

Л.В.Вохминцева

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ У КРЫС С ПНЕВМОНИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ АДАПТИВНЫХ ГОРМОНОВ*ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск***РЕЗЮМЕ**

Влияние адаптивных гормонов на антиоксидантную систему крови было оценено у крыс с пневмонией, которую моделировали интратрахеальным введением сефадекса А-25 в дозе 5 мг/кг веса. Пневмония, развивающаяся на фоне гормональных изменений (гидрокортизон в дозе $0,3 \cdot 10^{-9}$ М/100 г и адреналин в дозе $0,6 \cdot 10^{-6}$ М/100 г вводили в течение 3 дней через неделю после введения аллоксана в дозе 120 мкг/100 г массы тела), характеризовалась более высоким уровнем продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в плазме, активности каталазы и глутатионредуктазы в гемолизате, а также более низким уровнем восстановленного глутатиона в гемолизате.

Ключевые слова: пневмония, сефадекс, восстановленный глутатион, каталаза, глутатионредуктаза, продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.

SUMMARY

L.V.Vokhmintseva

BLOOD ANTIOXIDANT SYSTEM OF RATS WITH PNEUMONIA IN CONDITIONS OF ADAPTIVE HORMONES ADMINISTRATION

The influence of adaptive hormones on blood antioxidant system was evaluated in rats with pneumonia produced by intratracheal injection of Sephadex A-25 at concentration of 5 mg/kg of body weight. Pneumonia that develops against the hormonal changes ($0,3 \cdot 10^{-9}$ M/100 g of hydrocortisone and $0,6 \cdot 10^{-6}$ M/100 g of epinephrine injected during 3 days after 120 mg/kg of alloxan administered a week before) was characterized by a higher level of thiobarbituric acid-reactive substances in plasma, of hemolysate catalase and glutathione reductase activity, as well as lower hemolysate reduced glutathione levels.

Key words: pneumonia, sephadex, reduced glutathione, catalase, glutathione reductase, thiobarbituric acid-reactive substances.

Оксидативный стресс играет важную роль в патогенезе большинства заболеваний респираторного тракта, включая не только хроническую обструктивную болезнь лёгких, бронхиальную астму, острые респираторные вирусные инфекции, острый респираторный дистресс-синдром, но и пневмонию [4]. Токсические продукты липопероксидации, образующиеся в процессе воспалительного процесса в легких, поступают в кровоток и в дальнейшем оказывают влияние на клетки крови и органы непосредственно не

вовлеченные в патологический процесс. За поддержание активных форм кислорода на стационарном, безопасном физиологическом уровне ответственна система антиоксидантной защиты, включающая антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты [14]. Недостаточность функциональной активности антиоксидантной системы защиты приводит не только к лавинообразному нарастанию продукции активных форм кислорода, но и к развитию и/или усилению повреждения тканей и органов.

Регуляция клеток, участвующих в воспалении, осуществляется различными путями, поскольку иммунная система не является автономной и находится под контролем множества медиаторов, секретируемых эндокринной и нервной системами, также как и продуктов других клеток иммунной системы. К таким регуляторам относятся гормоны гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси, продукция которых повышается при травме, инфекциях, эмоциональном стрессе [10, 15]. В настоящее время недостаточно исследована роль эндокринной системы в регуляции реализации воспалительного процесса, в связи с чем целью настоящей работы явилось изучение антиоксидантной защиты крови у крыс с пневмонией, протекающей на фоне введения гидрокортизона и адреналина при пониженной продукции инсулина.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на самцах крыс *Wistar* массой 200-220 г (ЦНИЛ Новосибирского государственного медицинского университета). Содержание, питание, уход за животными и выведение из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. №755). Животные находились на полноценном общевиварном рационе со свободным доступом к воде. Все болезненные процедуры и выведение животных из эксперимента осуществляли под эфирным наркозом.

Животным первой группы (n=12) моделировали развитие пневмонии интратрахеальным введением под эфирным наркозом суспензии сефадекса А-25 (Sephadex, Pharmacia Uppsala, Швеция) в дозе 0,5 мг/100 г. Второй группе крыс (n=12) вводили гидрокортизон ($0,3 \cdot 10^{-9}$ М/100 г) и адреналин ($0,6 \cdot 10^{-6}$ М/100 г) в течение 3 дней через неделю после введения аллоксана (120 мкг/100 г массы тела). Этой группе животных сефадекс А-25 вводили на следующий день после последнего приёма гормонов. Крыс выводили из эксперимента на 2, 10 и 20 сутки после заключительного воздействия. В контрольную группу (n=16) вхо-

дили интактные животные.

