

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.24-005.98:615.916:577.1

© Коллектив авторов

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ И ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ОТЕКЕ ЛЕГКИХ

Н.Н. ПЛУЖНИКОВ, А.А. ТЯПТИН, Ю.А. ЛУПАЧЕВ, А.В. ЗЕМЛЯНОЙ,
М.Б. ВАРЛАШОВА, П.А. ТОРКУНОВ, Н.Ю. НОВОСЕЛОВА.

НИИ военной медицины МО РФ, 195043, С-Петербург, ул. Лесопарковая 4,
факс: (812) 527-39-57

Исследовано состояние ферментативного и неферментативного звена антиоксидантной системы, а также процессов перекисного окисления липидов в крови и легких крыс при токсическом отеке легких, вызванном ингаляцией оксидов азота. Показано, что изменения в состоянии компонентов антиоксидантной системы как в крови, так и в легких сопровождают развитие токсического отека легких и совпадают по времени с динамикой выраженности отека. Обнаруженные изменения имеют большую выраженность в крови по сравнению с легкими.

Ключевые слова: токсический отек легких, оксиды азота, антиоксидантная система, перекисное окисление липидов.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема профилактики и лечения токсического отека легких (ТОЛ) может быть приближена к своему разрешению лишь на основе максимально глубокого и полного понимания биохимических и физиологических механизмов формирования ТОЛ. Среди биохимических механизмов, лежащих в основе его развития, особое место занимают процессы свободнорадикального и перекисного окисления. В настоящее время считается, что в значительной степени повреждение клетки, ткани, органа при воздействии ядовитых веществ вызывается посредством изменений состояния биомембран, ферментов, рецепторного аппарата и др. в результате свободнорадикальных и перекисных процессов. Однако применение антиоксидантов для профилактики и лечения

ТОЛ в условиях эксперимента не дает однозначных результатов. Возможно, это связано с неправильной оценкой места, роли и значения каждого из компонентов системы антиоксидантной защиты как непосредственно легких, так и всего организма в процессе развития ТОЛ. Последнее ведет к применению антиоксидантов в неверно выбранных дозах, сочетании, времени и пути введения. Целью нашего исследования являлся поиск изменений в состоянии различных звеньев антиоксидантной системы (АОС) легких и крови крыс при их ингаляционном поражении оксидами азота в дозах, вызывающих развитие токсического отека легких.

МЕТОДИКА. Эксперименты выполнены на 650 белых беспородных крысах-самцах массой 160-220 г. Животные перед экспериментом находились в условиях вивария на обычном рационе питания; контрольные и опытные группы набирали рандомизированно. Отравление оксидами азота производили статическим методом. Продолжительность ингаляции газа составляла 30 мин при средней концентрации токсиканта в затравочной камере - 300 мг/м³ (0,3 мг/л). Такая концентрация позволяет получить у значительной части экспериментальных животных выраженное отравление без летального исхода в ближайшие 24 ч после воздействия [1]. Для оценки степени выраженности отека легких определяли легочный коэффициент (ЛК) по формуле:

$$\text{ЛК} = \frac{\text{масса легких (г)}}{\text{масса животного (г)}} \cdot 1000$$

Биохимические исследования крови и легких проводили у выживших животных через 3, 24 и 72 ч после отравления неферментативного звена антиоксидантной системы. О состоянии судили по количеству сульфгидрильных и дисульфидных групп, которые определяли методом амперометрического титрования [2,3]. В крови определяли отдельно белковые и небелковые сульфгидрильные (б-SH, н/б-SH), дисульфидные (б-SS, н/б-SS) группы и вычисляли соотношение их содержания (SH/SS-коэффициент), а в ткани легких - суммарные сульфгидрильные и дисульфидные группы и их соотношение. Кроме того, в крови и легких определяли содержание аскорбиновой кислоты (АК) и ее окисленных форм (ОФ) - дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот, а также рассчитывали их соотношение (коэффициент АК/ОФ) [3]. О состоянии ферментативного звена антиоксидантной системы судили по активности Zn/Cu-зависимой супероксиддисмутазы (СОД) [4], каталазы (Кат) [5], глутатионредуктазы (ГР) [6] и глюкозо-6- фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [7]. Концентрации белка определяли микробиуретовым методом [8]. Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА). ГПЛ в крови и легких определяли по изменению оптической плотности исследуемой пробы при длине волны 340 нм [9], а МДА (определяли только в легких) - по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [10]. Для оценки направления и степени изменений биохимических показателей рассчитывали коэффициент отклонения от контроля (КОК) по формуле:

$$\text{КОК} = \frac{(\text{Роп} - \text{Ри})}{\text{Ри}} \cdot 100\%$$

Где $R_{оп}$ - среднее арифметическое значение параметра у животных в опытной группе, а $R_{и}$ - среднее арифметическое значение параметра у интактных животных.

