

О. Н. Павлова, О. Н. Тулаева, О. Н. Гуленко, О. П. Букарева

Исследование изменений активности каталазы в крови и печени крыс при экспериментально индуцированной дислипотеинемии на фоне механического повреждения скелетной мышцы

Аннотация.

Цель: изучение динамики активности каталазы в крови и тканях печени крыс при оксидативном стрессе, вызванном моделированием дислипотеинемии с последующей механической травмой скелетной мышцы.

Материалы и методы. Исследование проводилось на белых беспородных половозрелых здоровых крысах-самцах шестимесячного возраста, массой 200-230 грамм, в количестве 120 штук, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все животные были поделены на четыре группы, по 30 животных в каждой группе. Животные первой группы – это интактные крысы, к которым никакие воздействия не были применены. Животные второй группы (контроль регенерации) имели механическое рассечение в области средней трети икроножной мышцы задней конечности. Животные 1 и 2 групп находились на стандартном пищевом рационе вивария и имели свободный доступ к воде и пище. Животным третьей и четвертой групп сначала моделировали дислипотеинемии в течение 63 суток. Все это время животные получали высокоуглеводный и высокожировой рацион с повышенным до 30 % по массе сухих веществ содержанием жира и заменой питьевой воды на 20 % раствор фруктозы. По истечении указанного времени животным четвертой группы производили травмирование средней трети икроножной мышцы задней конечности. Активность каталазы исследовали у животных до начала эксперимента, а также на 1, 3, 5, 14, 21 сутки опыта по стандартной методике Корольюка М. А. Взятие материала и выведение крыс из эксперимента производилось с точным соблюдением всех этических норм, применимых к лабораторным животным. Под эфирным наркозом производили забор крови, а затем забор печени, которую промывали физиологическим раствором и замораживали. Затем путем механического измельчения тканей массой 1 г и смешивания с 9 мл трис-буфера (pH 7,4) готовили гомогенаты в автоматическом гомогенаторе со скоростью 5000 об/мин в сосуде с двойными стенками, постоянно охлаждаемом проточной водой.

Результаты. Механическая травма икроножной мышцы и дислипотеинемии способствовало интенсификации окислительных процессов на локальном и системном уровнях организма, но сочетание данных факторов характеризовалось крайне интенсивным оксидативным стрессом и приводило к снижению активности каталазы в крови и тканях печени.

Ключевые слова: крысы, оксидативный стресс, дислипотеинемия, каталаза, механическое рассечение икроножной мышцы.

Авторы:

Павлова Ольга Николаевна — доктор биологических наук; e-mail: casiopeya13@mail.ru;

Тулаева Ольга Николаевна — кандидат медицинских наук;

Гуленко Ольга Николаевна — кандидат биологических наук; e-mail: gulenko_ol@mail.ru;

Букарева Ольга Петровна — ассистент.

Самарский государственный медицинский университет; 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89.

Введение. Россия, согласно статистическим данным, относится к регионам с высоким уровнем сердечно-сосудистых заболеваний. Среди неинфекционных причин смертности болезни системы кровообращения продолжают занимать первое место и характеризуются высокой смертностью.

В России примерно 31 млн человек страдает заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Ведущее место в структуре сердечно-сосудистых заболеваний отводится ишемической болезни сердца, гипертонической болезни и острым цереброваскулярным заболеваниям. При этом следует отметить, что возраст пациентов неуклонно молодеет.

Так среди мужчин, которые перенесли впервые инфаркт, 63 % имели возраст моложе 50 лет [1].

Все названные клинические поражения обусловлены развитием атеросклеротических поражений сосудов различной локализации. Атеросклероз — это системный многофакторный процесс. Одним из ведущих механизмов запуска данного процесса является активация процессов перекисного окисления липидов, идущая на фоне антиоксидантной недостаточности организма в целом [2, 3]. Особенно отягощает этот процесс нарушение метаболизма глюкозы с образованием токсических продуктов гликолизирования [4].