В плазме крови проводили измерение продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), спектрофотометрически при максимуме поглощения 532 нм [12]. Количество ТБК-РП выражали через эквивалентное количество малонового диальдегида, используя коэффициент молярной абсорбции, равный $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Результаты представлены в мкмоль/л. В гемолизате оценивали содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность каталазы и глутатионредуктазы. Содержание GSH определяли методом I.Kagiw, K.C.Mirfit (1960). Концентрацию GSH выражали в мг%. Принцип метода определения активности глутатионредуктазы основан на каталитическом НАДФ-Н-зависимом преобразовании окисленной формы глутатиона в восстановленную [3]. Активность глутатионредуктазы выражали в мкмоль/мин. Принцип метода определения активности каталазы основан на определении скорости утилизации H_2O_2 [3]. Активность каталазы выражали в ммоль/мин·л.

Описательную статистику проводили с использованием следующих показателей: среднее арифметическое значение (M), стандартная ошибка среднего значения (m). Соответствие нормальному распределению оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Определение достоверности различий сравниваемых параметров между разными выборками проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование в плазме крови крыс с пневмонией маркера липидной пероксидации – ТБК-РП показало, что на всех сроках эксперимента уровень последнего в обеих группах превышал показатели интактных животных (табл. 1).

На 2 сутки с момента введения сефадекса А-25 содержание ТБК-РП в плазме повысилось в 1,3 раза ($U=0$, $p < 0,01$) и оставалось без изменений на всех сроках эксперимента. Наличие у крыс гормонального дисбаланса привело к усилению оксидативного стресса, что характеризовалось достоверным превышением уровня ТБК-РП плазмы крови на всех сроках эксперимента аналогичного показателя в группе животных, у которых пневмонию моделировали без изменения гормонального фона. Наибольшие значения ТБК-РП в крови наблюдали на 2 сутки с момента введения сефадекса: концентрация ТБК-РП в 1 группе крыс была выше по сравнению со 2 группой в 1,58 раза ($U=0$, $p < 0,01$).

Развитие оксидативного стресса у крыс с пневмонией сопровождалось активизацией антиоксидантной системы, которая характеризовалась повышением уровня восстановленного глутатиона и активности антиоксидантных ферментов – каталазы и глутатионредуктазы (табл. 2).

В 1 группе крыс активность каталазы повышалась в течение 10 суток (превышала показатели интактных крыс в 1,79 раз, $U=0$, $p < 0,01$) и далее оставалась на достигнутом уровне. Изменение активности глутатион-

редуктазы имело сходную динамику, максимальное повышение активности в 3,4 раза наблюдали на 10 сутки ($U=0$, $p < 0,01$). Предварительное введение гидрокортизона и адреналина на фоне пониженной продукции инсулина перед моделированием пневмонии привело не только к повышению продуктов липидной пероксидации (табл. 1), но и к росту активности антиоксидантных ферментов (табл. 2). Активность каталазы во 2 группе животных достоверно превышала показатели активности фермента 1 группы (без изменения уровня гормонов) на всех сроках эксперимента: максимально на 35,9% на 2 сутки ($U=0$, $p < 0,01$) и минимально на 16,4% на 10 сутки эксперимента ($U=0$, $p < 0,01$). Достоверные различия активности глутатионредуктазы в экспериментальных группах наблюдали только на 2 сутки с момента введения сефадекса А-25 (превышение составило 1,9 раза, $U=4$, $p < 0,01$). В другие сроки эксперимента различий между группами в уровне активности глутатионредуктазы не было выявлено.

Таблица 1

Динамика содержания продуктов липопероксидации в плазме крови крыс с экспериментальной пневмонией, протекающей на фоне введения адреналина и гидрокортизона при пониженной продукции инсулина ($M \pm m$)

Периоды наблюдения		ТБК-РП, мкмоль/л
Контроль		$10,9 \pm 0,36$
2 сутки	1 группа	$14,2 \pm 0,48$ $p < 0,01$
	2 группа	$22,5 \pm 1,27^*$ $p < 0,01$
10 суток	1 группа	$15,3 \pm 0,52$ $p < 0,01$
	2 группа	$18,2 \pm 0,13^{**}$ $p < 0,01$
20 суток	1 группа	$14,6 \pm 0,54$ $p < 0,01$
	2 группа	$21,8 \pm 1,92^*$ $p < 0,01$

Примечание: здесь и далее 1 группа – пневмония, протекающая на фоне нормального уровня гормонов; 2 группа – пневмония, протекающая на фоне предварительного введения адаптивных гормонов; p – уровень значимости различий с показателями контроля; * – достоверные различия показателей между группами ($p < 0,01$); ** – достоверные различия показателей между группами ($p < 0,05$).

