АНТИОКСИДАНТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕЛЕЗЕНКИ В УСЛОВИЯХ ИНТОКСИКАЦИИ

Рожкова И.С.¹, Теплый Д.Л.²

¹ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань, e-mail: polyris@list.ru;

²ФГБОУ ВО Астраханский государственный университет, Астрахань, e-mail: physiology-agu@mail.ru

Использование биохимических методов исследования позволило выявить онтогенетические особенности ультрадианных ритмов содержания альбумина и общего белка у самцов крыс различных возрастов в ткани селезенки при нормальных условиях, при воздействии токсина (сероводородсодержащего газа) и на фоне введения тималина и витамина Е. В ходе регистрации экспериментальных данных был осуществлен сравнительный анализ ритмической активности содержания альбумина, а также общего белка в тканях селезенки крыс в онтогенетическом аспекте, при токсическом стрессе и на фоне введения комплекса антиоксидантов в условиях интоксикации. Полученные в ходе исследования колебания уровней содержания альбумина, изучаемого также общего белка, были охарактеризованы как ультрадианные с периодами 20, 40 и 60 минут. Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют о том, что с возрастом снижается устойчивость ткани селезенки к действию экзотоксиканта, и об усилении инволюционных процессов в условиях стресса. Зарегистрированные в эксперименте изменения имеют обратимый характер, так как введение тималина и α -токоферола модифицирует кинетическую кривую, повышая во всех возрастных группах амплитуду колебаний, а также уровень среднего содержания общего белка и альбумина. Совместное введение используемых в эксперименте средств тималина и α -токоферола у всех возрастных групп на фоне хронического действия природного газа выявило их антиоксидантные свойства.

Ключевые слова: околочасовые ритмы, ткань селезенки, крысы, хроническая интоксикация, стресс, тималин, витамин Е.

ANTIOXIDANTS IN THE REGULATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE SPLEEN IN THE CONDITIONS OF INTOXICATION

Rozhkova I.S.¹, Teply D.L.²

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: polyris@list.ru;

²Astrakhan State University, Astrakhan, e-mail: physiology-agu@mail.ru

The use of biochemical research methods revealed the ontogenetic features of ultradian rhythms of albumin and total protein in the spleen tissues of male rats of different ages under normal conditions, intoxication caused by exposure to hydrogen sulfide-containing gas, and during administration of thymalin and vitamin E. During the registration of experimental data, a comparative analysis of the rhythmic activity of the albumin content, as well as the total protein in the tissues of the spleen of the rat with in the ontogenetic aspect, with toxic stress and against the background of the introduction of a complex of antioxidants in conditions of intoxication. The revealed fluctuations in the level of both albumin and total protein can be characterized as ultra-radian with a frequency of 20 to 40–60 minutes. The data obtained during the experiment indicate that, with age, the resistance of spleen tissue to the action of an exotoxin decreases and the involution processes increase under stress. The recorded changes in the experiment are reversible, since the introduction of thymalin and α -tocopherol modifies the kinetic curve, increasing the amplitude of vibrations in all age groups, as well as the average level of total protein and albumin. The combined introduction of thymalin and α -tocopherol used in the experiment in all age groups against the background of the chronic action of natural gas revealed their antioxidant properties.

Keywords: ultradian rhythms, spleen tissue, rats, chronic intoxication, stress, thymalin, vitamin E.

Современные промышленные комплексы с мощной инфраструктурой по переработке нефти и газа оказывают воздействие на все компоненты внешней среды, такие как: атмосфера, гидросфера и литосфера, а также растительный и животный мир [1, 2]. Для того чтобы восстановить нарушенный экологический баланс, необходимо провести углубленное исследование, которое позволит изучить воздействие следующих веществ:

сероводорода, сернистого ангидрида и иных продуктов, содержащих серу, на человеческий организм.

Природный газ, добываемый на Астраханском месторождении, представляет собой мощный антропогенный токсический и стрессовый фактор, оказывающий влияние на биологические системы жизнеобеспечения, на обменные процессы между микроциркуляторным руслом и клетками тканей [3-5]. Железо, находящееся в молекулах цитохромоксидаз, реагирует с сероводородом, присутствующим в природном газе, образуя прочное соединение, приводящее к развитию в тканях острой гипоксии [6-8]. Кроме того, в результате интоксикации в органах и тканях изменяется равновесие между кислотами и щелочью [9], что приводит к избыточному накоплению свободных радикалов и развитию оксидативного стресса [10].

Цель исследования: изучить функциональную активность ткани селезенки крыс-самцов в нормальных условиях, при хроническом воздействии природного газа Астраханского месторождения, а также при действии тималина и α -токоферола в условиях развивающегося токсического стресса в органе.

