

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПРООКСИДАНТНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ И БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЛАВАЖНОЙ ЖИДКОСТЕЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ ГИПЕРТЕРМИИ

Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ, Андрей Викторович САМСОНОВ, Ольга Николаевна ЛОГАЧЕВА

ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Нами было проведено определение прооксидантной и антиоксидантной активности перитонеальной и бронхоальвеолярной лаважной жидкостей у 60 крыс-самцов линии Вистар, которые были однократно подвергнуты общей гипертермии. При определении соотношения про- и антиоксидантной активности было выявлено смещение равновесия в системе «прооксиданты — антиоксиданты» в сторону прооксидантов, что свидетельствует о развитии окислительного стресса в постгипертермическом периоде.

Ключевые слова: общая гипертермия, прооксидантная активность, антиоксидантная активность, бронхоальвеолярная лаважная жидкость, перитонеальная жидкость, окислительный стресс.

На современном этапе развития медицины активно разрабатываются новые диагностические и терапевтические технологии, приборы и другая медицинская техника, которые успешно внедряются в практическую деятельность клиник для лечения различных заболеваний [1]. В научной литературе идет активная дискуссия о механизмах действия локальной и общей гипертермии на организм человека и ее влияния на патогенез различных заболеваний [2]. Многие авторы отмечают, что общая гипертермия оказывает существенное воздействие на иммунную систему [3, 4]. Одни авторы считают, что разогревание стимулирует специфические и неспецифические механизмы защиты организма, а другие — что, напротив, угнетает. Имеются данные, свидетельствующие о снижении адгезивных свойств нейтрофилов и их поглотительной, миграционной и микробицидной функции с усилением секреторной функции. Однако можно предположить, что под действием общей гипертермии происходит динамическое изменение системы иммунитета, когда на определенных сроках после общей гипертермии и/или при ее длительном воздействии отмечается либо активация, либо угнетение функции иммунокомпетентных клеток [5].

В настоящее время участие активных метаболитов кислорода показано в патогенезе более чем 100 заболеваний и патологических состояний [6]. Сходство изменений внутренней среды организма позволяет утверждать, что в их основе лежит один

механизм — нарушение баланса наработки кислородных радикалов и антиоксидантов [7].

Однако на данный момент значительно большее распространение получил термин «окислительный стресс», которым обозначаются состояния напряжения антиоксидантных систем, возникающие в результате нарушения баланса «прооксиданты — антиоксиданты» в сторону преобладания первых. Считается, что окислительный стресс средней интенсивности, вызванный перекисью водорода и супероксидным анион-радикалом, стимулирует пролиферацию, в то время как высокие концентрации активных кислородных метаболитов вызывают гибель клеток посредством апоптоза или некробиоза [8–10].

В физиологических условиях в сыворотке крови, перитонеальной жидкости и бронхоальвеолярной (БАЛ) жидкостях содержится масса факторов, обладающих прооксидантными свойствами, которые при различных патологических состояниях способствуют росту деструктивного потенциала макрофагов через продукцию ими активных метаболитов кислорода. К таким факторам прежде всего относятся активные фракции комплемента C3a и C5a, эйкозаноиды (простагландины и лейкотриены), кинины, биогенные амины, фактор активации тромбоцитов, провоспалительные цитокины (в первую очередь интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли). Вместе с тем данные факторы встречают противодействие со стороны антиоксидантной системы, в

Ефремов А.В. — чл.-корр. РАМН, д.м.н., проф., зав. кафедрой патологической физиологии и клинической патофизиологии, e-mail: AVE_48@yandex.ru

Самсонов А.В. — аспирант кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии, e-mail: andrey-samsonov@mail.ru

Логачева О.Н. — аспирант кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии, e-mail: Lelik.nsk@list.ru

которую входят ферментативные и неферментативные антиоксиданты, такие как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, α -токоферол, ретинол, церулоплазмин и т. д.

Конечный флогогенный эффект будет зависеть от баланса про- и антиоксидантного потенциала.