Одним из важнейших ферментов, участвующих в процессе окисления, является каталаза. Согласно современным взглядам атеросклероз следует рассматривать как генерализованный воспалительный процесс, который связан с отложением липидов в субэндотелии сосудов, лейкоцитарной инфильтрацией с последующей гипертрофией меди артерий [5].

Исходя из этого представляют большой интерес данные о каталазе, которые свидетельствуют о ее возможностях по снижению воспалительного процесса в организме в целом [6, 7]. Свои эффекты фермент реализует как путем прямого влияния на клетки — нейтрофильные гранулоциты и лимфоциты-киллеры, так и путем участия в гуморальных реакциях с блокированием интерлейкинов. Таким образом, развивающийся системный оксидативный стресс лежит в основе патологического процесса на уровне сосудистого русла, и это нарушает деятельность не только сердечно-сосудистой системы, но всего организма в целом.

Исходя из вышесказанного, представляется важным уточнить и корректировать данные об обсуждаемой патологии и способах купирования этого процесса. Для понимания механизмов патогенеза атеросклероза возможно моделирование дислипидотеинемии на малых лабораторных животных.

Цель исследований — изучение динамики активности каталазы в крови и тканях печени крыс при оксидативном стрессе, вызванном моделированием дислипидотеинемии с последующей механической травмой скелетной мышцы.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие **задачи**: определить динамику активности каталазы в крови и печени интактных животных, животных с рассеченной икроножной мышцей (контроль регенерации) и подопытных животных с моделированным оксидативным стрессом и механическим рассечением скелетной мышцы.

Материалы и методы. Исследование проводилось на белых беспородных половозрелых здоровых крысах-самцах шестимесячного возраста, массой 200-230 грамм, в количестве 120 штук, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все животные были поделены на четыре группы, по 30 животных в каждой группе. Животные первой группы — это интактные крысы, к которым никакие воздействия не были применены. Животные второй группы (контроль регенерации) имели механическое рассечение в области средней трети икроножной мышцы задней конечности. Животные 1 и 2 групп находились на стандартном пищевом рационе вивария и имели свободный доступ к воде и пище. Животным третьей и четвертой групп сначала моделировали дислипидотеинемии в течение 63 суток. Все это время животные получали высокоуглеводный и высокожировой рацион с повышенным до 30 % по массе сухих веществ содержанием жира и заменой питьевой воды на 20 % раствор фруктозы. По истечении указанного времени животным четвертой группы производили травмирование средней трети икроножной мышцы задней конечности. Все группы животных были включены в эксперимент одновременно, что исключает влияние внешних температурных, климатических и иных условий на деятельность изучаемого фермента в контрольной и подопытной группах. [9]. Активность каталазы исследовали у животных до начала эксперимента, а также на 1, 3, 5, 14, 21 сутки опыта по стандартной методике Королюка М. А.

Взятие материала и выведение крыс из эксперимента производилось с точным соблюдением всех этических норм, применимых к лабораторным животным. Под эфирным наркозом производили забор крови, а затем забор печени, которую промывали физиологическим раствором и замораживали. Затем путем механического измельчения тканей массой 1 г и смешивания с 9 мл трис-буфера (рН 7,4) готовили гомогенаты в автоматическом гомогенаторе со скоростью 5000 об/мин в сосуде с двойными стенками, постоянно охлаждаемом проточной водой [9,10]. Исследование было выполнено с соблюдением ФЗ № 498 от 27.12 2018 года, требований приказа МЗ РФ от 01.04.2016 года N 199н и международных рекомендаций.

Полученный цифровой материал подвергался статистической обработке путем непараметрического статистического анализа с целью установления достоверности различий в изучаемых группах.

Результаты. Динамика активности каталазы в крови (Me) представлена на графике (рис. 1). Из представленного графика видно, что уровень каталазы в крови у животных 1-ой группы находился в пределах физиологической нормы и колебался незначительно в течение всего опыта.

