Биомедицинская химия, 2003, том 49 №5, с.456-462

УДК: 612.2\6: 577.161.2.011
©Ю.В. Нестеров, Д.Л. Теплый

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРЕСС-РЕАКТИВНОСТИ ЛЕГКИХ В ОТНОШЕНИИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Ю.В. Нестеров, Д.Л. Теплый

Астраханский государственный педагогический университет,
414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна,1; тел.: (8512) 22-93-47;
факс: (8512) 25-17-18; эл.почта: aspu@aspu.ru

На модели острого эмоционально-болевого стресса у крыс выявлены стрессорные изменения поверхностной активности, содержания липидных компонентов, процессов перекисного окисления липидов в легочной ткани. Изучение стресс-чувствительности легких в сравнительно-возрастном аспекте показало различную направленность и выраженность изменений ряда показателей метаболической функции легких у животных разного возраста. Результаты исследований демонстрируют большую стресс-устойчивость легких относительно поверхностной активности и свободнорадикальных процессов в раннем постнатальном онтогенезе и выраженное повреждающее действие острого стресса у половозрелых животных.

Ключевые слова: липидный обмен, поверхностная активность, перекисное окисление липидов, стресс, возраст.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема стресса и резистентности организма к экстремальным факторам среды по-прежнему остается актуальной. Малоизученным остается вопрос о реализации стресса на уровне отдельных органов, в частности, об органоспецифических особенностях стресс-реактивности дыхательной системы, особенно нереспираторных, метаболических функций легких. Как известно, легкие - орган с чрезвычайно высоким уровнем метаболизма липидов, функции которых могут определять режим адаптации ткани и устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов [1-3]. Многочисленными исследованиями показано, что нарушения в структуре и составе липидов легочной ткани и сурфактанта неизбежно влияют на функции органа и способствуют развитию патологического процесса [4,5]. Немаловажным аспектом в изучении функционального значения липидного обмена в легочной ткани является оценка сурфактанта, поверхностная активность которого (ПА) служит индикатором состояния респираторных отделов легкого и внутриклеточных биосинтетических процессов [6, 7]. Наряду с этим, ведущую роль в патогенезе стрессорного повреждения играет активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые, в свою очередь, имеют особое значение для бронхолегочного аппарата [8-10].

До сих пор практически отсутствуют данные об онтогенетических особенностях стресс-чувствительности респираторной системы, в то время как возрастной аспект исследования метаболической функции легких позволит существенно углубить представления о возрастных особенностях механизмов адаптации этой важнейшей функции легких к экстремальным стресс-индуцирующим воздействиям.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было изучение в эксперименте особенностей стрессорного ответа легочной ткани в отношении липидного обмена у животных разных возрастных групп.

МЕТОДИКА. Исследования проводились на 92 крысах-самцах линии Вистар трех возрастов: неполовозрелых 6-недельных средней массой 84 г, половозрелых 6-месячных средней массой 204 г и старых 25-месячного возраста средней массой 362 г. Острый эмоционально-болевой стресс моделировали электрокожным раздражением (ЭКР) [11]. Животных помещали в прямоугольную камеру с решетчатым металлическим полом, куда подавали электрический ток напряжением 30 В в течение 30 мин с интервалами в 30 сек. После этого животных сразу забивали под нембуталовым наркозом (в дозе 5 мг/100г), забирали кровь и получали гомогенаты легочной ткани. Контролем служили интактные крысы, соответствующего возраста.

Состояние сурфактанта оценивали по методу Паттла, изучая стабильность пузырьков воздуха, выжатых из ткани легкого. В гомогенатах ткани определяли: содержание общих липидов (ОЛ, сульфофосфованилиновым методом), общий холестерин (ОХ, по методу Илька), β-липопротеины (ЛПНП, турбидиметрическим методом), гидроперекиси липидов (ГПЛ, родановым методом), малоновый диальдегид (МДА), скорость спонтанного (Сп.ПОЛ) и аскорбат-зависимого (Аз.ПОЛ) пероксидного окисления (тиобарбитуровым методом). Экстинцию всех проб измеряли на КФК-3 при соответственно λ=560, λ=630, λ=530, λ=480 и λ=532 нм.

