

УДК 616.24-005.98:615.916:577.

©Коллектив авторов

## СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ОТЕКЕ ЛЕГКИХ

*Н.Н. Плужников, А.А. Тяптин, А.В. Земляной, М.Б. Варлашова,  
П.А. Торкунов, Ю.А. Лупачев.*

Научно-исследовательский центр медико-биологической защиты государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины МО РФ, 195043, С-Петербург, ул. Лесопарковая 4, факс: (812) 527-39-57; эл.почта: pasha @ ot. 7677.spb.edu

Изучали состояние ферментативного и неферментативного звена антиоксидантной системы, а также процессов перекисного окисления липидов в мозге крыс в динамике токсического отека легких. Показано, что развитие токсического отека легких сопровождается изменениями в состоянии антиоксидантной системы мозга. Наибольшие сдвиги обнаружены в неферментативном звене антиоксидантной системы, а именно, в содержании тиоловых и дисульфидных групп. Изменений активности процессов перекисного окисления липидов в ткани мозга не обнаружено.

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

**ВВЕДЕНИЕ.** До настоящего времени остается не совсем понятным значение и место центральной нервной системы в формировании и течении токсического отека легких (ОЛ). Согласно забытой, но пока не опровергнутой, нервно-рефлекторной теории возникновения токсического ОЛ, в основе повышенной проницаемости легочных сосудов лежит нервно-рефлекторный механизм [1]. С другой стороны, гипоксия (а по некоторым данным, гипоксический шок), возникающая в результате дыхательной недостаточности, способна в значительной степени изменить функционирование центральной нервной системы и тем самым повлиять на течение ОЛ. Результатом действия гипоксии, как известно, может стать активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Целью нашего исследования явилось изучение ПОЛ и различных звеньев антиоксидантной системы (АОС) мозга крыс в динамике развития токсического отека легких. Ранее было исследовано состояние ПОЛ и АОС в крови и ткани легких на той же модели отравления животных [2].

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполнены на 120 белых беспородных крысах-самцах массой 160-220 г. Животные находились в условиях вивария на обычном рационе питания. Отравление оксидами азота производили статическим методом, при котором животных помещали в герметичную затравочную камеру в газовую среду с данным пульмонотоксикантом на фиксированное время. Продолжительность ингаляции газа составляла 30 мин при средней концентрации токсиканта в затравочной камере 300 мг/м<sup>3</sup> (0,3 мг/л). Такие условия эксперимента

позволяют получить у большей части животных выраженное отравление без летального исхода в ближайшие 24 ч после воздействия. Клиническая картина такого поражения характеризуется типичными признаками ОЛ: гиподинамией животных, синюшной окраской открытых участков кожи, урежением дыхания и хрипами. Для оценки степени выраженности отека легких производили определение легочного коэффициента (ЛК) по формуле:

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

Биохимическим исследованиям подвергали мозг выживших животных через 3, 24 и 72 ч после отравления. Оценивали состояние неферментативного звена антиоксидантной системы. С этой целью производили исследование тиолдисульфидного равновесия путем количественного определения сульфгидрильных и дисульфидных групп методом амперометрического титрования [3, 4]. Раздельно определяли белковые и небелковые сульфгидрильные (белковые SH, небелковые SH), дисульфидные (белковые SS, небелковые SS) группы и вычисляли соотношение их содержания (SH/SS-коэффициент). Определение содержания аскорбиновой кислоты (АК) и ее окисленных форм (ОФ) - дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот, а также расчет их соотношения (коэффициент АК/ОФ) проводили как описано [4]. Состояние ферментативного звена антиоксидантной системы оценивали, определяя активность Zn/Cu-зависимой супероксиддисмутазы (СОД) [5], каталазы (Кат) [6], глутатионредуктазы (ГР) [7] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [8]. Концентрацию белка определяли микробиуретовым методом [9]. Активность процессов ПОЛ оценивали по содержанию в биосубстрате гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА). ГПЛ определяли по изменению оптической плотности исследуемой пробы при длине волны 340 нм [10], а МДА - по его цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [11]. Для оценки направления и степени изменений биохимических показателей рассчитывали коэффициент отклонения от контроля (КОК) по формуле:

$$\text{КОК} = \frac{\text{Роп} - \text{Ри}}{\text{Ри}} \times 100\%$$

где Роп - среднее арифметическое значение параметра у животных в опытной группе, а Ри - среднее арифметическое значение параметра у интактных животных.

