

Погляди, концепції та дискусії

УДК: 616.24-002-056.3 - 092:[616.36:612.015.11]

ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ПЕЧІНЦІ ПРИ ЕКЗОГЕННОМУ АЛЕРГІЧНОМУ АЛЬВЕОЛІТІ В УМОВАХ СТРЕСУ

Р.Т. Градик, Т.І. Ширій, Г.П. Никитюк

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Кафедра патологічної фізіології (зав - проф. М.С. Рєгєда)

Реферат

Мета. Вивчити зміни показників про- та антиоксидантної систем у печінці у морських свинок із експериментальним алергічним альвеолітом в умовах стресу.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на морських свинках, статевозрілих самцях масою 0,380-0,400 кг. Модель екзогенного алергічного альвеоліту відтворювали за методом О.О. Орехова, Ю.А. Кирилова. Експериментальну модель гострого "імобілізаційного стресу" викликали імобілізацією тварин на операційному столу на спині, фіксуючи атравматично за кінцівки. Тривалість імобілізації становила 2 години. Забір матеріалу (печінку) проводили на 24-й день захворювання (ранній період). Активність процесів пероксидного окиснення ліпідів оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів і малонного діальдегіду. Функціонування антиоксидантної системи оцінювали за вмістом ферментів супероксиддисмутази та каталази.

Результати й обговорення. У дослідній групі ми спостерігали вірогідне збільшення показників малонного діальдегіду, дієнових кон'югатів, та супероксиддисмутази та каталази у порівнянні із контрольною групою тварин. У тварин із екзогенним алергічним альвеолітом в умовах стресу відбуваються наступні зміни: збільшення показників малонного діальдегіду, дієнових кон'югатів ($p < 0,05$) та вірогідне збільшення активності каталази та супероксиддисмутази ($p < 0,05$). Порівнюючи групи тварин із екзогенним алергічним альвеолітом та групи тварин із екзогенним алергічним альвеолітом в умовах стресу, спостерігали зменшення показників: дієнових кон'югатів, активності каталази ($p < 0,05$).

Висновки. 1. Результати біохімічних досліджень свідчать, що у тварин за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту наявні характерні ознаки розвитку оксидантного стресу. Це виражається у значній інтенсивності окисних реакцій із надмірним накопиченням у печінці продуктів вільнорадикального окиснення.

2. При дії на організм тварин із експериментальним алергічним альвеолітом стресу спостерігається зменшення активації процесів ПОЛ та пригнічення антиоксидантного захисту.

Ключові слова: екзогенний алергічний альвеоліт, стрес, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист

Abstract

THE INFLUENCE OF STRESS FACTORS ON THE ACTIVITY OF ENZYMES OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF GUINEA PIGS

LIVER WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC ALVEOLITIS

R. HRADYK, T. SHYRIY, H.P. NYKYTIUK

The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

Aim. Life in a modern metropolis has a negative effect on the human body. The causes of hepatic pathology are so numerous: bad ecology, fast food, chronic stress, that there is a tendency to exaggerate them. And it happens because the liver provides neutralization of toxins, the effects of stress and unhealthy lifestyle, so widespread among residents of large cities. The goal of the research work was to study the level of prooxidant and antioxidant systems in the liver development during the experimental allergic alveolitis development.

Material and Methods. Guinea pigs, males, weight 0,380-0,400 kg were employed in this experiment. The model of experimental allergic alveolitis was reproduced due to O.O. Orechova, Y.A. Kyryllov method (1985): sensitization of animals by an injection of 0.2 ml of complete Freund's adjuvant into the hind leg. In two weeks after immunization the intravenously injection of 0.2 ml of a suspension of dead Bacillum Calmette Guerin was performed. On the 24th day of illness (early period) acute "immobilization stress" had been stimulated, after which the specimen (liver) was taken. Animals were immobilized on their backs with atraumatic fixation of the limbs on the operating table. The time of immobilization was 2 hours. The activity of lipid peroxidation was evaluated by the content of diene conjugates and malonic dialdehydi in the liver. The function of the antioxidant system was evaluated by the content of enzymes superoxide dismutase and catalase in the liver.