Материал и методы исследования. Объектом изучения были 90 самцов белых крыс, которые в условиях вивария имели свободный доступ как к пище, так и к воде.

Исследуемые животные были поделены на несколько групп: контрольные и экспериментальные, в то же время согласно возрасту выделены подгруппы: первая – молодые (неполовозрелые) особи, вторая – половозрелые, третья – старые крысы. Все экспериментальные исследования проводились на животных в осенний и зимний период, чтобы максимально исключить действие сезонных ритмов.

Группы всех экспериментальных крыс в течение 6 недель были подвергнуты хроническому воздействию природного газа Астраханского месторождения с концентрацией по сероводороду при 90 ± 4 мг/м³. Опыты длились 4 часа в день с понедельника до пятницы. Интактных крыс помещали в те же камеры на тот же срок эксперимента, используя состав дыхательной смеси, не содержащей примесей природного газа.

Возрастные группы экспериментальных животных в течение 6-недельного эксперимента через день внутримышечно получали инъекцию 0,01 мг тималина, рассчитанную на 100 г массы тела крысы. Витамин Е в виде 10%-ного масляного раствора α -токоферола ацетата вводили *per os* с помощью инсулинового шприца без иглы, используя дозу 0,5 мг на 100 г массы тела для каждого стрессированного животного в течение 2 недель до начала постановки эксперимента и на протяжении всего периода воздействия природным газом.

По окончании опытов животным производили инъекцию этаминала натрия внутривенно, используя дозу 5 мг на 100 г массы тела, затем их декапитировали и осуществляли выделение образцов ткани селезенки. Забор материала проводили с временными интервалами через каждые 20 минут в течение 3 часов начиная от времени прекращения эксперимента. Ткань селезенки гомогенизировали непосредственно перед измерением в гомогенизаторе Даунса, используя фосфатный буфер pH 7,45 при 0,07М.

Биуретовым методом определяли содержание белка в гомогенатах ткани селезенки, используя спектрофотометр Baekman (США) при настройке длины волны на уровне 500–560 нм. Для того чтобы определить уровень содержания альбумина в гомогенатах ткани, мы применяли унифицированный метод, который основан на реакции взаимодействия альбумина и бромкрезолового зеленого. Количественные измерения проводили, используя спектрофотометр Baekman (США) при длине волны на уровне 630–690 нм.

Согласно методике И.Д. Стальной и Т.Т. Гаришвили, модифицированной Е.А. Строевым и В.Г. Макаровой, нами были зарегистрированы показатели свободнорадикальных процессов. По уровню содержания малонового диальдегида (МДА) в нмоль/0,05 г сырого веса ткани изучалось исходное перекисное окисление липидов (ПОЛ), затем определялась скорость спонтанного (Сп. ПОЛ) и аскорбатзависимого (Аск. ПОЛ) (которая измерялась в нмоль) образованного малонового диальдегида (МДА) в пробе в течение 1 часа инкубации. Используя методику Е.Е. Дубининой, С.О. Бурмистрова с соавторами, мы определяли окислительную модификацию белков (ОМБ), основанную на качественной реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином, в результате которой образуются окрашенные производные динитрофенилгидразона, зарегистрированные нами на спектрофотометре при уровне длины волны в 270 нм.

Статистическая математическая обработка данных ритмогенеза в ткани селезенки изучаемых групп животных проводилась с использованием компьютерных программ «Cosinor Ellipse 2006» и «Microsoft Excel 2007». Нами был зафиксирован основной показатель ритмического процесса – период колебаний, а также изучены амплитуда, акрофаза и мезор. Для определения достоверности различий двух средних и относительных величин использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные в ходе исследования колебания уровней содержания альбумина, а также общего белка можно охарактеризовать как ультрадианные с периодами от 20–40 до 60 минут. Уровень амплитуды колебания общего белка и альбумина у неполовозрелых контрольных животных соответствует 47% и 34% от среднего значения (мезора). Угнетение синтетической активности в условиях

интоксикации наблюдалось значительное у молодых крыс. В результате зарегистрировано снижение уровней содержания общего белка на 53%, а альбумина на 74% от мезора. Кроме того, зафиксировано снижение амплитуды колебаний общего белка на 9%, но наблюдалось увеличение амплитуды колебаний альбумина на 18%. Очевидно, что такие изменения в колебаниях этого белка связаны с его основной функцией – транспортного белка.

У интактных половозрелых крыс среднее содержание общего белка в ткани селезенки в 2 раза выше, чем у молодых, и в 1,3 раза выше, чем у старых животных. Уровень содержания альбумина у половозрелых крыс в контроле больше на 59%, чем у молодых, и на 10% выше, чем у старых животных. Но при этом амплитуда колебаний содержания белков в ткани селезенки у половозрелых крыс ниже, чем у молодых и старых животных, что, вероятно, связано с более высокой степенью синхронизации спленоцитов у этой группы крыс.