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

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Ингаляционное воздействие оксидов азота на крыс приводит к развитию отека легких, который выражается в увеличении их весового коэффициента. Возрастание ЛК наблюдается уже через 3 ч после окончания воздействия токсиканта (табл. 1). Через 1 сут значение данного показателя достигает максимума ( $p < 0,05$ ), а через 3 сут ЛК уменьшается и достоверно не отличается от его величины у интактных животных.

В мозгу отравленных животных (табл. 2, рис.) через 3 ч после начала эксперимента наблюдается уменьшение содержания белковых ( $p < 0,05$ ) и небелковых SH-групп ( $p < 0,05$ ), увеличение содержания небелковых SS-групп ( $p < 0,05$ ). Соответственно уменьшается небелковый SH/SS-коэффициент ( $p < 0,05$ ). При рассмотрении ферментативного звена АОС наблюдается снижение активности Г-6-ФДГ ( $p < 0,05$ ) (табл. 1, рис.). Через 24 ч после воздействия

Таблица 1. Динамика изменений биохимических показателей ферментативного звена АОС и процессов ПОЛ в мозгу крыс, отравленных оксидами азота

Показатели	Время после отравления					
	Интактные	3 ч	Интактные	24 ч	Интактные	72 ч
СОД отн. ед	16,67±1,05	18,69±1,98	28,15±3,21	20,93±1,35	24,57±1,27	23,12±1,72
Кат ммоль/сек·г белка	24,47±1,84	22,39±1,76	26,5±3,35	7,04±1,73*	19,29±4,17	13,18±1,03
СОД / Кат	0,7±0,063	0,83±0,057	1,13±0,142	3,38±0,821*	1,76±0,173	1,75±0,007
Г-6-ФДГ нмоль/сек·г белка	0,205±0,019	0,162±0,006*	0,435±0,076	0,384±0,062	0,36±0,021	0,33±0,074
ГР нмоль/сек·г белка	0,116±0,013	0,084±0,01	0,072±0,013	0,074±0,02	0,058±0,003	0,075±0,006*
ГПД отн. ед	3,85±0,78	3,69±0,36	3,3±0,46	3,03 ± 0,84	4,73±0,64	4,05±0,55
МДА мкмоль/г ткани	0,68±0,08	0,77±0,06	1,38±0,11	1,0±0,23	2,56±0,49	1,67±0,58
ЛК отн.ед	7,4±0,8	12,3±2,5	8,2±0,8	16,9±2,6*	7,1±0,7	8,5±1,2

Примечание: здесь и в табл. 2 \*р - различия достоверны ( $p \leq 0,05$ ) с группой интактных животных

токсиканта в мозгу отравленных животных снижаются белковый ( $p < 0,05$ ) и небелковый SH/SS-коэффициенты ( $p < 0,05$ ), что происходит в результате незначительного уменьшения содержания белковых и небелковых SH-групп и повышения уровня белковых и небелковых SS-групп. Снижение активности Кат ( $p < 0,05$ ) сопровождается увеличением коэффициента СОД/Кат ( $p < 0,05$ ). Обращает на себя внимание заметное, хотя и недостоверное снижение окисленных форм аскорбиновой кислоты. Через 3 сут все еще наблюдается уменьшение содержания белковых SH-групп ( $p < 0,05$ ), увеличение содержания белковых ( $p < 0,05$ ) и небелковых SS-групп ( $p < 0,05$ ), незначительное уменьшение содержания небелковых SH-групп. Соответственно уменьшаются как белковый ( $p < 0,05$ ), так и небелковый SH/SS-коэффициенты ( $p < 0,05$ ). При этом наблюдается увеличение активности ГР ( $p < 0,05$ ). Обнаружено значительное увеличение АК ( $p < 0,05$ ) и, соответственно, АК/ОФ коэффициента ( $p < 0,05$ ).