Поскольку изменение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах обладает высокой информативностью при оценке активности патологического процесса, в работе определяли также содержание GSH в гемолизате эритроцитов (табл. 2). Развитие пневмонии сопровождалось увеличением уровня восстанов-

ленного глутатиона в гемолизате эритроцитов на всех сроках эксперимента. Уровень GSH на 2 сутки с момента введения сефадекса А-25 увеличился в 3,7 раза по сравнению с контрольной группой ($U=0$, $p<0,01$) и оставался на этом уровне к 10 суткам. Далее уровень GSH достоверно снизился ($U=0$, $p<0,01$), но превосходил значения интактных животных в 2,5 раза ($U=0$,

$p<0,01$). Во 2 группе крыс динамика изменения восстановленного глутатиона была сходной, однако показатели GSH в данной группе были достоверно ниже значений в группе крыс без гормональных изменений на 2 и 10 сутки эксперимента. К 20 суткам параметры GSH в обеих группах достоверно не различались.

Таблица 2

Динамика содержания ферментативных антиоксидантов и восстановленного глутатиона в гемолизате крыс с экспериментальной пневмонией, протекающей на фоне введения адаптивных гормонов при пониженной продукции инсулина ($M\pm m$)

Периоды наблюдения		Каталаза, ммоль/мин×л	Глутатионредуктаза, мкмоль/мин×л	Восстановленный глутатион, мг%
Контроль		6,83±0,19	4,5±0,11	3,68±0,19
2 сутки	1 группа	10,3±0,82 $p<0,01$	9,4±0,12 $p<0,01$	13,6±0,78 $p<0,01$
	2 группа	14,0±0,89* $p<0,01$	17,8±0,91* $p<0,01$	5,9±0,05* $p<0,01$
10 сутки	1 группа	12,2±0,21 $p<0,01$	15,2±0,94 $p<0,01$	12,7±0,73 $p<0,01$
	2 группа	14,2±0,12* $p<0,01$	13,4±0,11** $p<0,01$	8,6±0,11 $p<0,01$
20 сутки	1 группа	10,8±0,06 $p<0,01$	14,0±0,01 $p<0,01$	9,20±0,03 $p<0,01$
	2 группа	14,4±0,94* $p<0,01$	16,9±1,20 $p<0,01$	8,1±0,02 $p<0,01$

Глюкокортикоиды и адреналин в основном проявляют иммуносупрессивное действие, заключающееся в ингибировании экспрессии множества провоспалительных генов (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-8, MIP-1 α , ICAM-1, E-селектина, индуцибельных NO-синтазы и циклооксигеназы-2 и др.) и усилении экспрессии противовоспалительных генов (аннексина-1, липокортин-1, ингибитора фосфолипазы A2 (CC10), I κ B- α , IL-10, антагониста рецептора IL-1, IL-10, IL-4, трансформирующего фактора роста- β) [6, 10]. Глюкокортикоиды значительно повреждают фагоцитарную и хемотаксическую активность нейтрофилов, способность к дыхательному взрыву и секреции лизоцима в ответ на стимуляцию [15]. Катехоламины также проявляют ингибирующее влияние на фагоцитоз, дегрануляцию, хемотаксис, продукцию супероксида кислорода нейтрофилами [9].

Однако исследования ряда авторов выявили провоспалительные эффекты адаптивных гормонов. Адреналин стимулирует образование кислорода в макрофагах и нейтрофилах [5, 7]. Одним из объяснений усиления продукции активных метаболитов кислорода является образование адренохрома, способного инициировать свободнорадикальные процессы [7], продукция которого усиливается при стрессе, когда уровень гормона в крови значительно возрастает, превышая базальный в десятки раз. В наших исследованиях, опубликованных ранее [2] показано, что

введение адреналина и гидрокортизона на фоне пониженной продукции инсулина перед моделированием пневмонии приводит к увеличению доли активных нейтрофилов, продуцирующих супероксид кислорода у крыс с воспалительным процессом в легких. Повышенный уровень продуктов липопероксидации выявлен как в легких, так и в плазме крови в условиях течения пневмонии при введении адаптивных гормонов [2]. Следствием притока в поврежденный орган активированных нейтрофилов является не только рост продуктов липопероксидации в легких, но и усиление повреждения [1], что приводит к большей деструкции и неблагоприятному течению воспаления.