У животных 2-ой группы, с моделированной травмой икроножной мышцы и индуцированным тем самым оксидативным стрессом уровень каталазы колебался незначительно до 3 суток эксперимента и был сопоставим с контрольными цифрами, но к 5 суткам эксперимента уровень фермента упал на 8,2 % по сравнению с контролем, на 7 сутки зафиксировано падение активности каталазы на 15,4 % (Manna-Whitney: $U = 169,7000$, $Z = -2,921141$, при $p = 0,002114$), на 14 сутки — на 24,4 % (Manna-Whitney: $U = 137,1000$, $Z = -3,142224$, при $p = 0,000001$), а на 21 сутки — на 36,9 % (Manna-Whitney: $U = 129,20000$, $Z = -2,766955$, при $p = 0,000162$) от исходного значения.

У животных 3-й группы с индуцированным оксидативным стрессом, вызванным дислипидемией, сначала активность каталазы изменялась незначительно, но на 5 сутки достоверно снизилась на 9,7 % (Manna-Whitney: $U = 101,6000$, $Z = -3,574471$, при $p = 0,002331$), на 7 сутки — на 11,9 % (Manna-Whitney: $U = 171,1000$, $Z = -2,362233$, при $p = 0,000000$), на 14 сутки — на 13,3 % (Manna-Whitney: $U = 144,3000$, $Z = -3,914471$, при $p = 0,000321$) и на 21 сутки — на

22,7 % (Manna-Whitney: $U = 101,7000$, $Z = -3,311141$, при $p = 0,002111$).

В 4-ой серии эксперимента тоже происходит снижение активности каталазы в течение эксперимента, но возникает это раньше, начиная с 3 суток опыта. На 5 сутки активность каталазы в крови крыс 4 группы снизилась на 17,0 % (Manna-Whitney: $U = 109,0000$, $Z = -3,263312$, при $p = 0,000161$) от исходного значения, на 7 сутки — на 26,2 %, на 14 сутки — на 47,6 %, на 21 сутки — на 55,7 %.

Так же производили оценку активности каталазы в печени (Me). Данные представлены на графике (рис. 2.).

Активность каталазы в крови животных 1-й в тканях печени на протяжении эксперимента колебалась незначительно в пределах физиологической нормы.

У животных 2-й группы зафиксировано незначительное снижение активности каталазы в тканях печени, но начиная с 7 суток эксперимента активность каталазы снизилась на 11,5 % (Manna-Whitney: $U = 147,9000$, $Z = -3,147221$, при $p = 0,000114$), на 14 сутки — на 18,6 % (Manna-Whitney: $U = 113,4000$, $Z = -2,933321$, при $p = 0,000000$), на 21 сутки — на 21,5 % (Manna-Whitney: $U = 166,4000$, $Z = -3,422441$, при $p = 0,003221$) от исходного значения.

У животных 3-й группы с индуцированным оксидативным стрессом, вызванным дислипиде-