Анализ полученных результатов показывает, что изменение активности и содержания различных компонентов АОС носит фазный характер. За первые три

Таблица 2. Динамика изменений биохимических показателей неферментативного звена АОС мозга крыс, отравленных оксидами азота

Показатели	Время после отравления					
	Интактные	3 ч	Интактные	24 ч	Интактные	72 ч
Белковые SH ммоль/л	2,72±0,23	1,87±0,06*	3,1±0,21	2,45±0,34	3,29±0,24	1,97±0,01*
Белковые SS ммоль/л	1,44±0,15	1,99±0,28	1,75±0,18	3,15±0,82	1,77±0,14	3,93±0,02*
Белковые SH/SS	2,16±0,53	1,08±0,21	1,83±0,15	0,84±0,12*	1,89±0,13	0,50±0,01*
Небелковые SH ммоль/л	1,28 ± 0,08	0,93±0,05*	1,17±0,017	1,04±0,009	0,7±0,05	0,57±0,04
Небелковые SS ммоль/л	0,23±0,05	0,71±0,09*	0,19±0,02	0,23±0,02	0,23±0,02	0,49±0,09*
Небелковые SH/SS	6,48±0,93	1,42±0,18*	6,52±0,69	4,65±0,34*	3,21±0,37	1,22±0,29*
АК мг/л	0,21±0,08	0,24±0,09	0,23±0,06	0,21±0,08	0,19±0,05	0,36±0,11*
ОФ мг/л	0,14±0,03	0,12±0,05	0,26±0,09	0,12±0,03	0,17±0,07	0,15±0,07
АК/ОФ	1,67±0,12	2,15±0,18*	1,52±0,13	1,72±0,12	1,1±0,1	2,27±0,18*

## АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА МОЗГА ПРИ ОТЕКЕ ЛЕГКИХ

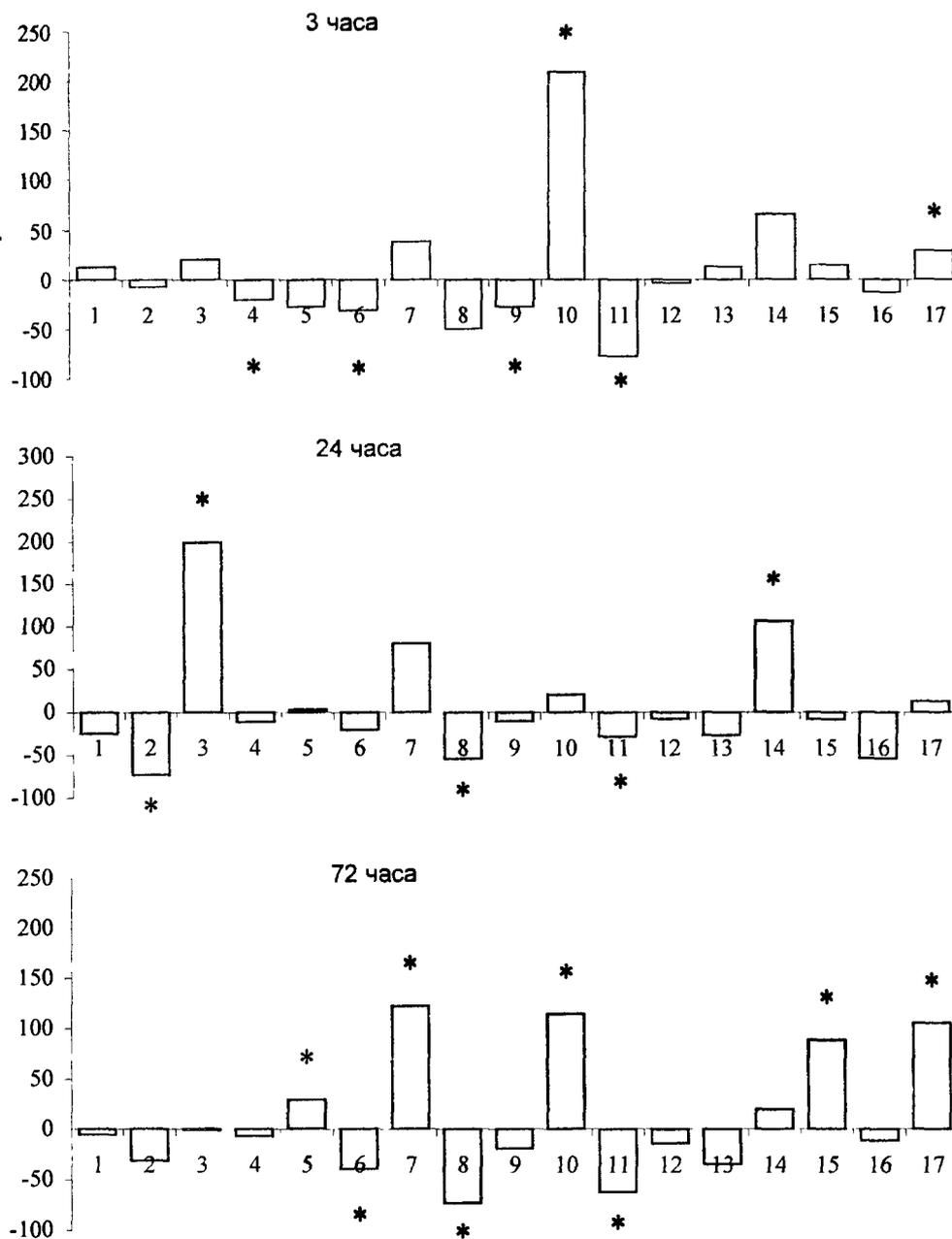


Рисунок.

Коэффициенты отклонения биохимических показателей мозга крыс от контрольных значений через 3, 24 и 72 часа после отравления оксидами азота. 1 - СОД, 2 - Кат, 3 - СОД/Кат, 4 - Г-6-ФДГ, 5 - ГР, 6 - белковые SH-группы, 7 - белковые SS-группы, 8 - белковые SH/SS, 9 - небелковые SH-группы, 10 - небелковые SS-группы, 11 - небелковые SH/SS, 12 - ГПД, 13 - МДА, 14 - ЛК, 15 -АК, 16 - ОФ, 17 - АК/ОФ; \* -  $p < 0,05$ .

часа развития токсического ОЛ в мозгу экспериментальных животных не изменяется содержание МДА и ГПД, что говорит о стабильном уровне ПОЛ. Существенно не меняется и состояние ферментативного звена АОС за исключением незначительного снижения активности Г-6-ФДГ. Наиболее значимым изменениям в ткани мозга подвергается тиолдисульфидный компонент

неферментативного звена АОС. На максимуме развития отека легких (через 24 ч после отравления) интенсивность ПОЛ в данной ткани остается неизменной. Практически не изменяется и активность ферментативного звена АОС за исключением каталазы, активность которой понижается. При этом состояние ферментативного звена АОС через сутки после отравления возвращается к уровню интактных животных. Через 3 сут, т.е. в стадию "выздоровления", интенсивность процессов ПОЛ в мозге также не отличается от "интактного" уровня. При этом изменения возникают как в ферментативном, так и в неферментативном звеньях АОС, причем в последнем наиболее ярко. В данный период наблюдения происходит "традиционное" снижение тиоловых и увеличение дисульфидных групп, а также повышение содержания аскорбиновой кислоты. Ферментативная активность по-прежнему стабильна за исключением глутатионредуктазы. Обращает на себя внимание последовательность изменения ферментативной активности. Если через 3 ч после инициации токсического ОЛ "выключается" только Г-6-ФДГ мозга, то через 24 ч это происходит с Кат, и лишь через 3 сут наблюдается повышение активности ГР.