Для сравнения содержание холестерина и ЛПНП определяли также в периферической крови.

Кроме того, определяли весовой коэффициент легких (ВК) - отношение массы легких к массе тела и сухой остаток ткани легких (СО), который выражали в % к массе сухой ткани. Все данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. После вскрытия грудной клетки при визуальном осмотре наблюдали изменения цвета стрессированных легких, которые были багрово-красными, буллезно вздутыми, в них отмечались мелкие кровоизлияния. Анализ показателей, характеризующих степень оводнения легочной ткани, обнаружил видимое изменение весового коэффициента легких у взрослых 6-месячных крыс после стресса, что указывает на развитие отечности. На развитие отечности легких после ЭКР указывало достоверное снижение сухого остатка ткани, причем более выраженное снижение этого показателя наблюдалось у неполовозрелых крыс (на 24,8%) по сравнению со взрослыми животными (на 7,8%, $p < 0,05$). Обращает на себя внимание различие в контрольных значениях этого параметра у крыс разного возраста (табл.). У крысят он заметно выше, что также может указывать на большую синтетическую активность их легочной ткани.

Результаты показывают, что реакция дыхательной системы на стресс проявляется в отклонении изучаемых метаболических параметров, причем выраженность и направленность этих изменений имеют возрастную специфику.

После ЭКР выявлено значительное снижение стабильности легочной пены у взрослых и старых крыс, что указывает на редукцию ПА альвеолярной выстилки. Это может быть следствием снижения секреции ПАВ легких или изменения их качественного состава в условиях гипервентиляции при 30-минутном электрораздражении. Достоверного изменения этого показателя у крысят не обнаружено (табл.). При этом исходное значение КС пузырьков Паттла у старых животных на 22% выше, чем у двух других возрастных групп, что может свидетельствовать о большей стабильности альвеолярного сурфактанта. Наряду с этим, стресс сопровождался увеличением содержания общих липидов в легких крысят (на 80%). Достоверного изменения их уровня в ткани легких животных других возрастов не обнаружено, однако наблюдалась выраженная тенденция к их стрессорному накоплению у 6-месячных (на 38,7%) и уменьшению у старых крыс (на 16,8%) (табл.).

В ходе эксперимента достоверных изменений содержания в легких холестерина не обнаруживалось, хотя тенденция к его повышению в условиях стресса наблюдалась у животных всех возрастных групп. Обращает на себя

Таблица. Влияние острого эмоционально-болевого стресса на показатели липидного обмена

Показатели	Группы животных	Возраст животных		
		Неполовозрелые 6 недель	Половозрелые 6 месяцев	Старые 25 месяцев
ВК, отн. ед.	контроль	0,74±0,04	0,90±0,12	0,79±0,03
	стресс	0,84±0,07	0,78±0,07	1,03±0,13
СО, %	контроль	22,1±0,58	20,6±0,42	19,0±0,67
	стресс	16,7±0,98***	19,0±0,57*	20,2±0,53
КС, усл. ед.	контроль	0,74±0,04	0,73±0,04	0,93±0,01
	стресс	0,76±0,03	0,57±0,05*	0,71±0,05**
ОЛ, г/л экстракта	контроль	2,21±0,56	3,48±0,68	6,09±0,29
	стресс	4,01±0,43*	4,83±0,20	5,07±0,43
ОХ, ммоль/л экстр.	контроль	0,37±0,19	0,75±0,25	5,95±0,44
	стресс	0,62±0,16	1,13±0,37	6,61±0,17
ЛПНП, мг%	контроль	184,8±27,5	104,8±18,8	157,2±14,4
	стресс	195,8±28,2	234,9±45,6*	107,0±17,3*
ГПЛ, ед/0,05 г	контроль	0,043±0,013	0,04±0,01	0,30±0,04
	стресс	0,095±0,029	0,34±0,06***	0,52±0,03**
МДА, нмоль/0,05 г	контроль	2,02±0,30	1,46±0,22	1,35±0,19
	стресс	3,44±1,06	2,74±0,50*	1,22±0,12
Сп.ПОЛ, нмоль/ч	контроль	8,35±1,26	8,39±1,21	5,82±0,54
	стресс	6,60±0,92	15,8±1,33**	6,95±0,89
Аз.ПОЛ, нмоль/ч	контроль	13,0±4,57	7,88±1,1	6,63±0,92
	стресс	19,4±4,09	26,7±6,7*	7,64±1,12