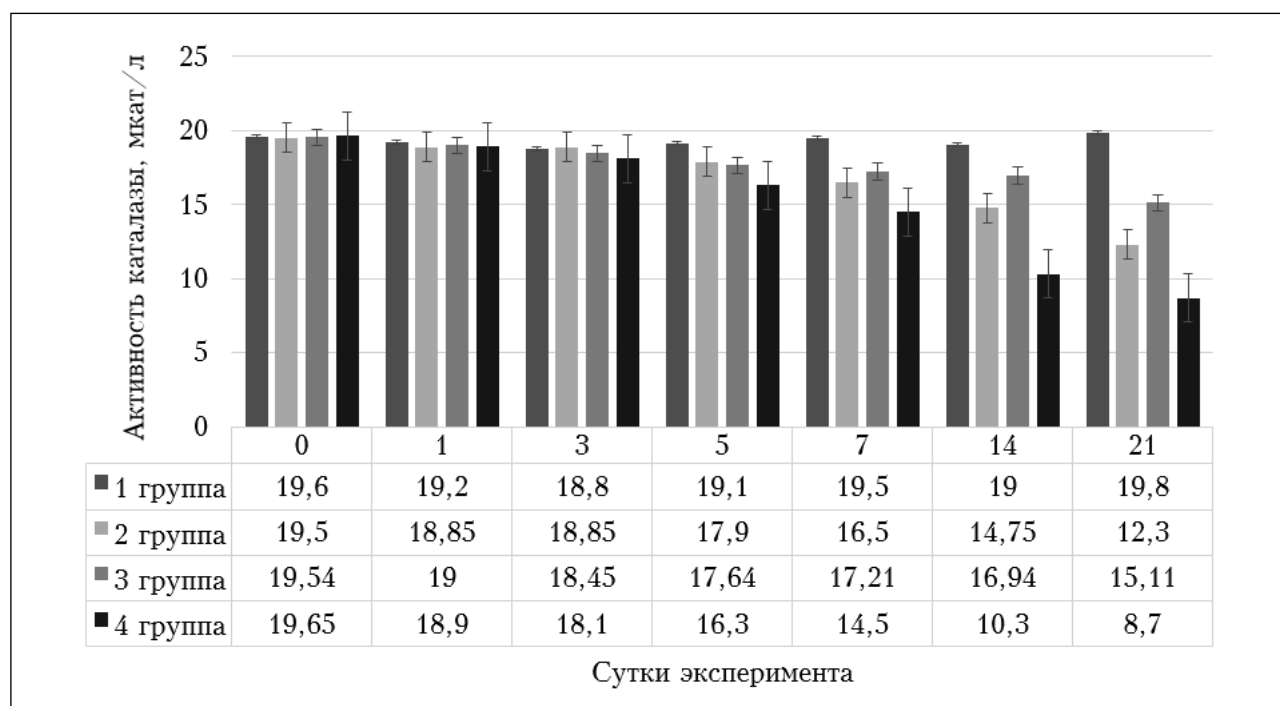


Рис. 1. Динамика изменений активности каталазы в крови крыс при оксидативном стрессе, вызванном моделированием дислипидемии, на фоне механического повреждения скелетной мышцы

мией, активность каталазы в тканях печени сначала начала возрастать, но начиная с 7 суток зафиксировано резкое падение активности фермента, и на 14 сутки активность каталазы была ниже на 13,4 % (Manna-Whitney: $U = 179,6000$, $Z = -2,933622$, при $p = 0,000391$), на 21 сутки — на 15,5 % (Manna-Whitney: $U = 122,8000$, $Z = -2,633777$, при $p = 0,002711$) от исходного значения. В 4-ой серии эксперимента установлено более активное снижение активности каталазы в тканях печени в течение эксперимента. На 7 сутки активность каталазы в крови крыс 4 группы снизилась на 13,3 % (Manna-Whitney: $U = 149,3000$, $Z = -4,562221$, при $p = 0,000011$) от исходного значения, на 14 сутки — на 19,4 % (Manna-Whitney: $U = 151,5000$, $Z = -3,593332$, при $p = 0,000000$), на 21 сутки — на 27,8 % (Manna-Whitney: $U = 103,1000$, $Z = -2,833877$, при $p = 0,000113$).

Обсуждение. Механическое повреждение скелетной мышцы ведет к образованию гематомы и запускает воспалительный процесс не только в поперечнополосатой, но и в соединительной тканях. Воспалительный процесс часто склонен к значительному распространению от места повреждения по эндомизию и перимизию травмированной мышцы.

Каталаза — основной кооперативный фермент, отвечающий за разложение перекиси водорода, в том числе и на уровне эритроцитов, поэтому во второй серии эксперимента в крови и

тканях печени происходит достаточно резкое падение активности данного фермента. В третьей серии эксперимента активность каталазы сначала начала увеличиваться (до 5 суток опыта), а затем резко упала ввиду интенсификации процессов перекисного окисления липидов на фоне дислипотеинемии и необходимости купирования активно образующихся свободных радикалов.

