

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИИ НА СОСТОЯНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ МОРСКИХ СВИНОК.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра биологической химии*

Ключевые слова: новорожденные морские свинки, гипероксия, антиоксиданты.

Резюме: в условиях длительной гипероксии происходит постепенное истощение возможностей антиоксидантных систем в легких новорожденных морских свинок и увеличение количества продуктов липопероксидации и окислительной модификации белков.

Resume: in conditions of prolonged hyperoxia gradual depletion of antioxidant capacity in systems neonatal lung of guinea pigs and increasing the amount of lipid peroxidation and oxidative modification of protein products.

Актуальность. В последние десятилетия в развитых странах частота преждевременных родов достаточно стабильна и составляет 5-10% от числа всех родившихся детей. Спектр причин появления ребёнка на свет раньше срока весьма широк, однако способность ребёнка выжить напрямую зависит от степени развития его органов и возможности существования вне организма матери. Достижения современных учёных позволяют выхаживать недоношенных детей с низкой массой тела и незрелостью легочных структур путём проведения искусственной вентиляции легких с использованием высоких концентраций кислорода для улучшения оксигенации органов и тканей. Однако окислительное повреждение легочных структур в сочетании с низким уровнем антиоксидантов способствует развитию бронхолегочной дисплазии (БЛД). в связи с этим появился новый спектр неонатальной патологии, развивающейся вследствие интенсивной длительной терапии с применением искусственной вентиляции легких (ИВЛ) и высокой концентрации кислорода во вдыхаемой смеси. Бронхолегочная дисплазия (БЛД), наряду с ретинопатией и мозговыми кровоизлияниями, является одной из наиболее часто развивающихся патологий у таких детей.

Среди вероятных причин развития БЛД называют механическое повреждение легких при ИВЛ (баротравма, волюмотравма), токсическое действие кислорода, незрелость легочной ткани и недостаточность антиоксидантных систем у недоношенных новорожденных [3], однако степень вклада указанных факторов в патогенез заболевания не установлена. Отсутствует единое мнение о повреждающем действии высоких доз кислорода на легочную ткань у новорожденных. В проводимых экспериментальных исследованиях установлено, что гипероксия вызывает расширение капилляров в легких, экстравазацию эритроцитов, лейкоцитарную интерстициальную инфильтрацию легочной ткани [5], изменение клеточного состава в альвеолярном пространстве, снижение пролиферативной активности клеток и подавление образования альвеол [7], изменение дифференцировки легочных фибробластов [4]. Предполагается, что

высокие концентрации кислорода провоцируют развитие оксидантного стресса в легких, однако в сурфактанте легких крыс не было выявлено увеличения образования продуктов перекисного окисления липидов [6]. Несмотря на наличие физиологических и морфологических данных, свидетельствующих о токсическом действии высоких доз кислорода на легкие, до настоящего времени биохимические механизмы, лежащие в основе этого явления, не установлены, что не позволяет предложить эффективные методы защиты от развития необратимых структурно-функциональных изменений в легочной ткани.

Цель: изучить влияние длительной гипероксии состояние основных ферментных и неферментных антиоксидантных систем в легких новорожденных морских свинок.

Задачи: 1. Определить изменения активности глутатионпероксидазы в бронхоальвеолярной жидкости новорожденных животных в условиях длительной гипероксии. 2. Оценить содержание основных неферментативных антиоксидантов (альфа-токоферол, SH-содержащие соединения) в в легких новорожденных животных в условиях гипероксии. 3. Установить влияние гипероксии на окислительную модификацию липидов и белков в бронхоальвеолярной жидкости новорожденных морских свинок.

Материал и методы. Эксперименты проводили с использованием новорожденных морских свинок, находившихся на стандартном рационе вивария БГМУ. Исследование проводилось с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. В течение суток после рождения животных опытной группы помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% (температура 20-25°C, относительная влажность 50-80%). Длительность воздействия гипероксии составляла 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и получали материал для исследования.

Получали бронхоальвеолярную лаважную жидкость путем промывания легких через эндотрахеальный зонд раствором 0,9% NaCl (3×8 мл). Затем жидкость центрифугировали (900 об/мин, 40С) для осаждения клеток. Бесклеточный супернатант БАЛЖ использовали для определения активности глутатионпероксидазы (ГП), содержания восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений, карбонильных производных аминокислотных остатков в белках, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ). Общий белок определяли по методу Lowry.

