатель FORD/FORT выше ( $3,92 \pm 1,30$  и  $1,33 \pm 0,27$ , соответственно,  $p < 0,05$ ), что необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментальных и клинических исследований. У трех телят в условиях эксперимента при подключении осевого насоса максимальные значения параметров оксидативного стресса наблюдались на 1–3-и сутки с последующей их нормализацией. Прямая оценка параметров оксидативного стресса может быть использована для контроля адекватности вспомогательного кровообращения в эксперименте.

*Ключевые слова:* оксидативный стресс, осевой насос, экспериментальные исследования.

## DIRECT EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT DEFENSE PARAMETERS IN EXPERIMENT WITH THE AXIAL PUMP

*Kuncevich N.V., Itkin G.P., Konyshova E.G., Makarova L.V., Shevchenko O.P.*

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

It is established that increased parameters of oxidative stress result from an imbalance between reactive oxygen molecules and endogenous antioxidants. Oxidative stress parameters may be considered to be biomarkers of heart failure. The aim of our study was to assess oxidative stress and antioxidant system parameters in experimental model with the axial pump. Our study included 7 calves (the mean age 120.33 days, the mean weight 99.17 kg). We used «FORM Plus CR3000» analyzer (Callegary, Italy) and heparinized venous blood samples for the evaluation of the oxidative status (FORT test) and the total antioxidant capacity (FORD test). In healthy animals oxidative system parameters differ from those in humans (FORT –  $0.42 \pm 0.11$  versus  $1.74 \pm 0.32$  mmol/l  $H_2O_2$ ; FORD/FORT –  $3.92 \pm 1.30$  versus  $1.33 \pm 0.27$ ,  $p < 0.05$ ) what should be taken into consideration when interpreting the results of clinical and experimental studies. In three calves with experimental assisted circulation maximal oxidative stress values were observed on 1–3 days after the axial pump connection with the subsequent normalization of these parameters. Direct evaluation of oxidative stress parameters may be used as monitoring tool for estimation of assisted circulation adequacy in experiment (animal model).

*Key words:* oxidative stress, axial pump, calves.

*Статья поступила в редакцию 6.06.11 г.*

**Контакты:** Кунцевич Надежда Викторовна, к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории клинической и экспериментальной биохимии ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова».

**Тел.** 8 (499) 190 53 41, **e-mail:** transplant2009@mail.ru

Ежегодно тысячи пациентов с терминальной стадией сердечно-сосудистых заболеваний нуждаются в трансплантации сердца. Вследствие нехватки донорских органов многим из них требуется применение устройств вспомогательного кровообращения, предназначенных для снижения механической нагрузки и обеспечения возможности регенеративных процессов в пораженном сердце, а также для поддержания необходимого уровня гемодинамики. Показана высокая эффективность использования осевых насосов как в качестве заместительной терапии, так и в качестве моста к трансплантации сердца [18].

В эксперименте, а также в многочисленных клинических исследованиях показано повышение активности оксидативных реакций при хронической сердечной недостаточности, ишемии – реперфузии, в условиях искусственного кровообращения и при различных вариантах вспомогательного кровообращения [9, 13, 14].

Оксидативный стресс возникает при нарушении баланса про- и антиоксидантных систем в организме: повышенной продукции как внутри, так и вне клетки активных форм кислорода, азота, снижении антиоксидантной способности. При этом свободные радикалы повреждают белки, липиды и нуклеиновые кислоты [10, 11]. Накопление окисленных или нитрозилированных продуктов приводит к потере клеткой энергии, нарушению сигнальной, транспортной и других важных функций, что может вызывать гибель клетки через некротические или апоптотические механизмы [15]. Окислительный стресс является универсальным механизмом, играющим ключевую роль в патогенезе различных заболеваний сердца, сосудов, а также других органов [8, 12, 20].