Если при вычислении КОК какого-либо из параметров у животных опытной группы коэффициент принимает нулевое значение, это свидетельствует о том, что значение данного параметра не отличается от аналогичного у интактных животных. Знак минус или плюс перед значением КОК означает отклонение данного параметра у животных опытной группы в сторону уменьшения или увеличения, соответственно, относительно значения данного параметра у интактных животных.

Для оценки результатов биохимических исследований использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, для значений легочного коэффициента - t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ингаляционное воздействие оксидов азота в токсодозе LCt_{50} на крыс приводило к урежению и задержке дыхания с последующим появлением одышки и цианоза. На более поздних сроках наблюдали выделение отечной жидкости из носа. Гибель части животных в опытных группах наступала через 12-24 ч при явлениях отека легких и гипоксии. Развитие отека легких выражалось отчетливым увеличением их весового коэффициента уже через 3 ч после окончания воздействия токсиканта ($P < 0,05$) (табл. 2). Через 1 сутки значение данного параметра достигало максимума ($P < 0,05$), а через 3 суток указанный показатель уменьшался и достоверно не отличался от его величины у интактных животных.

В крови подвергнутых токсическому воздействию животных (табл.1) уже через 3 ч после начала эксперимента наблюдали достоверное увеличение содержания белковых и небелковых SS-групп и изменение как белкового, так и небелкового SH/SS-коэффициента. Следует отметить заметное, хоть и недостоверное увеличение концентрации аскорбиновой кислоты и снижение активности СОД (рис.1). В легких (табл.2) экспериментальных животных в этот промежуток времени достоверных изменений ни одного из исследованных параметров не обнаружено (рис.2). Вместе с тем, обращает на себя внимание выраженное снижение содержания окисленных форм аскорбиновой кислоты.

Через 24 ч после воздействия токсиканта изменения биохимических параметров были наиболее выражены: в крови достоверно снижался уровень ферментов (эритроцитарной СОД, Кат и ГР), возрастало содержание окисленных форм аскорбиновой кислоты, соответственно изменялось соотношение АК/ОФ. Уменьшалось значение тиол/дисульфидного коэффициента, что свидетельствует об уменьшении содержания SH-групп и увеличении - SS-групп (рис.2). При этом в легких достоверно снижалось содержание МДА, а также активность СОД, Кат и ГР (рис.2). Через 3 суток ни один из исследованных параметров в крови и легких животных экспериментальной группы не отличался от контроля. Наиболее значительным из обнаруженных изменений был повышенный уровень ГР в крови, сниженное содержание МДА и повышенная концентрация суммарных SS-групп в легких с соответствующим изменением соотношения суммарных SH/SS-групп.

Таблица 1. Биохимические показатели крови крыс после отравления оксидами азота в разные сроки наблюдения ($\bar{x} \pm m$)