Полученные данные согласуются с мнением других авторов [11, 2]. Сочетание травмы и дислипотеинемии в течение эксперимента вызывает более резкое падение активности каталазы под влиянием интенсивных окислительных процессов на фоне травмы скелетной мышцы и дислипотеинемии в сочетании с воспалением.

В экспериментальной дислипотеинемии печень является органом-мишенью, ее масса увеличивается в 2,23 раза по сравнению с контролем, поэтому в третьей и четвертой сериях эксперимента уровень каталазы падает, что показывает неспособность антиоксидантной системы в целом и ее фермента каталазы противостоять развитию системного патологического процесса.

Выводы. Механическая травма икроножной мышцы и дислипотеинемия способствуют интенсификации окислительных процессов на локальном и системном уровнях организма, но сочетание данных фактов характеризуется крайне интенсивным оксидативным стрессом и приводит к снижению активности каталазы в крови и тканях печени.

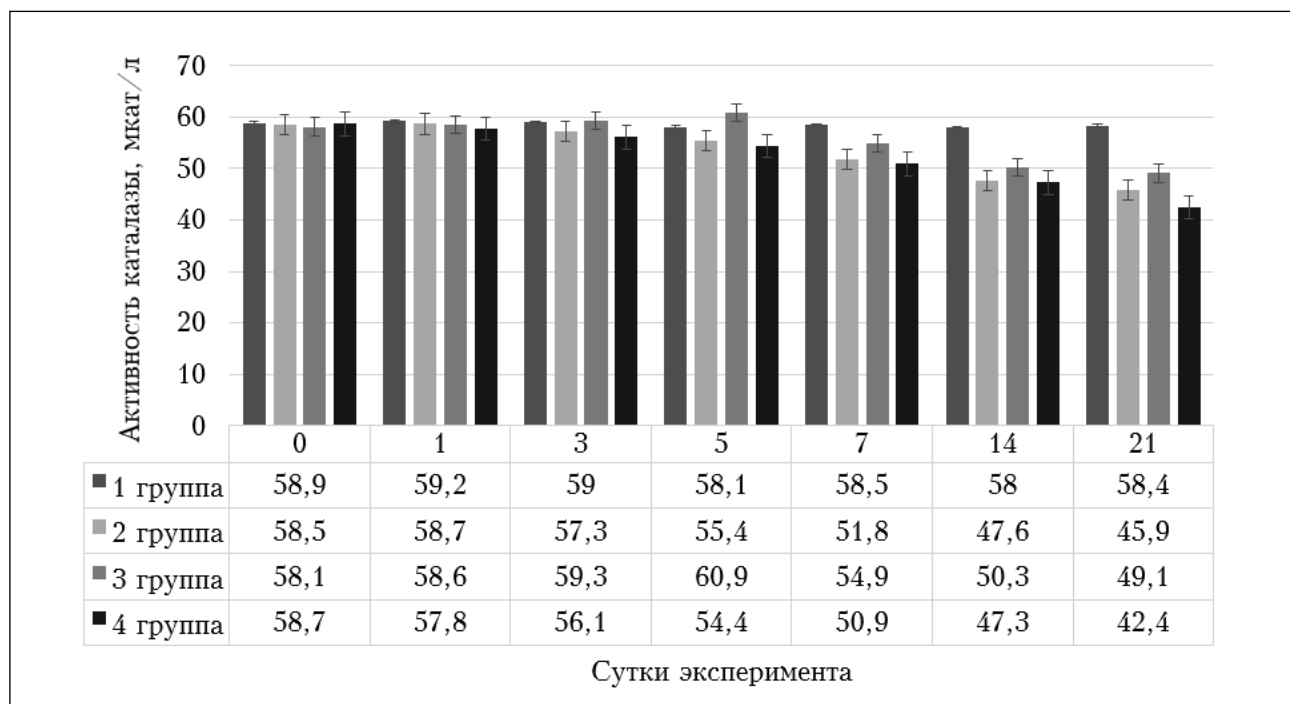


Рис. 2. Динамика активности каталазы в тканях печени крыс при оксидативном стрессе, вызванном моделированием дислипотеинемии, на фоне механического повреждения скелетной мышцы