Активные формы кислорода могут повреждать эндотелий сосудов и снижать секрецию оксида азота, что ведет к усугублению дисфункции эндотелия, проявляющейся усиленной вазоконстрикцией, гиперкоагуляцией и пролиферацией гладкомышечных клеток. Кроме того, свободные радикалы повреждают кардиомиоциты и способствуют структурной модификации с последующим ремоделированием миокарда, что приводит к ухудшению его сократительной функции. Мощным фактором активации перекисного окисления липидов, иммуновоспалительных процессов и экспрессии цитокинов является гиперактивация симпатико-адреналовой системы [1, 5–7, 11].

В условиях развития оксидативного стресса важно наличие полноценной антиоксидантной защиты, которая участвует в инактивации реакционно-способных соединений, препятствуя проявлению их токсического действия в тканях. Одним из путей коррекции повреждений, вызванных оксидативным

стрессом, является применение препаратов с антиоксидантным действием [15, 20].

Контроль параметров оксидативного статуса необходим при экспериментальных исследованиях систем вспомогательного кровообращения, однако прямая его оценка до настоящего времени не проводилась, с этой целью использовали косвенные тесты.

Целью настоящей работы явилось изучение параметров оксидативного статуса и антиоксидантной защиты у экспериментальных животных в условиях вспомогательного кровообращения – при подключении осевого насоса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 7 крупных животных (телятах) черно-пестрой породы в возрасте от 110 до 130 дней (в среднем  $120,33 \pm 7,37$ ) и массой тела от 95 до 105 кг (в среднем  $99,1 \pm 3,8$  кг).

При проведении эксперимента использовался имплантируемый осевой насос крови, входящий в состав первого отечественного аппарата вспомогательного кровообращения, разрабатываемого ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России совместно с Московским государственным институтом электронной техники [2, 3].

В качестве исследуемого материала использовали венозную гепаринизированную кровь, анализ проводился сразу после получения образца. Исследование у телят проводили до начала эксперимента с подключением осевого насоса, на 1, 3, 5, 7 и 10-е сутки.

Для сравнения параметров оксидативного статуса у экспериментальных животных и человека использовали данные, полученные при исследовании крови 10 здоровых лиц – 5 мужчин и 5 женщин в возрасте от 28 до 37 лет (в среднем  $32,7 \pm 3,2$  года).

Прямую оценку оксидативного стресса (тест FORT – Free Oxygen Radicals Testing) и антиоксидантной защиты (тест FORD – Free Oxygen Radicals Defence) проводили на анализаторе «FORM Plus CR3000» («Callegary», Италия). Выраженность окислительного стресса (тест FORT) оценивалась по выделению активных форм кислорода с использованием колориметрической регистрации. Метод основан на способности ионов металла катализировать в присутствии гидроперекисей образование свободных радикалов. Оценка общей антиоксидантной способности (тест FORD) основана на использовании предварительно образованных радикалов и снижении абсорбции, которое пропорционально концентрации антиоксидантов (водорастворимого аналога  $\alpha$ -токоферола) в крови [16, 17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее значение показателя оксидативного стресса (FORT) у телят составило  $0,42 \pm 0,11$  ммоль/л  $H_2O_2$  (от 0,34 до 0,65 ммоль/л  $H_2O_2$ ); показателя антиоксидантной защиты (FORD) –  $1,56 \pm 0,33$  ммоль/Trolox (от 1,0 до 1,94 ммоль/Trolox). Вычислен интегральный показатель оксидативного равновесия, представленный отношением показателя антиоксидантной защиты и оксидативного стресса (FORD/FORT), или отношением концентрации перекиси водорода к концентрации антиоксиданта Trolox. Среднее значение этого показателя составило  $3,92 \pm 1,30$  (от 1,53 до 5,39).