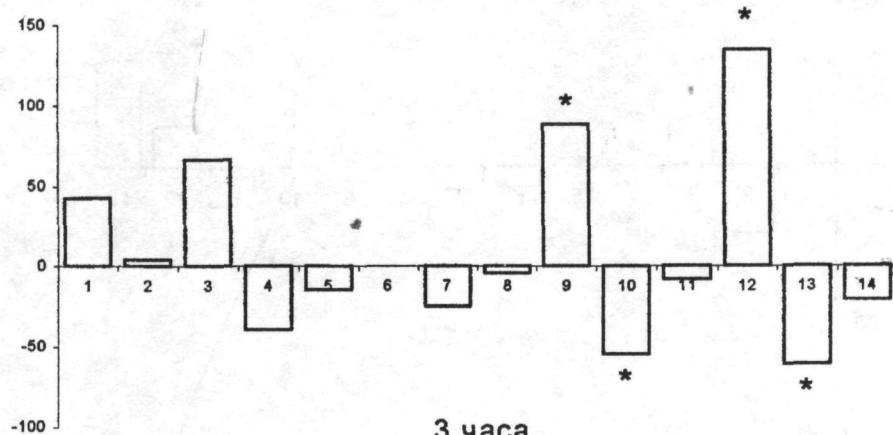
Время после отравления	АК мг/л	ОФ мг/л	АК / ОФ	СОД отн. ед	Кат	Г-6-ФДГ	ГР	б SH (мм)	б SS (мм)	б SH/SS	н/б SH (мм)	н/б SS (мм)	н/б SH/SS	ГПЛ отн. ед
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Интактные животные	7,25 $\pm 1,9$	39,88 $\pm 19,43$	0,15 $\pm 0,14$	20,23 $\pm 9,39$	0,332 $\pm 0,094$	0,083 $\pm 0,031$	0,024 $\pm 0,008$	19,12 $\pm 2,15$	6,19 $\pm 2,49$	3,45 $\pm 1,08$	1,38 $\pm 0,07$	0,35 $\pm 0,08$	3,94 $\pm 1,07$	6,77 $\pm 1,21$
3 часа	10,35 $\pm 5,69$	41,4 $\pm 13,93$	0,25 $\pm 0,09$	12,4 $\pm 4,23$	0,284 $\pm 0,071$	0,083 $\pm 0,009$	0,018 $\pm 0,004$	18,33 $\pm 1,57$	11,67 * $\pm 1,29$	1,58 * $\pm 0,1$	1,27 $\pm 0,14$	0,82 * $\pm 0,15$	1,55 * $\pm 0,18$	5,33 $\pm 0,44$
Интактные животные	9,35 $\pm 3,11$	21,75 $\pm 13,35$	0,43 $\pm 0,18$	20,71 $\pm 5,99$	0,275 $\pm 0,051$	0,187 $\pm 0,037$	0,009 $\pm 0,004$	21,2 $\pm 3,22$	6,08 $\pm 1,93$	3,5 $\pm 1,42$	1,64 $\pm 0,36$	0,42 $\pm 0,16$	4,51 $\pm 2,02$	5,72 $\pm 0,88$
24 часа	5,25 $\pm 0,003$	45,75 * $\pm 0,004$	0,11 * $\pm 0,004$	13,77 * $\pm 2,66$	0,127 * $\pm 0,08$	0,163 $\pm 0,003$	0,005 * $\pm 0,0004$	19,01 $\pm 0,38$	7,27 $\pm 0,53$	2,63 $\pm 0,21$	1,35 $\pm 0,1$	0,92 * $\pm 2,06$	1,46 * $\pm 0,85$	6,3 $\pm 0,51$
Интактные животные	5,81 $\pm 3,16$	21,39 $\pm 6,4$	0,27 $\pm 0,34$	12,12 $\pm 4,6$	0,156 $\pm 0,053$	0,083 $\pm 0,016$	0,009 $\pm 0,003$	19,34 $\pm 2,24$	6,43 $\pm 1,0$	3,11 $\pm 0,73$	1,67 $\pm 0,11$	0,57 $\pm 0,07$	3,01 $\pm 0,6$	4,07 $\pm 0,87$
72 часа	6,93 $\pm 3,9$	24,01 $\pm 1,82$	0,29 $\pm 0,14$	8,85 $\pm 2,91$	0,189 $\pm 0,033$	0,066 $\pm 0,002$	0,0058 $\pm 0,0008$	17,4 $\pm 0,84$	5,36 $\pm 0,08$	3,25 $\pm 0,11$	1,6 $\pm 0,16$	0,64 $\pm 0,08$	2,57 $\pm 0,57$	3,45 $\pm 0,05$

Примечание. * - различия достоверны ($P \leq 0,05$) с группой интактных животных. Здесь и в таблице 2 активность катализы выражена в ммоль/сек·г белка, а Г-6-ФДГ и ГР – в нмоль/сек·г белка.