Примечание. * - p <0,05; ** - p <0,01; *** - p<0,001 в сравнении с контролем

внимание значительное увеличение с возрастом содержания в легочной ткани общего холестерина - у старых крыс его исходный (контрольный) уровень более чем в 5 раз выше, чем у крысят (p<0,001) и 6-месячных животных (p<0,01). Обнаружены выраженные возрастные различия в стрессорном уровне липопротеинов низкой плотности. Так, содержание ЛПНП увеличилось по сравнению с контролем более чем в 2 раза только в ткани легких взрослых стрессированных крыс. У неполовозрелых животных стрессорного изменения этого параметра не выявлено, в то время как у старых крыс содержание в легких этого компонента снизилось после стресса на 32% (табл.).

Показаны возрастные различия в стресс-реакции крови по этим показателям (рис.). Анализ крови на содержание изучаемых категорий липидов выявил значительное повышение стрессорного уровня общего холестерина у половозрелых 6-месячных (на 186%, p <0,05) и его снижение у 6-недельных крыс (на 70,8%, p <0,05). Изменений после ЭКР этого показателя у старых животных не обнаружено. При этом, как и в случае с легкими, имеет место более высокий исходный уровень холестерина в крови 25-месячных крыс по сравнению с более молодыми. Как видно на рисунке, исходные значения этого показателя крови были достоверно различными у животных трех возрастных групп. В то же время, стресс не сопровождался достоверными изменениями содержания в крови ЛПНП у крысят и половозрелых животных, в то время как у старых показано значительное снижение этого компонента после ЭКР (на 103% по сравнению с контролем) (рис.).

Холестерин является одним из главных компонентов ламеллярных телец и альвеолярной поверхностно-активной выстилки легких [7]. Как известно, основным поставщиком холестерина тканям являются липопротеины низкой плотности и хиломикроны, циркулирующие в крови [3]. Можно полагать, что при стрессе имеет место усиление доставки к легким липопротеиновых комплексов и их депонирование с последующим метаболизмом. В пользу этого указывает выявленное нами заметное снижение уровня ЛПНП в периферической крови стрессированных крыс.