Индивидуальные и средние значения результатов измерения указанных параметров представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Индивидуальные результаты измерения параметров оксидативного статуса (FORT), антиоксидантной защиты (FORD) и интегрального показателя оксидативного равновесия (FORD/FORT) у экспериментальных животных (телят)**

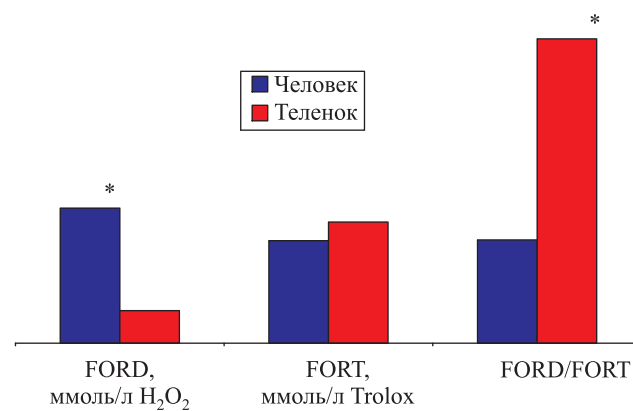
| Теленок (№ п/п)  | FORT (free oxygen radical test, ммоль/л $H_2O_2$ ) | FORD (free oxygen radical defense, ммоль/л Trolox) | FORD/FORT       |
|------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|
| 1                | 0,34                                               | 1,62                                               | 4,76            |
| 2                | 0,65                                               | 1,0                                                | 1,53            |
| 3                | 0,42                                               | 1,96                                               | 4,67            |
| 4                | 0,47                                               | 1,41                                               | 3,0             |
| 5                | 0,36                                               | 1,47                                               | 4,32            |
| 6                | 0,40                                               | 1,53                                               | 3,82            |
| 7                | 0,36                                               | 1,94                                               | 5,39            |
| Среднее $\pm$ SD | $0,42 \pm 0,11$                                    | $1,56 \pm 0,33$                                    | $3,92 \pm 1,30$ |

Ранее для оценки выраженности оксидативного стресса использовали косвенные тесты, которые малопригодны для эксперимента и клинической практики, в частности определение малонового альдегида – конечного продукта перекисного окисления липидов. Количественная оценка свободных радикалов, присутствующих в биологических системах, очень сложна или практически невозможна [4, 16, 17].

В настоящей работе использован метод прямой оценки оксидативного статуса у экспериментальных животных, что позволило установить и охарактеризовать значения параметров оксидативного стресса (FORT), антиоксидантной защиты (FORD) и интегрального показателя оксидативного равновесия (FORD/FORT). Установлено, что вариации индивидуальных показателей исследуемых параметров у телят находятся в достаточно узком диапазоне.

Средний показатель оксидативного стресса (FORT) у телят был достоверно ниже, чем у че-

ловека –  $1,74 \pm 0,32$  ммоль/л  $H_2O_2$ , (от 1,31 до 2,15 ммоль/л  $H_2O_2$ ),  $p < 0,05$ . Достоверных отличий среднего показателя антиоксидантной защиты (FORD) у человека от такового у телят не обнаружено –  $1,32 \pm 0,09$  ммоль/Trolox (от 1,17 до 1,46 ммоль/Trolox), соответственно,  $p > 0,05$ . Интегральный показатель оксидативного равновесия (FORD/FORT) у человека в среднем был достоверно ниже, чем у телят:  $1,33 \pm 0,27$ ,  $p < 0,05$  (рис. 1).



\* –  $p < 0,05$ , в сравнении с телятами

Рис. 1. Параметры оксидативного стресса (FORT), антиоксидантной защиты (FORD) и интегрального показателя оксидативного равновесия (FORD/FORT) у экспериментальных животных (теленка) и человека

Сравнительный анализ показал, что параметры оксидативного равновесия у экспериментальных животных отличаются от таковых у человека. Полученные данные необходимо учитывать при интерпретации результатов клинических и экспериментальных данных.

Изучена динамика показателей оксидативного статуса при функционировании осевого насоса. В эксперименте с подключением осевого насоса обследовано три теленка: один теленок в течение 5 суток и два теленка в течение 10 суток. Все эксперименты были завершены в плановом режиме, в соответствии с протоколом исследования. Динамика изучаемых показателей имела следующий характер:

- повышение концентрации  $H_2O_2$  (тест FORT) в 1–3-и сутки после подключения осевого насоса с постепенным ее снижением;
- снижение показателя антиоксидантной защиты (тест FORD) на 1–7-е сутки после подключения осевого насоса с последующим его повышением к 10-м суткам (рис. 2);
- снижение интегрального показателя оксидативного равновесия (FORD/FORT) начиная с первых суток после подключения осевого насоса с последующим его повышением (рис. 3).