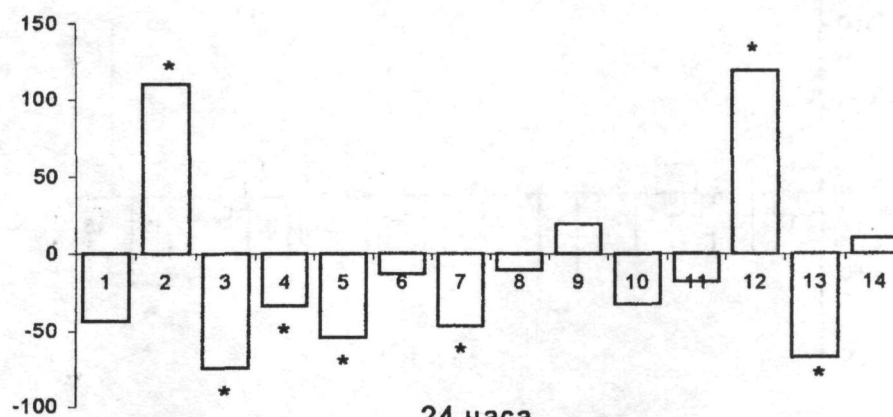
Таблица 2. Биохимические показатели легких крыс после отравления оксидами азота в разные сроки наблюдения ($\bar{x} \pm m$)

Время после отравления	АК мг/л	ОФ мг/л	АК / ОФ	СОД отн.ед	Кат	Г-6-ФДГ	ГР	сумм SH (мМ)	сумм SS (мМ)	сумм SH/SS	ГПД отн. ед	МДА мкмоль/г _{тк}	ЛК отн. ед
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Интактные животные	0,08 $\pm 0,04$	0,12 $\pm 0,01$	0,67 $\pm 0,3$	60,64 $\pm 22,69$	0,135 $\pm 0,041$	0,27 $\pm 0,115$	0,081 $\pm 0,029$	н/п	н/п	н/п	5,78 $\pm 1,55$	2,04 $\pm 0,27$	7,4 $\pm 1,8$
3 часа	0,06 $\pm 0,01$	0,07 $\pm 0,01$	0,86 $\pm 0,38$	58,75 $\pm 6,27$	0,141 $\pm 0,027$	0,238 $\pm 0,038$	0,069 $\pm 0,018$	н/п	н/п	н/п	4,37 $\pm 1,7$	2,55 $\pm 0,34$	12,3 * $\pm 1,5$
Интактные животные	0,07 $\pm 0,03$	0,16 $\pm 0,02$	0,47 $\pm 0,25$	69,46 $\pm 20,88$	0,147 $\pm 0,016$	0,263 $\pm 0,108$	0,027 $\pm 0,007$	6,21 $\pm 1,05$	2,15 $\pm 0,44$	2,99 $\pm 0,67$	6,32 $\pm 0,45$	3,58 $\pm 0,67$	8,2 $\pm 1,8$
24 часа	0,06 $\pm 0,02$	0,1 $\pm 0,01$	0,55 $\pm 0,17$	43,64 * $\pm 5,61$	0,043 * $\pm 0,002$	0,214 $\pm 0,04$	0,015* $\pm 0,002$	5,25 $\pm 1,14$	2,87 $\pm 0,77$	1,86 $\pm 0,12$	5,43 $\pm 0,68$	1,65 * $\pm 0,08$	16,9 * $\pm 3,7$
Интактные животные	0,05 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,05$	0,31 $\pm 0,05$	61,04 $\pm 10,12$	0,138 $\pm 0,022$	0,23 $\pm 0,127$	0,079 $\pm 0,028$	4,96 $\pm 0,82$	1,83 $\pm 0,25$	2,77 $\pm 0,63$	4,13 $\pm 0,82$	4,08 $\pm 1,06$	7,1 $\pm 1,6$
72 часа	0,06 $\pm 0,01$	0,14 $\pm 0,02$	0,43 $\pm 0,01$	59,1 $\pm 18,11$	0,106 $\pm 0,002$	0,236 $\pm 0,024$	0,082 $\pm 0,006$	3,75 $\pm 0,25$	2,63 $\pm 0,13$	1,43 $\pm 0,03$	4,7 $\pm 0,4$	2,73 $\pm 0,29$	8,5 $\pm 1,2$