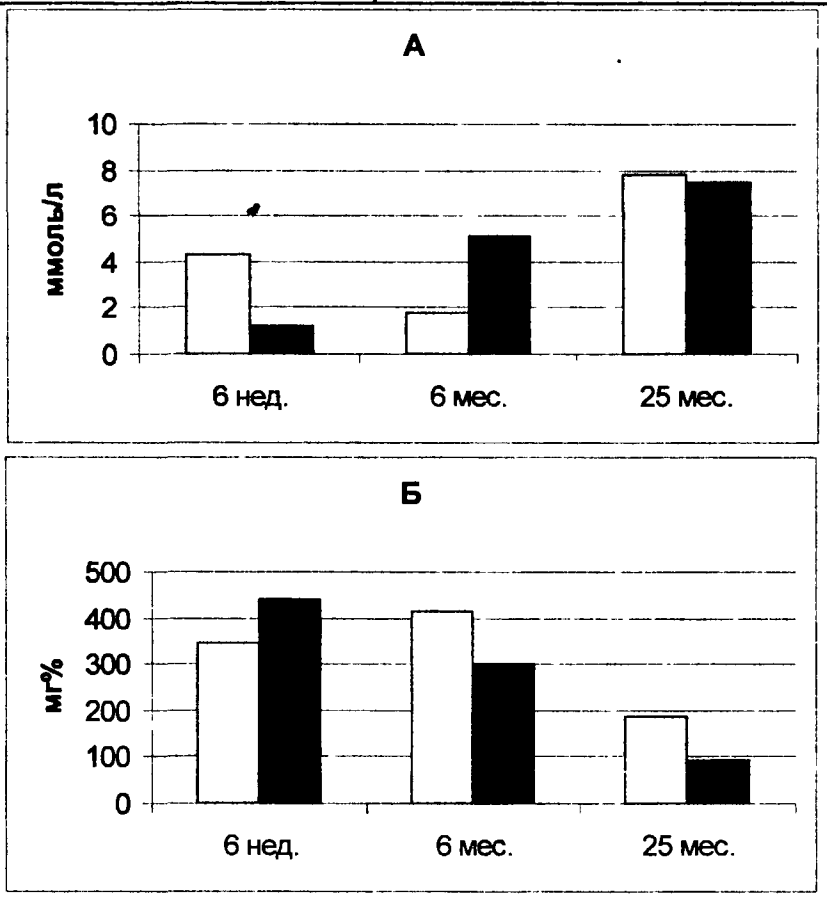

Рисунок.
Содержание холестерина (А) и липопротеинов низкой плотности (Б) в крови при остром электрораздражении у животных разного возраста. Светлые столбики - контроль, темные -стресс.

Однократное ЭКР отразилось на интенсивности ПОЛ в легочной ткани, что подтверждалось соответствующими изменениями всех изучаемых параметров (табл.). Так, после ЭКР у 6-месячных крыс содержание в легких ГПЛ увеличилось по сравнению с контролем в 7 раз, МДА - в 2 раза. Скорость спонтанного ПОЛ повысилась на фоне стресса почти в 2 раза, а индуцированного - более чем в 3 раза. У старых крыс острый стресс сопровождался выраженным накоплением в легочной ткани ГПЛ (на 68,8% по сравнению с контролем). Обращает на себя внимание более высокий исходный уровень ГПЛ в легких старых крыс, более чем в 6 раз превышающий таковой у крысят ($p<0,001$) и 6-месячных ($p<0,001$). Достоверных изменений в содержании МДА и кинетических характеристик ПОЛ у животных этой группы не выявлено, хотя скорость спонтанного и аскорбат-зависимого окисления тенденциозно возрастала на 19,4% и 15,2% соответственно. При этом, стрессорных изменений этих показателей в легких неполовозрелых крыс выявить не удалось (табл.).

Современные исследования, выявляющие перераспределение состава липидов в органах, тканях и субклеточных фракциях у животных в процессе онтогенеза единичны. В известных работах изучалось содержание свободных жирных кислот липидных фракций крови и показано, что накопление отдельных жирных кислот значительно выше в более ранние возрастные периоды, а именно менее 30 суток после рождения [12]. Есть данные об увеличении уровня общих фосфолипидов сыворотки крови у крыс в постнатальный период от 6 до 30 недель [13]. Отмечено снижение с возрастом содержания фосфолипидов на фоне

увеличения других липидных фракций крови и аорты крыс [14]. В работе [15] изучались возрастные особенности фосфолипидного состава эритроцитов крыс линии Вистар в процессе постнатального онтогенеза. Обнаружено значительное увеличение относительного содержания фосфатидилхолина к 30 суткам от момента рождения. В дальнейшем уровень фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина продолжал плавно снижаться. Содержание этих фосфолипидов достигало постоянных значений к периоду 3-х месячного развития и далее не претерпевало существенных изменений. Авторы полагают, что перераспределение компонентов фосфолипидов может быть связано с возрастным снижением скорости их синтеза и самообновления в возрасте полового созревания и взросления. Делается заключение, что при формировании фосфолипидного пула эритроцитов крыс в процессе постнатального развития можно выделить возрастные периоды, характеризуемые изменением относительного содержания липидных компонентов, активных в метаболическом отношении, отсутствием или наличием отдельных классов. Выделено 3 таких периода гомеостаза фосфолипидов в условиях физиологической нормы, а именно: постэмбриональный (30-40 дней от рождения), когда происходит усиленное формирование спектра фосфолипидов; период половой зрелости и взросления, сопровождающийся скачкообразными изменениями в уровне жирных кислот; период зрелости с замедленным течением метаболических процессов в структурных липидах, стабилизацией их состава.

