

УДК 612.336.3:612.886.2+577.152.1/2

**Н.О. МАРТУСЕВИЧ, Е.А. КОНДРАТЕНКОВА,
Е.О. КОРИК**

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА И КИШЕЧНИКА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ЭНДОТОКСИНУ

Транслокация бактерий и эндотоксинов из кишки во внутреннюю среду организма инициирует развитие комплекса защитных реакций, одним из проявлений которого является снижение ответной реакции организма на повторное поступление эндотоксина в организм – толерантность. В экспериментальном исследовании обнаружено, что в условиях индукции толерантности к эндотоксину происходит повышение эффективности функционирования антиоксидантной системы клеток ствола головного мозга и кишечника крыс.

Укачивание является одной из причин перемещения микрофлоры и эндотоксинов из просвета кишки во внутреннюю среду организма [1]. Гипотетически считается, что транслокация эндотоксинов в результате укачивания может быть причиной развития толерантности к липополисахаридам (ЛПС). В пользу этого свидетельствуют данные об ослаблении системной воспалительной реакции при внутрибрюшинном введении крысам ЛПС кишечной палочки на седьмой день после вертикального укачивания [2].

Проникновение бактериальных клеток или эндотоксинов (чаще наблюдается последнее) из кишки во внутреннюю среду организма вызывает активацию иммунной системы, как на локальном, в пределах желудочно-кишечного тракта, так и на системном уровнях. Так, в брюшной полости, в крови, в ликворе возрастает количество цитокинов, увеличивается продукция интерлейкинов и других веществ, опосредующих иммунные реакции [3]. В свою очередь, активация иммунных процессов сопряжена с изменением работы ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем клетки. Как показали исследования, существующий в физиологических условиях баланс между образованием продуктов свободнорадикальных реакций и их последующим обезвреживанием нарушается при эндотоксемии любого происхождения, что в конечном счете приводит к интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Логично предположить, что в условиях развития устойчивости к эндотоксину кишечной палочки характер функционирования антиоксидантной системы организма будет изменяться. Не противоречат этому предположению и данные литературы. В частности, при развитии толерантности к липополисахариду *Escherichia coli* наблюдалось снижение интенсивности ПОЛ [4].

Для проверки выдвинутой выше гипотезы была предпринята попытка оценить состояние антиоксидантной системы клеток ствола головного мозга (нейронные структуры которого активируются при действии ускорений) и кишечника крыс после вертикального укачивания, а также в условиях внутрибрюшинного введения эндотоксина кишечной палочки на седьмой день после вертикального укачивания.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на 28 белых крысах самцах массой 230–270 г, которые содержались в стандартных усло-

виях вивария. Животные были разделены на четыре группы ($n=7$). Эксперименты начинались в $9^{00}-9^{30}$ утра с целью учета возможных влияний циркадных ритмов на регистрируемые показатели. Крыс помещали в боксы (после предварительной адаптации к аналогичным боксам на протяжении 6-7 тренировок по 2-4 часа), ограничивающие подвижность животных.

Крысы первой и второй групп подвергались укачиванию. Укачивание животных по гравитационной вертикали осуществляли на специально сконструированном стенде с приводом от двигателя постоянного тока с ускорением $0,3\text{ г}$, являющимся адекватным раздражителем вестибулярных рецепторов [5], и амплитудой $0,5\text{ м}$. Время экспозиции составляло 45 минут с двумя 15-минутными интервалами. Крысы третьей и четвертой групп находились в экспериментальной комнате, но укачиванию не подвергались.

Эвтаназия крыс первой группы производилась сразу после укачивания.

Животным второй и третьей групп на седьмые сутки после действия прямолинейных ускорений внутрибрюшинно вводили ЛПС кишечной палочки в количестве 10 мкг/кг . Крысам четвертой группы инъецировали апиrogenный физиологический раствор (АФР) в объеме, не превышающем $0,5\text{ мл}$.

Животных 2-4-й групп декапитировали через 90 минут после инъекции ЛПС – максимум прироста ректальной температуры или АФР. Затем проводили забор крови и тканей – ствол головного мозга и часть толстого кишечника (10 см от илеоцекального угла в дистальном направлении) при температуре $0-4^{\circ}\text{C}$. Взятые для исследования образцы хранили в жидком азоте до использования.