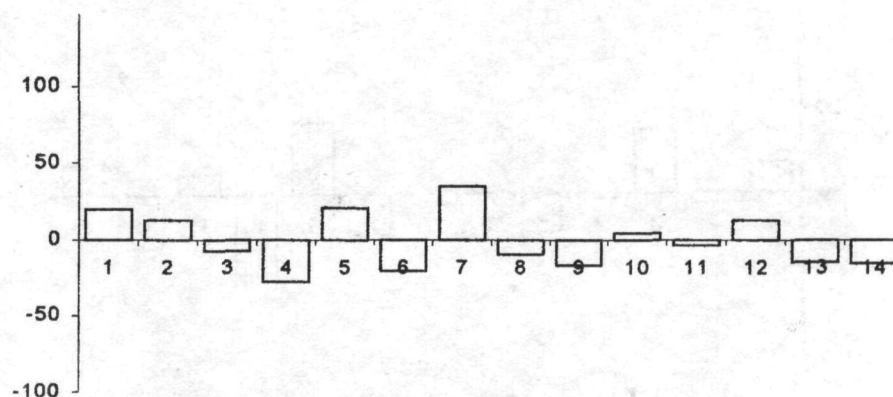
Примечание. * - различия достоверны ($P \leq 0,05$) с группой интактных животных, н/п - измерение не проводилось



3 часа



24 часа



72 часа

Рисунок 1.

Коэффициент отклонения биохимических показателей крови крыс от контрольных значений через 3, 24, 72 часа после отравления оксидами азота. 1 - АК, 2 - ОФ, 3 - АК/ОФ, 4 - СОД, 5 - Каталаза, 6 - Г-6-ФДГ, 7 - ГР, 8 - белковые SH-группы, 9 - белковые SS-группы, 10 - белковые SH/SS, 11 - небелковые SH-группы, 12 - небелковые SS-группы, 13 - небелковые SH/SS, 14 - ГПЛ.

* - различия достоверны ($P \leq 0,05$) с группой интактных животных.

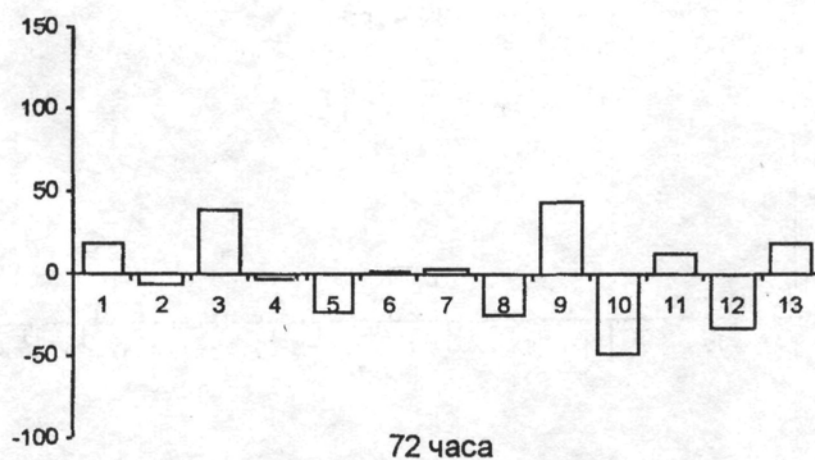
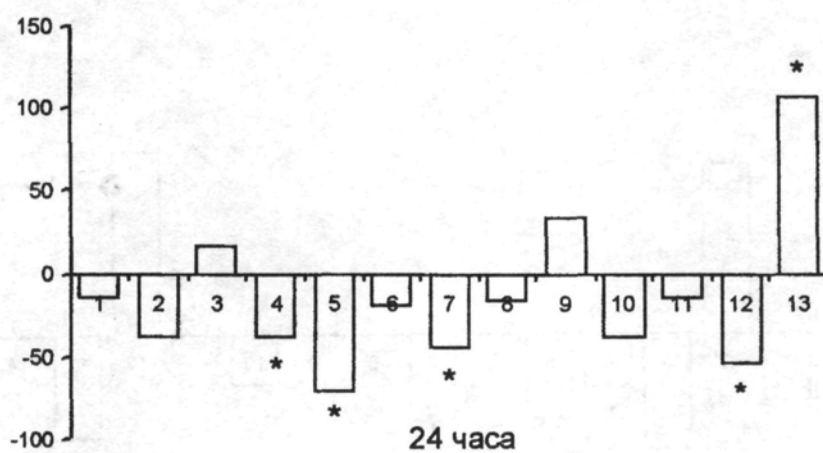
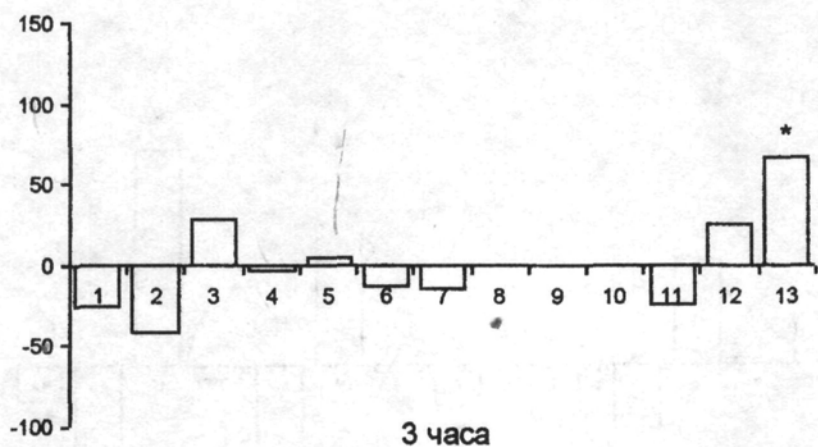