Допустимо предположить, что повышение концентрации перекиси водорода, снижение антиоксидантной защиты и интегрального показателя окси-

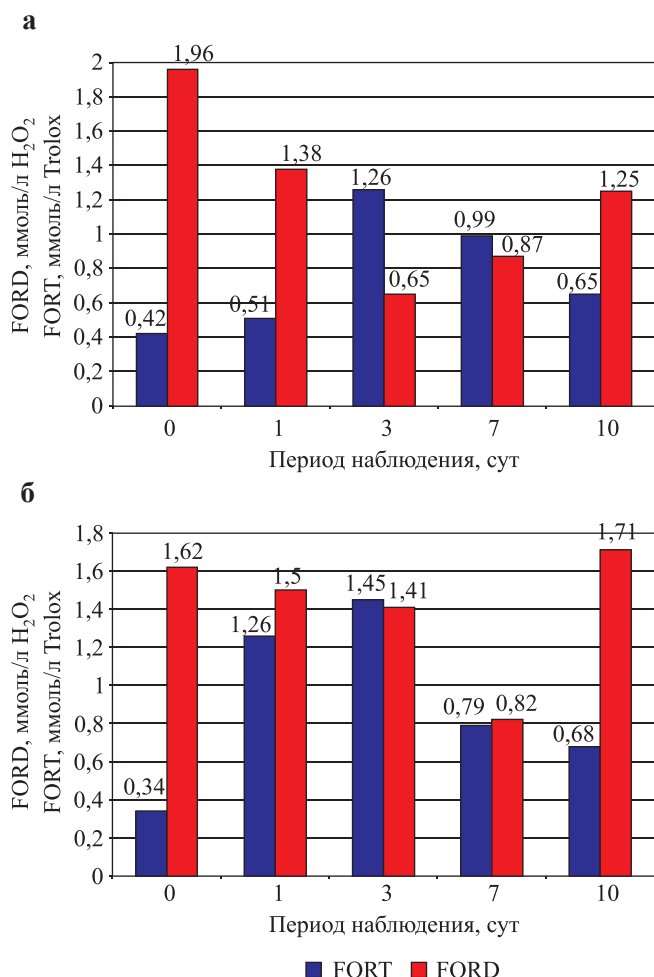


Рис. 2. Динамика показателей оксидативного стресса (FORT) и антиоксидантной защиты (FORD) у теленка 1 (а) и теленка 2 (б) после подключения осевого насоса

дательного равновесия в течение первых трех суток после постановки осевого насоса с постепенной их нормализацией может быть связано с ишемией – реперфузией, развитием острофазного ответа на оперативное вмешательство и последующей адаптацией животного к эксперименту.

Результаты настоящего исследования позволяют сделать следующее заключение.

Измерение продукции активных форм кислорода и антиоксидантной способности крови позволяет производить прямую оценку напряженности оксидативного стресса у экспериментальных животных (телят).

У здоровых животных показатели оксидативного равновесия отличаются от таковых у человека, что необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментальных и клинических исследований.

У телят в условиях эксперимента при подключении осевого насоса наблюдается смещение оксидативного равновесия в сторону развития оксидативного стресса со снижением антиоксидантного потенциала. Максимальные изменения выявляются