Оценка полученных результатов вызывает определенные трудности. При этом приходится учитывать, что исследуемые биохимические процессы протекают в относительно интактном органе в стороне от фокуса патологического процесса. Интерпретируя полученные результаты, мы учитывали не только достоверные изменения изучаемых показателей, но и тенденции их изменений относительно контроля, то есть пытались оценить всю "картину" изменений в целом. Помимо уже описанного выше снижения активности Кат и повышения коэффициента СОД/Кат в первые сутки эксперимента в это же время имеет место тенденция к снижению активности СОД, а через 72 ч после инициации ОЛ тенденция к снижению активности Кат. Данные изменения и тенденции свидетельствуют о разбалансировке системы ферментативного звена АОС. С одной стороны, снижение функции СОД приводит к снижению скорости превращения супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) в перекись водорода, а снижение активности Кат - к накоплению  $H_2O_2$ . Накопление  $H_2O_2$  в присутствии  $O_2^{\cdot-}$  обеспечивает условия для протекания реакции Габера-Вейса и, как следствие, появление наиболее реакционноспособного гидроксильного радикала. В этой ситуации недостаточность функции Кат может компенсировать глутатионовая система, состояние которой отражает небелковая тиолдисульфидная система. С другой стороны, в результате снижения активности СОД уменьшается образование перекиси водорода, который является субстратом для каталазы. Но уменьшение активности СОД менее выражено, чем снижение активности каталазы. Преимущественное ингибирование каталазы в мозге может быть обусловлено гиперпродукцией NO в ткань мозга, который способен взаимодействовать с гемсодержащими белками, однако это требует доказательства.

Активность ГР претерпевает изменения от тенденции к снижению на 3 ч эксперимента к достоверному повышению на 72 ч эксперимента. Наблюдается корреляция изменений активности ГР и Г-6-ФДГ на 3 ч эксперимента. Этому явлению можно дать следующее объяснение. Г-6-ФДГ является ключевым в мультиферментном комплексе пентозофосфатного цикла, обеспечивающего потребности клетки в восстановленном NADPH, который требуется для работы ГР и восстановления, в частности, глутатиона. Снижение белковых SH-групп и коэффициента SH/SS является следствием окисления белковых тиоловых групп и ведет, как правило, к конформационным изменениям в белках. Возможно, именно с этим и связано снижение активности ферментов. Небелковые SH- и SS-группы в основном представлены глутатионом, поэтому динамика их изменений отражает динамику восстановленного (G-SH) и окисленного (G-S-S-G) глутатиона и их соотношение. Система глутатиона участвует как в инактивации радикалов и активных форм кислорода (в частности, перекиси водорода и органических гидроперекисей) в качестве восстановительного эквивалента, так и в системе

детоксикации в качестве участника процессов конъюгации [13-16]. Судя по динамике небелковых SH- и SS-групп, расход глутатиона в реакциях конъюгации не превышает обычных величин. В противном случае количество небелковых SH-групп уменьшалось, а небелковых SS- групп не изменялось бы. Возможно, в нашем случае имеет место окисление G-SH с образованием G-S-S-G. Кроме того, известно, что в окислительно-восстановительной системе клетки G-SH восстанавливает дегидроаскорбиновую кислоту (ДАК) в АК. Возможно, в неповрежденном органе (т.е. в мозге) идет активация восстановления ДАК в АК и при этом расходуется повышенное количество G-SH, который превращается в G-S-S-G. Такое предположение помогает объяснить снижение ОФ аскорбиновой кислоты в первые сутки и повышение АК к третьим суткам эксперимента. Следует отметить, что значение АК для мозга велико. Известно, что уровень антиоксидантной защиты мозга достаточно низок и обеспечивается в основном аскорбатом [12]. Антиоксидантное действие системы аскорбиновой кислоты лежит в основе таких ее биологических эффектов, как повышение устойчивости к горной гипоксии, гипотермии и т.д. Достоверное повышение уровня АК к третьим суткам эксперимента является, по-видимому, результатом адаптации мозга к гипоксии.