Литература

1. Глущенко В. А. Сердечно — сосудистая заболеваемость — одна из важнейших проблем здравоохранения / В. А. Глущенко, Е. К. Иркиенко // Медицина и здравоохранение. — 2019. — Т. 4. — № 1. — С. 56-63.
2. Банзаракшеев В. Г. Влияние комплексного фитосредства на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при адреналиновой дислипидотеинемии / В. Г. Банзаракшеев // Медицинский вестник Башкортостана. — 2012. — Т. 7. — № 5. — С. 72-74.
3. Ланкин В. З. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Ю. Н. Беленков // Кардиология. — 2004. — № 2. — С. 72-81.
4. Титов В. Н. Глюкоза, гликотоксины и продукты гликирования. Участие в патогенезе микроангиопатий, артериолосклероза и атеросклероза / В. Н. Титов, Ю. К. Ширяева // Клиническая лабораторная диагностика. — 2011. — № 11. — С. 3-13.
5. Насонов Е. А. Атеросклероз: перспективы противовоспалительной терапии / Е. А. Насонов, Т. В. Попкова // Терапевтический архив. — 2018. — № 5. — С. 4-12.
6. Павлова О. Н. Исследование динамики активности каталазы в сердце и мышечной ткани крыс при механическом воздействии на гематоофтальмический барьер / О. Н. Павлова [и др] // Генетика и разведение животных. — 2020. — № 3. — С. 106-113.
7. Безручко Н. В. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинко — биохимическое значение в оценке эндотоксикоза / Н. В. Безручко [и др] // Вестник Томского государственного педагогического университета. — 2012. — № 7 (122). — С. 94-98.
8. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лабораторное дело. — 1988. — № 1. — С. 16-19.
9. Венгеровский А. И. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ / А. И. Венгеровский, И. В. Маркова, А. С. Саратиков; под ред. Фисенко // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению любых фармакологических веществ. — М.: ИИА «Ремодиум». — 2000. — С. 228-231.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под. общ. ред. Р.У. Хабриева. 2 — изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — С. 832.
11. Микашинович З. И. Влияние статинов (зокора) на кислородзависимые процессы в мышечной ткани и эритроцитах животных с гиперхолестеринемией / З. И. Микашинович, Е. В. Виноградова, Е. С. Белоусова // Acta Biomedica Scientifica. — 2019. — № 3. — С. 110-116.

Pavlova O., Tulaeva O., Gulenko O., Bukareva O.

Study of changes in catalase activity in blood and liver of rats with experimentally induced dyslipoproteinemia against the background of mechanical damage to skeletal muscle

Abstract.

Purpose: to study the dynamics of catalase activity in the blood and liver tissues with oxidative stress caused by the modeling of dyslipoproteinemia with the subsequent mechanical trauma of the skeletal muscle.

Materials and methods. The study was conducted on white, unconventional sexual healthy rats of six months of age, weighing 200-230 grams, in the amount of 120 pieces contained in standard conditions of vivarium. All animals were divided into four groups, 30 animals in each group. Animals of the first group are intact rats to which no effects were applied. Animals of the second group (regeneration control) had a mechanical dissection in the area of the middle third of the calf muscle of the posterior limb. Animals of 1 and 2 groups were on the standard diet of Vivaria and had free access to water and food. The animals of the third and fourth groups were first modeled by dyslipoprotein for 63 days. All this time, animals received a high -carb and high -fat diet with

a weight of dry substances increased up to 30 % and replacement of drinking water with a 20 % fructose solution. After the specified time, the animals of the fourth group were injured by the middle third of the calf muscle of the posterior limb. The activity of catalase was investigated in animals before the start of the experiment, as well as on 1, 3, 5, 14, 21 days of experience according to the standard methodology of Queen M. A. The capture of the material and the removal of rats from the experiment was carried out with accurate observance of all ethical norms applicable to laboratory animals. Under etheric anesthesia, a blood fence was made, and then the liver fence, which was washed with physiological solution and frozen. Then, by mechanical grinding of fabrics weighing 1 g and mixing with 9 ml of Tris Bufer (pH 7.4), homogenates were prepared in an automatic homogen at a speed of 5,000 rpm in a vessel with double walls, constantly cooled by running water.