Все дальнейшие операции проводились при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в стволе головного мозга и кишечнике определяли ферментативным методом. Общую глутатион-S-трансферазную (ГТ) активность цитозоля оценивали спектрофотометрически с помощью 1-хлор-2,4-динитробензола по методу, предложенному W.H. Nabig и соавт. [6]. Определяли глутатионпероксидазную активность цитозоля, используя в качестве субстрата пероксид водорода, а также содержание малонового диальдегида – МДА [7]. Определение активности глутатионредуктазы (ГР) осуществляли по методу, предложенному А.М. Герасимовым и соавт. [8]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали с помощью спектрофотометрического метода, основанного на определении степени торможения реакции окисления кверцетина.

Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) оценивали по уменьшению концентрации НАДН в ходе ферментативных реакций, катализируемых указанными ферментами (при помощи коммерческих наборов "Анализ X"). Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли фотометрически по содержанию освобожденного 4-нитрофенола, используя указанный выше набор.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием t -критерия Стьюдента. В таблице результаты представлены в виде $M \pm m$.

Результаты и их обсуждение. Укачивание животных (первая группа) в течение 45 минут вызывало снижение на 54% количества восстановленного глутатиона в стволе головного мозга по сравнению с интактной группой животных, которые не подвергались укачиванию. Достоверное падение концентрации GSH через час после укачивания, возможно, является следствием стресса, перенесенного животными. Как показано Ф.З. Меерсоном [9], высокие концентрации катехоламинов при стрессовых ситуациях (к их числу относят и действие чрезмерных вестибулярных стимулов) вызывают активацию перекисного окисления липидов. Об интенсификации ПОЛ свидетельствует и ферментемия. Так, в на-

ших исследованиях действие вертикального укачивания вызывало достоверное увеличение активности ЩФ и АсАТ в сыворотке крови.

Не исключено, что образующийся избыток гидроперекисей является одной из причин истощения запасов глутатиона в нейронах ствола головного мозга. Более того, при укачивании может быть затруднен процесс регенерации GSH, вследствие нарушения кровоснабжения тканей мозга и снижения содержания НАДФН, являющегося специфическим коферментом глутатион-редуктазы (последний принимает участие в регенерации восстановленного глутатиона). Кроме того, следует помнить, что в стволе головного мозга расположены центры статических и статокинетических рефлексов, нейроны которых активируются при раздражении рецепторов вестибулярной системы. Этот фактор, несомненно, играет роль в изменении функционального состояния нейронов ствола головного мозга в относительно короткое время после вертикального укачивания.

При исследовании тканей животных, подвергавшихся укачиванию перед введением ЛПС (вторая группа), оказалось, что изменения в работе ферментов антиоксидантной системы носят разнонаправленный характер. Так, содержание восстановленного глутатиона (хороший акцептор гидроксильных радикалов) в стволе головного мозга животных, устойчивых к эндотоксину, было в 2,4 раза выше, чем в стволе головного мозга крыс, которые укачиванию не подвергались (таблица). Идентичные результаты были получены и при исследовании тканей кишечника. Выявленные различия в содержании GSH позволяют предположить, что антиоксидантная система организма животных, устойчивых к эндотоксину, работает более эффективно. В пользу этого предположения также свидетельствует отсутствие нарушений в работе глутатионпероксидазы (инактиватора перекиси водорода), а в кишечнике его достоверное увеличение.

Наряду с этим в стволе головного мозга наблюдалось подавление активности глутатион S-трансфераз (таблица). Однако падение активности ГТ (в кишечнике изменений в работе этих ферментов обнаружено не было) отнюдь не свидетельствует о снижении антиперекисного потенциала клетки. Ведь одной из задач глутатион S-трансфераз в клетке является нейтрализация перекиси водорода, а поскольку с этим успешно "справляется" глутатионпероксидаза, возможно не возникает необходимости в задействовании дополнительных резервов. Помимо этого, у крыс, устойчивых к ЛПС, обнаружено падение активности супероксиддисмутазы (таблица). Однако, как известно, рост активности СОД наблюдается при повышенной продукции супероксидных анион-радикалов, например, при моделировании эндотоксемии экзогенного происхождения. Это в свою очередь, позволяет предположить, что в организме животных, устойчивых к эндотоксину, интенсивность процессов перекисного окисления липидов снижена, по сравнению с теми крысами, которым эндотоксин вводился без предварительного укачивания. Кроме того, полученные нами данные не противоречат данным литературы. В работе [10] указывается на аналогичные изменения в активности супероксиддисмутазы при индукции толерантности к эндотоксину кишечной палочки.