Выявленная в наших исследованиях большая устойчивость легких по показателям липидного обмена у неполовзрелых крыс при стрессе связана, вероятно, с усиленным метаболизмом и мобилизацией липидных компонентов в этом возрастном периоде. В целом, результаты наших исследований позволяют говорить о стандартных изменениях липидного обмена при экстремальном воздействии на органном уровне, которые носят адаптивный характер и, несомненно, связаны с нейрогормональной регуляцией.

Стресс-синдром характеризуется значительным возбуждением гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной и адренергической систем регуляции. При остром и достаточно интенсивном эмоционально-болевом воздействии активируется симпато-адреналовая система и подавляются холинергические процессы [16, 17]. Повышение уровня катехоламинов, которое обнаружено и в наших исследованиях [18], приводит к мобилизации жировых ресурсов с помощью гидролиза триглицеридов жировых депо и выхода свободных жирных кислот в кровь, откуда они могут активно захватываться легкими. Не исключена возможность непосредственного влияния катехоламинов на образование общего холестерина и триглицеридов в печени, откуда они попадают в кровь в составе липопротеинов низкой плотности. Повышение уровня последних в крови отмечено, в частности, при адреналиновом повреждении миокарда, обезвоживании и воздействии электромагнитного поля [2]. В свою очередь, наши исследования показывают выраженное стрессорное повышение уровня холестерина в крови, его заметное повышение в легких и значительное накопление ЛПНП в легочной ткани (у взрослых животных).

Результаты изучения стресс-чувствительности легких в сравнительно-возрастном аспекте демонстрируют различную выраженность изменений показателей метаболической функции у животных разного возраста. Так, обнаружено снижение поверхностно-активных свойств, накопление ЛПНП в легких взрослых 6-месячных крыс при стрессе, который сопровождается стабильностью этих показателей у крысят. При этом у последних, в отличие от половозрелых животных, острый стресс вызывает значительное повышение содержания в легких общих липидов. Отличительной особенностью более позднего этапа онтогенеза является несоизмеримо высокий уровень холестерина в легочной ткани и периферической крови, а также снижение липопротеинных комплексов низкой плотности в легких на фоне стресса.

Таким образом, можно сделать заключение о большей устойчивости легких к однократному действию экстремального фактора в раннем постнатальном онтогенезе. Такая ареактивность может быть связана, в первую очередь, с онтогенетическими особенностями нейрогормональной системы регуляции.

Известно, что первыми "медиаторами" стресса являются гормоны надпочечников и именно гипоталамо-гипофизарно-кортикоидная система запускает стресс-реакцию, которая сопровождается многочисленными вегетативными, метаболическими сдвигами [19]. В частности, стресс реализует свое действие на липидный обмен путем активации выброса катехоламинов, которые увеличивают содержание в тканях cAMP, что ведет к триаде изменений: повышению активности липаз, проявлению детергентного действия избытка жирных кислот на мембраны и активацию ПОЛ. Ареактивность метаболизма легких к действующему экстремальному фактору у 6-недельных крыс может быть связана с незрелостью нейроэндокринных механизмов регуляции, недостаточным выбросом "гормонов стресса" или их истощением во время стресс-реакции. Также имеет значение тот факт, что количество рецепторов и их чувствительность к стресс-реализующим гормональным факторам в периферических органах и тканях гораздо ниже в раннем возрасте [20, 21].