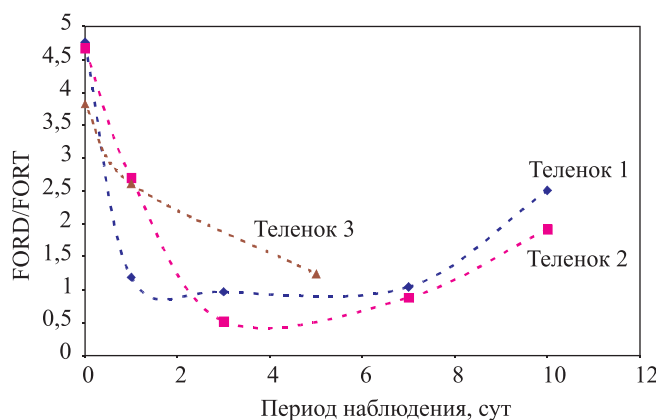


Рис. 3. Динамика интегрального показателя оксидативного равновесия (FORD/FORT) у экспериментальных животных

на 1–3-и сутки эксперимента с последующей постепенной их нормализацией.

Прямая оценка параметров оксидативного стресса может быть полезна в условиях длительного эксперимента для наблюдения и контроля адекватности вспомогательного кровообращения.

*Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 02.522.12.2010 от 2009 г.) [2, 3].*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов С.Г., Ситникова М.Ю., Шляхто Е.В. Роль оксидативного стресса в развитии и прогрессировании хронической сердечной недостаточности: актуальность и возможность его коррекции // Кардиология СНГ. 2006. № 4. Р. 267–270.
2. Иткин Г.П., Селищев С.В. Роторные насосы для искусственного и вспомогательного кровообращения // Медицинская техника. 2010. № 6. С. 39–45.
3. Коньшева Е.Г., Кудинов В.Л., Дозоров К.Н. и соавт. Стендовые исследования имплантируемого осевого насоса крови // Медицинская техника. 2010. № 6. С. 23–29.
4. Кунцевич Н.В. Возможности прямой оценки напряженности оксидативного стресса в клинической практике // Лаборатория. 2010. №1. С. 10–12.
5. Хубутия М.Ш., Шевченко О.П. Гомоцистеин при коронарной болезни сердца и сердечного трансплантата, М.: Реафарм, 2004, 272 с.
6. Шевченко О.П., Олещенко Г.А., Червякова Н.В. Гомоцистеин. М.: Реафарм, 2002, 46 с.
7. Шевченко О.П., Орлова О.В., Шевченко А.О. Церулоплазмин. М.: Реафарм, 2005. 46 с.
8. Abramson J.L., Hooper W.C., Jones D.P. et al. Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. Atherosclerosis. 2005. Vol. 178. P. 115–121.

9. Amir O., Paz H., Rogovski O., Barshai M. et al. Oxidative stress level correlates with clinical parameters in chronic heart failure patients // Clin. Cardiol. 2009. Vol. 32. P. 199–203.
10. Azzi A. Oxidative stress: A dead end or laboratory hypothesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. Vol. 362. P. 230–232.
11. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress // Curr. Opin. Cell. Biol. 2003. Vol. 15. P. 247–254.
12. Giordano F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure // J. Clin. Invest. 2005. Vol. 115. P. 500–508.
13. Gonenc A., Hacisevki A., Griffiths H.R. et al. Free radical reaction products and antioxidant capacity in beating heart coronary artery surgery compared to conventional bypass // Biochemistry. 2011. Vol. 76 (6). P. 677–685.
14. Kapoor M.C., Ramachandran T.R. Inflammatory response to cardiac surgery and strategies to overcome it // Annals of Cardiac Anaesthesia. 2004. Vol. 7. P. 113–128.
15. Kohen R., Nyska. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification // Toxicol Pathol. 2002. Vol. 30. P. 620–650.
16. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative stress detection: what for? // Part II. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2007. Vol. 11 (1). P. 27–54.
17. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use // Part II. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2007. Vol. 11 (6). P. 383–399.
18. Song X., Throckmorton A.L., Untaroiu A. et al. Axial blood pumps. ASAIO. 2003. Vol. 49 (4). P. 355–364.
19. Terman A., Brunk U.T. Oxidative stress, accumulation of biological «garbage» and aging. Antioxid Redox Signal. 2006. Vol. 8. P. 197–204.
20. Torri C. Oxidative Stress, Human Diseases and Biomarkers // Clinical Laboratory International. 2003. Vol. 27 (5). P. 28–29.