Продукты липопероксидации, образующиеся при воспалительном процессе активируют синтез белков, обеспечивающих антиоксидантную защиту [11, 13], приводя к повышению уровня глутатиона и активности каталазы и глутатионредуктазы в эритроцитах. Более высокий уровень продуктов липопероксидации у крыс с пневмонией, протекающей на фоне введения адаптивных гормонов при пониженной продукции инсулина, сопровождался более высокими уровнями активности антиоксидантных ферментов каталазы и глутатионредуктазы в гемолизате. Более низкие значения GSH в группе животных с измененным гормональным фоном по сравнению с группой животных, у которых пневмония протекала без введения адаптивных гормонов, вероятно, обусловлены повышенным

его потреблением в реакциях инактивации продуктов липопероксидации, содержание которых при введении адаптивных гормонов увеличивалось в большей степени (табл. 1). Снижение продукции инсулина, который, как известно, является положительным регулятором экспрессии γ -глутамилцистеинсинтетазы и синтеза глутатиона [8], возможно также является причиной пониженного уровня GSH во второй группе животных.

Таким образом, развитие воспалительного процесса в лёгких крыс на фоне предварительного введения гидрокортизона и адреналина при сниженной продукции инсулина сопровождалось большим увеличением содержания продуктов липопероксидации, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, активности антиоксидантных ферментов, но более низким уровнем восстановления глутатиона по сравнению с группой животных, которым пневмонию моделировали без изменения уровня гормонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вохминцева Л.В. Влияние гормонального дисбаланса на течение экспериментальной пневмонии // Бюлл. физиол. и патол. дыхания. 2006. Вып.23. С.36–39.
2. Вохминцева Л.В. Особенности окислительного метаболизма нейтрофилов у крыс с пневмонией, протекающей в условиях введения гидрокортизона и адреналина на пониженной продукции инсулина // Вестн. нов. мед. техн. 2009. Т.16, №1. С.34–37.
3. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник / под ред. А.И.Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1999. 656 с.
4. Соодаева С.К. Окислительный стресс и антиоксидантная терапия при заболеваниях органов дыхания // Пульмонология. 2006. №5. С.122–126.
5. Фролов В.А., Моисеева Е.Г., Пасечник А.В. Патфизиологические аспекты модулирования функциональных свойств нейтрофилов периферической крови человека // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2008. Т.141, №6. С.622–624.
6. Barnes P.J. Corticosteroid effects on cell signaling // Eur. Respir. J. 2006. Vol.27. P.413–426.
7. Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes) / Behonick G.S. [et.al.] // J. Appl. Toxicol. 2001. Vol.1. P.15–22.
8. Cai J., Huang Z., Lu S.C. Differential regulation of γ -glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression // Biochem. J. 1997. Vol.326. P.167–172.
9. The sympathetic nervean integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system / Elenkov I.J. [et.al.] // Pharmacol. Rev. 2000. Vol.52, №4. P.595–638.
10. Elenkov I.J., Chrousos G.P. Stress system-organization, physiology and immunoregulation // Neuroimmunomodulation. 2006. Vol.13, №5-6. P. 257–67.
11. Iles K.E., Liu R.M. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal // Free Radic. Biol. Med. 2005. Vol.38, №5. P.547–556.
12. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. 1979. Vol.95, 2. P.351– 58.
13. Rahman I. Regulation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells // Biochem. Pharm. 2000. Vol. 60, №8. P.1041–1049.
14. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors // Clin. Interv. Aging. 2007. Vol.2, №2. P.219–236.
15. Tait A.S., Butts C.L., Sternberg E.M. The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease // J. Leukoc. Biol. 2008. Vol.4, №4. P.924–931.

Поступила 31.01.2011

Лариса Вениаминовна Вохминцева, доцент кафедры биологической химии,
630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52;

Larisa V. Vokhmintseva,
52 Krasnyi Ave., Novosibirsk, 630091;
E-mail: vokhmintseva@yandex.ru