Results and Discussion. In the experimental group we observed a significant increase in content of malonic dialdehydi, diene conjugates, and superoxide dismutase and catalase in comparison with the control group. In the experimental group of animals exposed to stress under experimental allergic alveolitis conditions we observed the following changes: a significant decrease in the content of diene conjugates and a significant increase in catalase activity. Comparing the group of animals with experimental allergic alveolitis and the experimental group of animals exposed to stress under experimental allergic alveolitis conditions, we observed a significant decrease in the content of malondialdehyde and diene conjugates, and the activity of superoxide dismutase and catalase.

Conclusions. 1. Results of biochemical studies indicate that experimental group of animals exposed to stress under experimental allergic alveolitis conditions present specific signs of oxidative stress. This is expressed in high intensity of oxidative reactions in the liver by excessive accumulation of

free radical oxidation products. 2. Under the stress conditions, the activity of lipid peroxidation and antioxidant protection decreases.

Key words: *experimental allergic alveolitis, stress, lipid peroxidation, antioxidant protection*

Вступ

На сьогодні в медичному світі досить гостро стоїть проблема поєднаної патології. Труднощі діагностики, особливо на початковому етапі захворювання, взаємообтяжливий клінічний перебіг і, як наслідок, складнощі лікування - головні риси, притаманні поєднаній патології. Особливо часто трапляється поєднання стресу з іншими захворюваннями [1]. Окрім того у наш час важко знайти людину, яка ніколи не стикалася з виявами алергічних захворювань особливо в екологічно несприятливих промислових регіонах України. В останні десятиліття багато досліджень показали взаємозв'язок між нервовою та імунною системами [1]. Механізми функціонування обох систем у різних процесах мають загальні закономірності та компоненти, які не дозволяють їм діяти незалежно один від одного, а, навпаки, дозволяють їм один одного регулювати.

Печінка відіграє основну роль в адаптаційних реакціях організму до стресових впливів різного роду обумовлена тим, що вона є органом - мішенню для "адаптаційних" гормонів. На цей орган припадає велика частина клірингових процесів, отже печінка також впливає на імунну систему [2]. Тому печінка є оптимальним органом для вивчення різних ефектів, що реалізуються в зв'язку зі станом стресу і запальними процесами за типом гіперчутливості.

Матеріал і методи

Під час проведення експерименту були дотримані основні положення Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986р., наказу МОЗ України "Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і Типового положення про комісію питань з етики" №66 від 13.02.2006р., Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" 2006 р.

Дослідження проводили на 30 морських

свинках - самцях масою тіла 0,380-0,400 кг.

Тварин поділяли на три групи:

I - інтактні морські свинки (n=10)

II - морські свинки (n=10) з ЕАА (24-а доба від початку введення антигену);

III - морські свинки (n=10) з ЕАА (24-а доба від початку введення антигену) та іммобілізаційним стресом.

Експериментальний алергічний альвеоліт (ЕАА) відтворювали за методикою О.О. Орехова, Ю.А. Кирилова [3]. Попередньо тварин імунізували повним ад'ювантом Фрейнда (0,2 мл у задню лапку внутрішньом'язево). Після двох тижнів через кожні 10 днів вводили внутрішньовенно по 0,2 мл 1%-го розчину БЦЖ. Потім тварин декапітували та визначали у печінці вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і активність ферментів антиоксидантної системи (АОС) на 24-у добу до та після дії стресу. Експериментальну модель гострого "іммобілізаційного стресу" викликали іммобілізацією тварин на операційному столику на спині, фіксуючи атравматично за кінцівки. Тривалість іммобілізації становила 2 години. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) визначали за методом В.Б.Гаврилова, М.І. Мишкорудної [4], малонового діальдегіду (МДА) - за методом Е.М. Коробейникова [5], супероксиддисмутази (СОД) - за методом R. Fried [6], а показники каталази (КТ) - за R. Holmes [7]. Статистичні дослідження проводили з допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи персональний комп'ютер (Лапич С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н., 2000). Отримані результати експериментальних даних оброблені методом варіаційної статистики відповідно до сучасних вимог.