Совершенно очевидно, что определять отдельные компоненты, детерминирующие этот баланс, очень трудоемко. К тому же исследование отдельных факторов еще не позволяет судить об общей флогогенности биологических жидкостей, т. е. о ее способности вовлекать в процесс фагоцитирующие крови. В связи с этим в настоящем исследовании определяли общую прооксидантную активность с помощью метода оценки лейкоцит-модулирующей активности биологических жидкостей, предложенного Д.Н. Маянским с соавт. [11], и общую антиоксидантную активность [12]. По соотношению этих показателей можно судить о наличии дисбаланса между про- и антиоксидантами в перитонеальной и БАЛ жидкости.

Цель исследования — изучить динамику изменения прооксидантной (ПОА) и антиоксидантной (АОА) активности перитонеальной и бронхоальвеолярной лаважной жидкости в различные сроки после проведения общей гипертермии.

Материал и методы

Эксперименты проводились на 60 крысах-самцах линии Вистар массой 220–230 г. Для опыта использовались животные, содержащиеся в условиях вивария. Уход за экспериментальными животными и их содержание в условиях вивария были стандартными и соответствовали требованиям приказов «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» № 1045-73 от 06.04.1973, а также № 1179 от 10.10.1983 МЗ СССР, № 267 от 19.06.2003 МЗ РФ, «Правил по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденным МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Кормление животных осуществлялось согласно установленному рациону с применением комбикорма для лабораторных крыс и мышей «ПроКорм» производства акционерного общества «БиоПро» (заводской артикул Р-22, ГОСТ Р 50258-92, Россия). Разогревание животных проводилось в соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» [13]. Животных забивали методом декапитации под эфирным наркозом на 1-е, 3-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки после общей гипертермии. В группу контроля вошли 7 интактных крыс этой же породы. Бронхоальвеолярный лаваж получали по методу Q.N. Myrvik [14]. Для получения перитонеальной жидкости в брюшную полость жи-

вотных вводили по 10 мл питательной среды 199, содержащей гепарин в концентрации 5 ЕД/мл, массировали брюшную полость и шприцем с помощью специальной канюли отсасывали лаважную жидкость в отдельные пробирки. Данную процедуру повторяли трижды. Затем пробирки с перитонеальной жидкостью центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость осторожно удаляли, осадок ресуспендировали в 2 мл раствора Хэнкса, еще раз осаждали и ресуспендировали в 1 мл раствора Хэнкса.

Прооксидантную и антиоксидантную активность перитонеальной и бронхоальвеолярной лаважной жидкостей определяли хемилюминесцентными методами [11, 12] на биохемилюминометре «Скиф-0306» (СКТБ «Наука», Красноярск) в термостатированных при 37 °С пробирках, адаптированных с реагентами к темноте. Все измерения интенсивности биохемилюминесценции выполнены в триплетах с числом образцов не менее 7.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С 1-х по 14-е сутки после гипертермии прооксидантная активность БАЛ жидкости была достоверно выше контрольных значений (табл.). Максимальная величина показателя была зафиксирована на 1-е сутки наблюдения. Начиная с 3-х суток после воздействия гипертермии она постепенно снижалась и на 21-е сутки наблюдения достоверно не отличалась от контрольных значений. Изменения антиоксидантной активности БАЛ жидкости имели обратную динамику. В ранний постгипертермический период (на 1-е и 3-и сутки наблюдения) отмечалось снижение данного показателя. С 7-х по 14-е сутки эксперимента величины исследуемого параметра не отличались от контрольных значений. Основными антиоксидантами БАЛ жидкости являются аскорбиновая кислота и глутатион. Источником глутатиона служат мигрирующие в альвеолы и бронхи лейкоциты. Важную роль в защите легких от активных метаболитов кислорода играют и ферментативные антиоксиданты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), SH-содержащие и жирорастворимые фенольные антиоксиданты, но их активность в БАЛ жидкости по сравнению с сывороткой крови незначительна. Вероятно, этим объясняется низкая антиоксидантная активность БАЛ жидкости на протяжении практически всего периода наблюдения (до 14-х суток включительно). На 21-е сутки антиоксидантная активность превысила контрольные значения в 2 раза и составила $2,60 \pm 0,25$ усл. ед.

Таблица

Динамика изменения прооксидантной и антиоксидантной активностей бронхоальвеолярной лаважной и перитонеальной жидкостей и их соотношений после применения общей гипертермии у экспериментальных животных, $M \pm m$ (усл. ед.)