Рисунок 2.

Коэффициент отклонения биохимических показателей легких крыс от контрольных значений через 3, 24, 72 часа после отравления оксидами азота. 1 - АК, 2 - ОФ, 3 - АК/ОФ, 4 - СОД, 5 - Каталаза, 6 - Г-6-ФДГ, 7 - ГР, 8 - суммарные SH-группы, 9 - суммарные SS-группы, 10 - суммарные SH/SS, 11 - ГПЛ, 12 - МДА, 13 - ЛК.

* - различия достоверны ($P \leq 0,05$) с группой intactных животных.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменения в состоянии компонентов АОС, в первую очередь неферментативного звена, как в крови, так и в легких сопровождают развитие ТОЛ и совпадают по времени с динамикой выраженности отека легких. Так, в начальный период развития ТОЛ, через 3 ч после отравления, в крови животных опытной группы наблюдается накопление небелковых и белковых дисульфидных групп с одновременным снижением уровня соответствующих сульфгидрильных групп. Однако в легочной ткани отсутствуют статистически достоверные изменения состояния компонентов АОС. По-видимому, в данный период времени происходит формирование гипоксии. Нарастающий отек легких вызывает нарушение оксигенации крови и недостаток кислорода в организме для обеспечения энергетических процессов. Известно, что гипоксия является одной из самых главных причин активизации процессов свободнорадикального и перекисного окисления и развития оксидативного стресса. Но в начальном периоде формирования оксидативного стресса страдают, как правило, наиболее лабильные компоненты антиоксидантной системы - тиоловые группы, в особенности небелковые. Активность ферментов антиоксидантной системы не изменяется.

Через сутки после отравления, когда отек легких достигает максимума, нарушения в состоянии компонентов АОС наиболее выражены. Данные изменения характеризуются не только снижением уровня восстановленных и накоплением окисленных эквивалентов неферментативного звена АОС, но и уменьшением активности ферментов антирадикальной и антиперекисной направленности. Несколько менее выраженные изменения в АОС легких по сравнению с таковыми в крови, по-видимому, обусловлены накоплением отечной жидкости в тканях легких. С другой стороны, вышеупомянутые различия могут быть обусловлены и вымыванием продуктов ПОЛ в кровь. Характерно, что через трое суток, когда у выживших животных легочный коэффициент практически нормализуется, перестают отличаться от нормальных значений и параметры АОС как в легких, так и в крови.

Из приведенных экспериментальных данных можно сделать выводы, что интегральные изменения в состоянии компонентов АОС:

- имеют большую выраженность в крови, чем в легких;
- не опережают, а скорее следуют за развитием отека легких.