Для обчислення абсолютних величин використано критерій (t) Стьюдента. За таблицею на підставі величини t визначали ймовірність відмінностей. Для оцінки відмінностей величин, що визначали у відсотках, застосовано непараметричний критерій кутового перетворення (p) Фішера. Вірогідними вважали відмінності, у яких ймовірність статистичної похибки становила $P < 0,05$.

Результати й обговорення

Результати досліджень висвітлено у табл. 1. У дослідній групі з ЕАА ми спостерігали вірогідне збільшення показників МДА на 138%, ДК на

Результати біохімічних досліджень

Біохімічні показники	Інтактні тварини	ЕАА, 24доба	ЕАА+стрес, 24доба	К/ЕАА	ЕАА/ЕАА+стрес	К/ЕАА+стрес
Дієнові кон'югати (Нмоль/мг ліпідів)	1,637±0,236	3,295±0,124	0,262±0,016	p <0,01	p <0,01	p <0,01
Малоновий диальдегід (Нмоль/мг ліпідів)	0,121±0,008	0,289±0,004	0,186±0,013	p <0,01	p <0,01	p <0,8
Супероксиддисмутаза (МО/мг білка)	0,718±0,024	1,033±0,032	0,772±0,032	p <0,01	p <0,01	p <0,2
Каталаза (МО/мг білка)	7,327±0,276	9,485±0,234	8,409±0,407	p <0,01	p <0,03	p <0,04

102%, що свідчить про активацію процесів ПОЛ, що підтверджує праці інших авторів [8, 9, 10]. Пероксидне окиснення ліпідів є первинною реакцією у ланцюзі фізично-хімічних перетворень, які призводять до деструкції ліпопротеїдного комплексу мембран і порушують їх транспортні функції, а також пригнічують процеси генерації енергії, що у результаті знижує життєдіяльність клітин [8, 9, 10].

Із боку антиоксидантного захисту виявлено, що активність СОД зросла на 44% та каталази на 29%. Як відомо, клітини мають свої механізми захисту проти молекул-агресорів. До них відносяться ферменти супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза - так звані молекули "прибиральники вільних радикалів" (глутатіон, убіхінон, вітаміни С і Е, та інші). Все це антиоксиданти, сама назва яких відображає їх здатність перешкоджати окислювальним реакціям. Але, очевидно, така активність ферментів антиоксидантного захисту є недостатньою [9, 10].

У тварин з ЕАА в умовах стресу відбуваються наступні зміни: вірогідне збільшення показників ДК у 6,2 рази, та МДА збільшення на 54%. Індукція ПОЛ відбувається під час найрізноманітніших порушень функцій організму за умов патології і стресу [10]. Дослідження антиоксидантного захисту показало вірогідне збільшення активності каталази на 15%.

Порівнюючи групи тварин з ЕАА та групи тварин з ЕАА в умовах стресу, ми спостерігали вірогідні зменшення показників: МДА на 36% та ДК у 12,6 разів. У дослідженнях Харченко В.В. виявлено, що катехоламіни - адреналін, норадреналін виявляють антиоксидантну та прооксидантну дію. За звичайних умов або короткотривалого стресу прооксидантна дія катехоламінів становить 10-12%, а у разі тривалого та важкого

оксидативного стресу прооксидантна дія посилюється і вони з антиоксидантів перетворюються на фактор активації ПОЛ та виснаження АО резервів [11]. У працях Перевозкіної М.Г. показано можливість адреналіну і метилдофа знижувати максимальну швидкість окислення у 4-6 разів у порівнянні з контролем [12]. Слід зазначити, що стрес не викликає алергію, проте, може істотно погіршити її симптоми, як припускають вчені.