Срок исследования	БАЛ жидкость			Перитонеальная жидкость		
	ПОА	АОА	ПОА/АОА	ПОА	АОА	ПОА/АОА
Контроль	2,61 ± 0,00	1,22 ± 0,09	2,14 ± 0,19	0,72 ± 0,00	0,38 ± 0,02	1,89 ± 0,14
1-е сутки	5,84 ± 0,23*	0,88 ± 0,00*	6,63 ± 0,71*	5,26 ± 0,25*	0,52 ± 0,00*	10,10 ± 1,01*
3-е сутки	5,41 ± 0,41*	0,79 ± 0,00*	6,85 ± 0,93*	1,71 ± 0,13*	0,17 ± 0,00*	10,05 ± 0,98*
7-е сутки	4,07 ± 0,19*	1,47 ± 0,11	2,77 ± 0,22*	2,62 ± 0,13*	0,46 ± 0,00	5,69 ± 0,32*
14-е сутки	3,78 ± 0,13*	1,21 ± 0,00	3,12 ± 0,29*	3,27 ± 0,17*	0,14 ± 0,00*	23,35 ± 1,78*
21-е сутки	2,38 ± 0,01	2,60 ± 0,25*	0,91 ± 0,01*	3,82 ± 0,18*	0,15 ± 0,00*	25,41 ± 1,94*

Примечание: звездочкой (*) обозначены значения, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от величин соответствующих показателей контрольной группы.

На протяжении всего периода наблюдения после гипертермии прооксидантная активность перитонеальной жидкости была достоверно выше контрольных значений (см. табл.). Максимальная величина ПОА была зафиксирована на 1-е сутки проведения общей гипертермии, когда она на 730 % превышало аналогичный показатель в контрольной группе животных. На 3-и сутки наблюдения величина данного показателя снизилась относительно первых суток, но все еще превышала контрольные значения на 237 %. С 7-х по 21-е сутки после применения общей гипертермии ПОА перитонеальной жидкости постепенно нарастала. При этом изменения антиоксидантной активности перитонеальной жидкости носили волнообразный характер. На 1-е сутки после воздействия она повысилась относительно контрольных значений, на 3-и сутки снизилась, на 7-е сутки наблюдения достоверно не отличалась от контрольных значений. В позднем постгипертермическом периоде АОА перитонеальной жидкости имела минимальные значения. Таким образом, антиоксидантный потенциал перитонеальной жидкости оказался еще ниже, чем БАЛ жидкости.

Соотношение ПОА/АОА БАЛ жидкости превышало контрольные значения с 1-х по 14-е сутки наблюдения (см. табл.). Его максимальные значения были зафиксированы в ранний постгипертермический период (1-е и 3-и сутки), к 21-м суткам наблюдения баланс в системе «прооксиданты – антиоксиданты» восстановился. В перитонеальной жидкости отмечался более выраженный дисбаланс между прооксидантной и антиоксидантной активностью со смещением равновесия в сторону прооксидантов.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о развитии окислительного стресса в бронхоальвеолярной лаважной и перитонеальной жидкостях после проведения общей гипертермии

у экспериментальных животных. Большим антиоксидантным потенциалом обладает бронхоальвеолярная лаважная жидкость.

Список литературы

1. Исмаил-заде Р.С. Использование общей управляемой гипертермии в лечении генерализованных опухолей у детей // Рос. онкол. журн. 2004. 6. 23–26.

Ismail-zade R.S. Using of common hyperthermia in treatment of generalized tumors in children // Ros. onkol. zhurn. 2004. 6. 23–26.

2. Мелихов О.Г. Состояние перекисного окисления липидов и антиокислительной системы эритроцитов при различных режимах хронического перегревания // Медико-биологические аспекты действия на организм высокой внешней температуры: сб. науч. тр. Смоленск, 1989. 19–22.

Melikhov O.G. Status of lipid peroxidation and antioxidant system of erythrocytes at different modes of chronic overheating // Medical and biological aspects of influence of high ambient temperature on organism: collection of scientific papers. Smolensk, 1989. 19–22.

3. Пат. 2142762 РФ. Способ купирования абстинентного синдрома у наркоманов / Сувернев А.В., Писарев А.А., Пенягин А.Н. и др.; опубл. 20.12.1999.