По современным представлениям отек легких формируется вследствие несоответствия между скоростью просачивания жидкой части крови за пределы сосудистого русла и дренажа межклеточной жидкости. Если при так называемых "сердечных" отеках легких главной причиной упомянутого несоответствия является повышение давления в сосудах малого круга кровообращения, то при токсическом отеке - повреждение ядовитым веществом клеток и других структур, составляющих гематоальвеолярный барьер. При этом происходит нарушение либо его целостности, либо функционального состояния. Основными структурами гематоальвеолярного барьера являются клетки эндотелия, распластанные на базальной мембране капилляров, соединительнотканый каркас альвеол, базальная мембрана с прикрепленными к ней эпителиальными клетками. Наиболее важное значение для создания барьера просачиванию жидкости в просвет альвеол из вышеперечисленных структур имеют

эндотелиальные клетки, в связи с этим их можно считать критической структурой в развитии отека.

Вместе с тем, определить причинно-следственную связь между изменениями компонентов АОС в клетках критических структур легочной ткани и структурно-функциональными нарушениями в этих структурах не представляется возможным. Этому, по нашему мнению, есть два объяснения - либо методы выявления изменений в АОС, примененные нами, достаточно грубы и не способны выявить тонкие биохимические сдвиги на субклеточном уровне, либо изменения в АОС являются вторичными по отношению к механизмам развития отека легких и при этом носят не локальный органический, а генерализованный характер.

В случае, если нарушения состояния АОС в клетках критических структур легких являются первичными по отношению к последовательности событий, приводящих к отеку легких, то правильный подбор доз, компонентов и путей введения антиоксидантов на ранних стадиях развития отека (или в качестве профилактики) позволят снизить степень выраженности (или даже предотвратить) развитие отека легких и при этом также снизить летальность. Во втором случае правильное применение антиоксидантов скорее всего мало повлияет на степень выраженности отека легких, однако позволит снизить летальность.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Menlenbelt J., Dormans J., Marra M., Ronbout P., Sangester B.* (1992) *Hum. and Exp. Toxicol.* 11, N 3, 179-187.
2. *Галкин Б.Н., Баринев В.А., Тиунов Л.А., Головенко Н.Я., Олешко А.Я.* (1990) Актуальные проблемы лекарственной токсикологии. - Тез. докл. Всесоюз. конф. Москва., 63-64.
3. *Соколовский В.В., Белозерова Л.А., Огурцова Р.А.* (1977) *Лаб. дело*, N 1, 26-27.
4. *Чумаков Н.В., Осинская Л.Ф.* (1977) *Вопр. мед. химии*, N5, 712-716.
5. *Beutler E.* (1975) *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*, N.Y., S-Francisco: Grune and Stratton.
6. *Путилина Ф.Е.* (1982) В кн. *Методы биохимических исследований*, Ленинград, с. 181-183.
7. *Путилина Ф.Е., Зойдзе С.Д.* (1982) В кн. *Методы биохимических исследований*, Ленинград, с. 168-172.
8. *Itzhaki R.F., Gill D.M.* (1964) *Analyt. Biochem.* N 3, 401-410
9. *Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И.* (1983) *Лаб. дело*, № 4, 35-36.
10. *Орехович В.Н.* (1977) *Современные методы в биохимии*, М., с. 66-68.

Поступила 14.12.99.

**BLOOD AND LUNG ANTIOXIDANT SYSTEM
OF RATS WITH THE TOXIC PULMONARY EDEMA.**

**N.PLUZHNIKOV, A.TYAPTIN, YU. LUPACHYOV, A.ZEMLYANOV,
M.VARLASHOVA, P.TORKOUNOV, N.NOVOYOLOVA.**

**Research Institute of Military Medicine,
Defence Ministry of Russian Federation, St-Peterburg,
fax:(812) 527-3957**

The state of enzymatic and non- enzymatic components of antioxidant system and also lipid peroxidation processes in blood and lungs of rats with toxic pulmonary edema induced by inhalation of nitric oxides were investigated. The changes in the state of blood and lung antioxidant system components accompany the development of toxic pulmonary edema and coincide in time-course of edema manifestation. The determined changes were more pronounced in blood than in lungs.

Key words: toxic pulmonary edema, nitric oxides, antioxidant system, lipid peroxidation.