Следует отметить, что активность лактатдегидрогеназы в группе животных, которым липополисахарид вводили после укачивания, была на 63% ниже аналогичного показателя у крыс, не подвергавшихся действию экстремальных гравитационных факторов. Уровень активности АлАТ, АсАТ и ЩФ статистически достоверно не отличался от показателей контрольной группы.

Таким образом, полученные нами результаты дают основание полагать о повышении эффективности функционирования антиоксидантных систем в клетках ствола головного мозга и кишечника животных, которым введение эндотоксина осуществлялось на седьмой день после вертикального укачивания.

**Биохимические показатели в стволе головного мозга
и кишечнике крыс в условиях внутрибрюшинного введения 10 мкг/кг
липополисахарида *Escherichia coli***

	Ствол мозга		Кишечник	
	ЛПС	ЛПС после укачивания	ЛПС	ЛПС после укачивания
ГП (нМ/мин на 1 мг белка)	7,8±0,3	8,8±0,36	16,4±1,14	22,6±1,8*
ГР (µМ НАДФН/мин на 1 мг белка)	13,1±0,1	14,5±0,6	54,4±0,7	51,2±1,8
ГТ (1Х2,4ДНБ) (нМ/мин на 1 мг белка)	75,5±2,1	67,6±2,3*	15,4±1,1	14,8±0,9
МДА (нМ на 1 мг белка)	–	–	0,6±0,1	0,65±0,04
СОД (у.е. на 1 мг белка)	131,0±14,7	75,8±15,7*	–	–
GSH (нМ на 1 мг белка)	239,2±48,1	580,8±48,6**	71,1±8,5	219,5±30,8**

Примечания: 1.* P<0,05; ** P<0,01.

2. Активность СОД в стволе головного мозга и содержании МДА в кишечнике не определялись.

ЛИТЕРАТУРА

1. Роль микрофлоры кишечника в проявлении вегетативных дисфункций в условиях вертикального укачивания / В.А. Кульчицкий [и др.] // Архив клинической и экспериментальной медицины. Сер. биол. наук. – 2000. – Т. 9. – № 1. – С. 91-92.
2. *Котешова, Н.О.* Способность микрофлоры кишечника при проникновении во внутреннюю среду организма инициировать развитие толерантности к эндотоксину / Н.О. Котешова, В.А. Кульчицкий // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2002. – № 3. – С. 82-83.
3. The effect of endotoxin on intestinal mucosal permeability to bacteria in vitro / L.L. Go [et al.] // Arch. Surg. [Electronic resource]. – 1995. – Mode of access: <http://www.inform.ind.edu/PBIO/brum.html>. – Date of access: 15.06.09.
4. *Guidot, D.M.* Endotoxin pretreatment in vivo increases the mitochondrial respiratory capacity in rat hepatocytes / D.M. Guidot // Arch. Biochem. Biophys. [Electronic resource]. – 1998. – Mode of access: <http://www.inform.ind.edu/PBIO/brum.html>. – Date of access: 22.06.09.
5. *Барнацкий, В.Н.* Морская болезнь / В.Н. Барнацкий. – М.: Медицина, 1983. – 144 с.
6. *Habig, W.H.* The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig [et al.] // J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 240, № 5. – P. 7130-7139.
7. Methods in enzymology / H. Ohkawa [et al.] // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 141, № 9. – P. 351.
8. Ферментативные механизмы торможения перекисного окисления в различных отделах головного мозга / А.М. Герасимов [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1976. – № 1. – С. 189-194.
9. *Меерсон, Ф.З.* Адаптация, стресс и профилактика / Ф.З. Меерсон. – М.: Наука, 1981. – 278 с.
10. Thioredoxin is associated with endotoxin tolerance in mice / H. Sano [et al.] // Crit. Care Med. – 2002. – Vol. 30, № 1. – P. 190-194.

Поступила в редакцию 02.10.2008 г.