В гомогенатах тканей легкого определяли содержание токоферола.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический тест Манна-Уитни для независимых выборок (U-тест). Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У животных, дышавших смесью с высоким содержанием кислорода, было выявлено достоверное снижение уровня восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЖ на 33% по сравнению с контролем ($p < 0,05$, таблица 1). Как следует из данных, приведенных в таблице, активность ГП в БАДЖ опытных животных также снизилась в 3,2 раза ($p < 0,05$). Выраженное снижение активности ГП является крайне неблагоприятным, поскольку данный фермент способен обезвреживать не только активные формы кислорода, но и органические гидроперекиси, включая перекиси ненасыщенных жирных кислот [1].

Таблица 1. Содержание неферментативных антиоксидантов и активность глутатианпероксидазы в БАЛЖ и в легких новорожденных морских свинок, подвергшихся воздействию гипероксии

Показатель	Контроль	Гипероксия
Небелковые SH-соединения, нмоль/мг белка	111,7 (60,2 – 178,6)	75,8 (36,7 – 121,3)*
ГП, нмоль/мин/ мг белка	49,5 (29,5 – 62,1)	15,2 (0 – 20,2)*
Токоферол, нмоль/мг белка/г ткани	305,4 (218,2 – 367,2)	188,3 (133,4 – 314,4) *

*Примечание:** – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»

Вдыхание смеси с высоким содержанием кислорода в течение 14 суток приводило к достоверному уменьшению содержания токоферола в легких на 39% ($p < 0,05$, таблица 1).

Снижение уровня глутатиона и токоферола привело к стимуляции процессов окислительного повреждения белков и липидов. Нами выявлено, что уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) - (диеновых конъюгатов) в БАЛЖ опытных животных достоверно увеличился и составил 168% от контроля ($p < 0,05$, таблица 2). Содержание вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК, в БАЛЖ в условиях гипероксии превышало контрольные значения в 1,9 раза и было статистически достоверным ($p < 0,05$). В опытной группе животных выявлено также увеличение относительного содержания оснований Шиффа, которые являются конечными продуктами перекисного окисления липидов (таблица 2).

Таблица 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергшихся воздействию гипероксии

Показатель	Контроль	Гипероксия
Карбонильные производные, нмоль/мг белка	24,23 (20,58 – 25,95)	33,9 (14,39 – 46,25)
ТБК-РП, отн.ед.	4,52 (3,75 – 7,39)	8,67 (5,25 – 18,45)*
ДК, отн.ед.	2,18 (1,45 – 2,42)	3,66 (2,06 – 4,3)*

ОШ, отн.ед.	0	0,75 (0,63 – 0,9) *
-------------	---	------------------------

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»

Содержание карбонильных производных аминокислот в белках достоверно не изменялось, но имело тенденцию к увеличению (таблица 2). По нашему мнению, данный факт может быть результатом протеолиза, которому подвергаются окислительно модифицированные белки [2]. Это может быть причиной уменьшения уровня карбонильных производных в БАЛЖ при длительной гипероксии.

Выводы: 1. В условиях длительной гипероксии в БАЛЖ новорожденных животных выявлено значительное уменьшение уровня неферментативных антиоксидантов (глутатиона и токоферола) и снижение активности глутатионпероксидазы. 2. Недостаток антиоксидантов привел к накоплению продуктов перекисного окисления липидов и белков, что может свидетельствовать о развитии оксидативного стресса у новорожденных морских свинок, длительно находившихся в условиях гипероксии.

Литература

- 1 Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение / Е.Е. Дубинина // С-Пб, «Медицинская пресса». – 2006. – 400 с.
- 2 Муравлева, Л.В. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравьева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клюев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. - №1. – С. 74-78.
- 3 Шишко, Г.А. Современные подходы к ранней диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии: учебно-методическое пособие для врачей / Г.А. Шишко, Ю.А. Устинович // Минск, БелМАПО. – 2006. – 25 с.
- 4 Rehan, V. Hyperoxia augments pulmonary lipofibfoblast-to myofibroblast transdifferentiation / V. Rehan, J. Torday // Cell. Biochem. Biophys. – 2003. – Vol.38. - № 3. – 239-250.
- 5 Tang, F.G. Role of N-methyl-D-aspartate receptor in hyperoxia-induced lung injury / F.G. Tang [et al] // Pediatric Pulmonol. – 2005. – Vol.40. – P.437-444.
- 6 Tölle, A. Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E / A. Tölle [et al] // Biochim. Biophys. Acta Lipids and Lipid Metab. – 1997. – Vol. 1346, №2. – P. 198-204.
- 7 Warner, B.B. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice / B.B. Warner [et al] // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 1998. – Vol.275. – P. L110-L117.