Patent 2142762 RF. Method of cupping abstinence syndrome in drug addicts / Suvernev A.V., Pisarev A.A., Penyagin A.N. et al.; published 20.12.1999.

4. Пат. 2173971 РФ. Способ лечения бронхиальной астмы / Сувернев А.В., Писарев А.А., Пенягин А.Н. и др.; опубл. 27.09.2001.

Patent 2173971 RF. The method of treatment of bronchial asthma / Suvernev A.V., Pisarev A.A., Penyagin A.N. et al.; published 27.09.2001.

5. Vereschagin E.I., Souvernev A.V. Whole body hyperthermia (43,5–44,0 °C) as method of intensive care of infectious diseases // Abstracts of XXIV Int.

Congress on Clinical Hyperthermia. Rome, 2001. 134–135.

6. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. 90. 7915–7922.

7. Halliwell B., Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 1998. 980 p.

8. Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification // *Toxicol. Pathol.* 2002. 30 (6). 620–650.

9. Berry M.N., Gregory R.B., Grivell A.R. et al. Thermogenesis and the thermodynamic regulations of metabolism // *Horm. Thermogenesis and Obesity*. N. Y., 1989. 33–45.

10. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 343 с.

Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshchikova E.B. Oxidative stress. Biochemical and pathophysiological aspects. M.: MAIK Nauka/Interperiodika, 2001. 343 p.

11. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Макарова О.П. и др. Диагностическая ценность лейко-

цитарных тестов. Ч. 2. Определение биоксидности лейкоцитов. Новосибирск, 1996. 47 с.

Mayanskii D.N., Tsyrendorzhiev D.D., Makarova O.P. et al. Diagnostic value of leukocyte tests. P. 2. Determination of leukocyte biocidity. Novosibirsk, 1996. 47 p.

12. Журавлев А.И. Развитие идей Б.Н. Тарусова о роли цепных процессов в биологии // *Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии*. М.: Наука, 1982. 3–36.

Zhuravlev A.I. Development of B.N. Tarusov ideas on the role of chain processes in biology // *Bioantioxidants in regulation of metabolism in norm and pathology*. M.: Nauka, 1982. 3–36.

13. Пат. 2165105 РФ. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / Ефремов А.В., Пахомова Ю.В., Пахомов Е.А. и др.; опубл. 12.10.2001.

Patent 2165105 RF. Method of experimental design of general hyperthermia of small laboratory animals / Efremov A.V., Pakhomova Yu.V., Pakhomov E.A. et al.; published 12.10.2001.

14. Myrvik Q.N., Leake E.S., Farris B. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbits, a technique to procedure them in high state of purity // *J. Immunol.* 1961. 86. 128–132.

DYNAMICS OF CHANGE OF PERITONEAL AND BRONCHO-ALVEOLAR LAVAGE FLUID PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN EXPERIMENTAL ANIMALS AFTER THE USE OF A COMMON HYPERTHERMIA

Anatoly Vasilievich EFREMOV, Andrey Viktorovich SAMSONOV, Olga Nikolaevna LOGACHEVA

*Novosibirsk State Medical University of Roszdrav
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

We carried out the determination of prooxidant and antioxidant activity of peritoneal and broncho-alveolar lavage fluid in 60 male rats Wistar, which had been previously subjected to general hyperthermia once. The shift of equilibrium in the system «prooxidants – antioxidants» in the direction of prooxidant has been revealed at determining of pro- and antioxidant activity ratio. It testifies to the development of oxidative stress in posthyperthermic period.

Keywords: common hyperthermia, prooxidant activity, antioxidant activity, broncho-alveolar lavage fluid, peritoneal fluid, oxidative stress.

Efremov A.V. — corresponding member of RAMS, doctor of medical sciences, professor, head of the chair of physiopathology and clinical physiopathology, e-mail: AVE 48@yandex.ru

Samsonov A.V. — postgraduate student of the chair of physiopathology and clinical physiopathology, e-mail: andrey-samsonov@mail.ru

Logacheva O.N. — postgraduate student of the chair of physiopathology and clinical physiopathology, e-mail: Lelik.nsk@list.ru