В целом же мы полагаем, что обнаруженные изменения в АОС мозга могут быть вызваны как гипоксией, так и поступлением в мозг продуктов деградации белков из поврежденных легких. Первый период (3 ч) характеризуется начинающимся повреждением тканей легких. АОС мозга при этом испытывает нагрузку (снижение Г-6-ФДГ, белковых и небелковых SH-групп, увеличение концентрации белковых и небелковых SS-групп). Второй период (24 ч) характеризуется развернутым ОЛ с явлениями дыхательной недостаточности. При этом насыщенность гемоглобина кислородом и уровень аэробного окисления в организме (в том числе и в мозге) снижаются. Обменные процессы при этом заторможены. На таком фоне нагрузка на АОС мозга несколько снижается, и наблюдаются признаки ее компенсации и адаптации. В фазе разрешения ОЛ вновь увеличивается нагрузка на АОС мозга, о чем свидетельствует белковые и небелковые SH/SS коэффициенты. Отмечается активация адаптационных процессов: активность Г-6-ФДГ увеличивается, СОД и Кат нормализуется, уровень АК повышается, а ОФ снижаются, коэффициент АК/ОФ возрастает.

Следует отметить, что выполненное исследование состояния ПОЛ и АОС в мозге животных не позволяет получить исчерпывающего описания метаболического ответа мозга и его отдельных структур на развитие токсического отека легких. Дополнить полученные данные может изучение динамики изменений параметров ПОЛ и АОС в различных отделах головного мозга, начиная с самых ранних сроков отравления еще на доклинической стадии ОЛ (через 30 - 60 мин после воздействия).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Зверев М.И., Анестиади М.Я.*(1981) Токсический отек легких, Кишинев, с.107.
2. *Плужников Н.Н., Тяптин А.А., Лупачев Б.А., Земляной А.В., Варлашова М.Б., Торкунов П.А.* (2000) *Вопр. мед. химии*, № 6, 564-573.
3. *Галкин Б.Н., Баринов В.А., Тиунов Л.А., Головенко Н.Я., Олешко А.Я.* (1990) Актуальные проблемы лекарственной токсикологии.-Тез. докл. Всесоюзн. конф. Москва, с. 63-64.
4. *Соколовский В.В., Белозерова Л.А., Огурцова Р.А.* (1977) *Лаб. дело*, № 1, 26-27.
5. *Чумаков Н.В., Осинская Л.Ф.* (1977) *Вопр. мед. химии*, №5, 712-716.

6. *Beutler E.* (1975) Red cell metabolism: a manual of biochemical methods, N.Y., S-Francisco: Grune and Stratton, p.160.
7. *Путилина Ф.Е.* (1982) В кн. Методы биохимических исследований (ред. Прохорова М.И.), Ленинград, с.181-183.
8. *Путилина Ф.Е., Зоидзе С.Д.* (1982) там же, 168-172.
9. *Itzhaki R.F., Gill D.M.* (1964) *Analyt Biochem.* № 4, 401-410
10. *Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И.* (1983) *Лабораторное дело*, №3, 35-36.
11. *Орехович В.Н.* (ред) (1977) *Современные методы в биохимии*, Москва.
12. *Зозуля Ю.А., Барабай В.А., Сутковой Д.А.* (2000) Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга, Москва, с.344.
13. *Янковский О.Ю.* (2000) *Токсичность кислорода и биологические системы*, С-Петербург, с.295.
14. *Жданов Г.Г., Нодель М.Л.* (1994) *Анестезиол. и реаниматол.*, № 5, 53-61.
15. *Болдырев А.А.* (1995) *Биохимия*, № 9, 1536-1542.
16. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* (1993) *Усп. совр. биологии*, №1, 107-122.

Поступила 29.01.2001.

#### THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN BRAIN OF RATS IN THE TOXIC PULMONARY EDEMA.

*N. Pluzhnikov, A. Tyaptin, A. Zemlyanov, M. Varlashova, P. Torkounov, Yu. Lupachyov*

Research Center of Biological Defence, Institute of Military Medicine, Defence Ministry,  
St. Petersburg, 195043, Russia

The state of enzymatic and nonenzymatic components of antioxidant system and also lipid peroxidation processes were studied in brain of rats with toxic pulmonary edema induced by inhalation of nitric oxides. The changes in the state of antioxidant system components in brain accompanied the development of toxic pulmonary edema. The main changes were found in nonenzymatic components of the antioxidant system, particularly in thiol and disulfide groups. Lipid peroxidation processes were not activated during the toxic pulmonary edema.

**Key words:** toxic lung edema, nitric oxides, brain, antioxidant system, lipid peroxidation.