Results. The mechanical trauma of the calf muscle and dyslipoproteinemia contributed to the intensification of oxidative processes at the local and systemic levels of the body, but the combination of these facts was characterized by extremely intense oxidative stress and led to a decrease in the activity of catalase in the blood and liver tissues.

Key words: rats, oxidative stress, dyslipoproteinemia, catalase, mechanical calf muscle dissection.

Authors:

Pavlova O. – Dr. Habil. (Biol. Sci.); e-mail: casiopeya13@mail.ru;

Tulaeva O. – PhD (Med. Sci.);

Gulenko O. – PhD (Biol. Sci.); e-mail: gulenko_ol@mail.ru;

Bukareva O. – researcher.

Samara State Medical University; 443099, Russia, Samara, st. Chapayevskaya, d. 89.

References

1. Glushchenko V. A. Cardiac - vascular incidence - one of the most important problems of healthcare / V. A. Glushchenko, E. K. Irclenko // *Medicine and Health*. – 2019. – Vol. 4. – № 1. – P. 56-63.
2. Banzaraksheev V. G. The influence of complex phytos on the indicators of peroxidation of lipids and antioxidant protection for adrenaline dyslipoproteinemia / V. G. Banzarakseev // *Medical Bulletin of Bashkortostan*. – 2012. – Vol. 7. – № 5. – P. 72-74.
3. Lankin V. Z. Antioxidants in the complex therapy of atherosclerosis: Pro et contra / V. Z. Lankin, A.K. Tikhase, Yu. N. Beleenkov // *Cardiology*. – 2004. – № 2. – P. 72-81.
4. Titov V.N. Glucose, glycotoxins and glycation products. Participation in pathogenesis of microangiopathies, arteriosclerosis and atherosclerosis / V. N. Titov, Yu. K. K. Shiryayeva // *Clinical laboratory diagnostics*. – 2011. – № 11. – P. 3-13.
5. Nasonov E. A. atherosclerosis: Prospects for anti-inflammatory therapy / E. A. Nasonov, T.V. Popkov // *Therapeutic archive*. – 2018. – № 5. – P. 4-12.
6. Pavlova O. N. The study of the dynamics of the activity of catalase in the heart and muscle tissue of rats with mechanical effects on the hematoophthalmic barrier / O. N. Pavlova [and others] // *Genetics and breeding of animals*. – 2020. – № 3. – P. 106-113.
7. Bezruchko N. V. Catalase of the biological media of the human body and its clinical - biochemical significance in the assessment of endotoxemia / N.V. Bezruchko [and others] // *Bulletin of the Tomsk State Pedagogical University*. – 2012. – № 7 (122). – P. 94-98.
8. Korolyuk M. A. Method of determining the activity of catalase / M. A. Korolyuk, L. I. Ivanov, I. G. Mayorova, V.E. Tokarev // *Laboratory affairs*. – 1988. – № 1. – P. 16-19.
9. Vengerovsky A. I. Methodological instructions for the study of hepatomatic activity of pharmacological substances / A. I. Vengerovsky, I.V. Markov, A. S. Saratikov; Ed. Fisenko // *Guide to experimental (preclinical) study of any pharmacological substances*. – M.: JIA "Remodium". – 2000. – P. 228-231.
10. Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances; under. general. Ed. RU. Khabrieva. 2 - ed., Refined. and add. – M.: Medicine, 2005. – p. 832.
11. Mikashinovich Z. I. The influence of statins (Zokora) on oxygen-dependent processes in muscle tissue and erythrocytes of animals with hypercholelemia / Z. I. Mikashinovich, E.V. Vinogradova, E. S. Belousova // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2019. – № 3. – P. 110-116.