При дослідженні антиоксидантного захисту у тварин з екзогенним алергічним альвеолітом в умовах стресу, активність СОД зменшилась на 25%, а каталаза на 11% у порівнянні з показниками тварин з ЕАА

Висновки

1. Результати біохімічних досліджень свідчать, що у тварин за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту наявні характерні ознаки розвитку оксидантного стресу. Це виражається в значній інтенсивності окисних реакцій з надмірним накопиченням у печінці продуктів вільнорадикального окиснення.
2. При дії на організм тварин з експериментальним алергічним альвеолітом стресу в умовах експерименту ми спостерігали зменшення активації процесів ПОЛ та пригнічення антиоксидантного захисту.

Література

1. Khasky A.D., Smith J.C. Stress, relaxation states, and creativity. *Percept. Mot. Skills.* 2000, 88 (22), 409-416.
2. Karanth J., Jeevaratnam K. Oxidative stress and antioxidant status in rat blood, liver and muscle: effect of dietary lipid, carnitine and exercise // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* - 2005. - V. 75, No5. - P. 333-339.
3. Orekhov A.A., Kirillov Y.A. Patomorfologiya light and microvasculature of lesser circulation in Chronic experimentally allerhycheskom alveoli *Archive pathologists*, 1985, 10, 54-61. Russian: (Орехов О.О., Ки-

- рилов Ю.А. Патоморфология легких и микроциркуляторного русла малого круга кровообращения при хроническом экспериментальном аллергическом альвеолите Архив патологии, 1985, 10, 54-61).
4. Gavrilov A., Myshkorudnaya M.I. Spectrophotometric determination of lipid hydroperoxides in plasma. Laboratory diagnosis of coronary heart disease . - K.: Health, 1989, 170-171. Russian: (Гаврилов А.Б., Мышкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме. Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца. - К.: Здоров'я, 1989, 170-171).
 5. Peddlers EN Modification of the definition of lipid peroxidation products in the reaction with thiobarbituric acid Lab. case in 1989, 7, 8-10. Russian: (Коробейников Э.Н. Модификация определения продуктов ПОЛ в реакции с тиобарбитуровой кислотой Лаб. дело 1989, 7, 8-10).
 6. Fried R. Enzymatic and nonenzymatic assay of super oxide dismutase Biochemie, 57 (5), 657-660.
 7. Holmes R. Masters C. Epigenetic interconversions of the multiple forms of mouselivercatalase FEBS Lett, 1970, 11 (1), 45-48.
 8. Nykytyuk H.P; Porohovska N.V. Correction antioxidant protection of cardiomyocytes under acute experimental imunokompleksemiі Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry 2012, 4, 35-39. Ukrainian: (Никитюк Г. П.; Пороховська Н. В. Корекція антиоксидантного захисту кардіоміоцитів за умов гострої експериментальної імунотоксичності Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія 2012, 4, 35-39).
 9. Wakako Maruyama, Masayo Shaomoto-Nagai, Yoji Kato, Shinsuke Hisaka, Toshihiko Osawa, Makoto Naoi. Role of Lipid Peroxide in the Neurodegenerative Disorders Subcellular Biochemistry. 2014, 77, 127-136.
 10. Carlyle Rogers, Barbara Davis, P. Darrell Neuffer, Michael P. Murphy, Ethan J. Anderson, Jacques Robidoux A transient increase in lipid peroxidation primes preadipocytes for delayed mitochondrial inner membrane permeabilization and ATP depletion. Free Radical Biology and Medicine 2014, 67, 330-341
 11. Kharchenko V.V. Natural biooxsydanty and liver. Current Gastroenterology 2007, 6 (38), 25-27. Ukrainian: (Харченко В.В. Природні біооксиданти та печінка. Сучасна гастроентерологія 2007, 6 (38), 25-27).
 12. Perevozkina M.G. Catalytic oxidation of micellar substrates in the presence of adrenaline and methyl dopa. Natural and mathematical sciences in the modern world: collection stattey Materials XII International scientific and practical conference. (November 11, 2013.) Russian: (Перевозкина М. Г. Каталитическое окисление мицеллярных субстратов в присутствии адреналина и метилдофа. Естественные и математические науки в современном мире": сборник статей по материалам XII международной научно-практической конференции. (11 ноября 2013г.)