Адаптация к экстремальным ситуациям у предпубертатных животных обеспечивается, по видимому, главным образом нервными механизмами регуляции, а именно симпатической системой, выполняющей "аварийные" функции и обеспечивающей мобилизацию резервов организма при стрессе [22]. В то время как в более позднем онтогенезе первостепенное значение в реализации стресс-реакции имеют гуморальные факторы. Таким образом, причины возрастных особенностей реагирования дыхательной системы в отношении липидного обмена на стрессор связаны с различной степенью функциональной зрелости как отдельных звеньев нейрогормональной системы регуляции, так и местных метаболических механизмов, ответственных за реализацию стресс-реакции на органном уровне. Вполне очевидно, что ареактивность легочной ткани в ранние периоды постнатального онтогенеза играет положительную роль для растущего организма, т. к. обеспечивает надежность функционирования этой важнейшей системы в условиях экстремальных состояний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мотавкин П.А., Гельцер Б.И.* (1998) Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. М.: Наука.
2. *Петрина С.Н., Юшина Л.В.* (1989) Патол. Физиол. экспер. тер., №3, 51-55.
3. *Симбирцев С.А., Беляков Н.А., Ливчак М.Я.* (1983) Изолированное легкое. Л.: Медицина.
4. *Михайлов Д.М.* (1996) Тез. докл. I-го Росс. конгресса по патофизиологии. - М.:РГМУ. с.109.
5. *Сыромятникова Н.В., Гончарова В.А., Котенко Т.В.* (1987) Метаболическая активность легких. Л.: Медицина.
6. *Березовский В.А., Горчаков В.Ю.* (1982) Поверхностно-активные вещества легкого. Киев: Медицина.
7. *Биркун А.А., Нестеров Е.Н., Кобозев Г.В.* (1981) Сурфактант легких. Киев: Здоровь'я.
8. *Верболович В.П., Петренко Е.П., Подгорный ЮК.* (1983) Сурфактанты легкого в норме и патологии. Киев: Наукова думка. с.98-109.
9. *Журавлев А.И.* (1982) Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М.: Наука.
10. *Меерсон Ф.З., Малышев В.Е., Каган В.Е.* (1980) Архив патологии. **42**, №2, 9.

11. *Буреш Я., Бурешова О, Хьюстон Дж.П.* (1991) Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.:Высшая школа.
12. *Samel M., Pullman R.* (1993) Bratisl. Lec. **94**, 361-365.
13. *Tsuchiya N. et al.* (1995) Exp. Anim. **43**, 671-678.
14. *Frolkis V. et al.* (1997) Mech. Ageing. Dev. **97**, 207-214.
15. *Новгородцева Т.П., Эндакова Н.А., Иванова И.Л.* (2002) Физиол. журн. И.М. Сеченова, **88**, 53-62.
16. *Фурдуй Ф.И.* (1987) Механизмы развития стресса. Кишинев: Штиинца. с.8-33.
17. *Филаретов А.А., Подвигина Т.Т., Богданова Т.С.* (1990) Физиологический журн. им. И.М. Сеченова, **76**, 913-918.
18. *Нестеров Ю.В.* (2003) Естественные науки. №6, 92-97.
19. *Федоров Б.М.* (1991) Стресс и система кровообращения. М.: Медицина.
20. *Угрюмов М.В.* (1989) Нейроэндокринная регуляция в онтогенезе. М.:Наука.
21. *Дернер Г., Гейц Ф., Роде В.* (1990) В кн.: Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. Новосибирск: Наука, с.67-77.
22. *Ноздрачев А.Д. и др.* (1994) Физиологический журн. им. И.М. Сеченова. **80**, №9, 2-12.

Поступила 17.03.2002.

ONTOGENETIC PARTICULARS STRESS-REACTIVE OF LUNGS IN CONNECTION OF LIPIDS METABOLISM

J.V. Nesterov, D.L. Teply

Astrakhan Pedagogical University.
ul. Shaumana, 1, Astrakhan, 414000 Russia; tel: (8512) 22-93-47; fax: (8512) 25-17-18.

The changes of surface activity, lipid components and lipid peroxidation were found in lung tissue under conditions of emotional-pain stress in rats Study of stress-sensitivity of lung tissue showed different direction and manifestation of metabolic changes of lipid metabolism in young and adult rats.

Key words: lipids metabolism, surface activity, lipid peroxidation, stress, age