В ткани селезенки стрессированных половозрелых животных динамика уровней содержания общего белка и альбумина продолжает сохранять окологасовую периодичность, хотя в условиях гипоксии, вызванной воздействием природного газа, происходит угнетение синтеза изучаемых белков. Так, при сравнении с контролем у половозрелых крыс зарегистрировано резкое падение уровней общего белка на 11,6% и альбумина на 21,4% от мезора. Токсическое воздействие природного газа на ткань селезенки половозрелых животных вызывает уменьшение амплитуды колебаний общего белка на 20% и альбумина на 19,6%, что модифицирует кинетическую кривую.

В условиях интоксикации в ткани селезенки старых крыс наблюдается снижение амплитуды колебаний как общего белка, так и альбумина на 3% и 1,5% соответственно. В результате эксперимента также зарегистрировано снижение уровня общего белка на 4% и альбумина на 32% от среднего значения (мезора) в сравнении с контролем.

У молодых крыс при гипоксии, вызванной воздействием природного газа, на фоне введения антиоксидантов происходит модификация окологасовых осцилляций в ткани органа. Ответная реакция спленоцитов в условиях стресса характеризуется увеличением среднего содержания общего белка в 4 раза и альбумина в 6,5 раза от среднего значения.

Комплекс антиоксидантов, применяемый в эксперименте, способствовал увеличению амплитуды колебаний альбумина на 2%, но отмечалось снижение амплитуды общего белка на 7% в сравнении с подгруппой ССГ. Очевидно, этот факт свидетельствует о низкой степени синхронизации спленоцитов в ткани селезенки неполовозрелых животных, которая требуется для обеспечения их оптимального функционирования при токсическом стрессе.

У стрессированных половозрелых крыс в условиях гипоксии на фоне введения антиоксидантов ответная реакция ткани характеризуется увеличением общего белка на 10,5% и альбумина на 36%. Комплекс антиоксидантов (тималин и витамин Е), применяемый в эксперименте, способствовал повышению адаптации организма экспериментальных крыс, что в свою очередь проявилось увеличением амплитуды колебаний, и способствовал активизации ферментных систем, необходимых для синтеза общего белка и альбумина.

Введение антиоксидантов группе старых крыс при токсическом стрессе стабилизирует компенсаторные возможности ткани селезенки. Это характеризуется увеличением среднего уровня содержания как общего белка (на 30%), так и альбумина (на 63%) в сравнении с подгруппой стрессированных крыс. При сравнительном анализе на кинетической кривой наблюдалось увеличение амплитуды колебаний общего белка на 4,5%, а альбумина – на 4%.

При сравнении возрастных особенностей параметров оксидативного стресса, регистрируемых в ткани селезенки контрольных животных, отмечено, что у старых животных более высокий уровень содержания продуктов, которые реагируют с тиобарбитуровой кислотой, соответствуя уровню $3,99 \pm 0,502$ нмоль/0,05 г в ткани ($p < 0,05$), но в то же время он намного меньше, чем у молодых крыс, где зафиксировано $3,25 \pm 0,399$ нмоль/0,05 г ткани ($p < 0,05$). Ускорение аскорбатзависимого ПОЛ нами наблюдалось ($p < 0,05$) у старых животных в сравнении с группой половозрелых: от $20,39 \pm 0,597$ и до $40,27 \pm 0,719$ нмоль/ч (табл. 2, 3). Кроме того, отмечается повышение уровня спонтанного ПОЛ у старых животных в сравнении с группой молодых крыс: от $23,62 \pm 0,204$ и до $24,42 \pm 0,815$ нмоль/ч ($p < 0,05$) (табл. 1, 3).

Таблица 1

Уровень свободнорадикальных процессов в селезенке молодых крыс, подвергшихся хроническому стрессу на фоне введения комплекса антиоксидантов ($M \pm m$)

Группа (n=10)	Молодые (неполовозрелые) животные			
	Исходное ПОЛ нмоль/0,05 г ткани	Спонтанное ПОЛ нмоль/ч	Аскорбатзависимое ПОЛ нмоль/ч	ОМБ мкмоль/мг белка
К	$3,25 \pm 0,399$	$17,47 \pm 0,605$	$23,62 \pm 0,204$	$0,54 \pm 0,057$
ССГ	$8,14 \pm 0,660^{***}$	$65,0 \pm 0,344^{***}$	$73,04 \pm 0,670^{***}$	$0,73 \pm 0,051^{**}$
ССГ + АО	$7,31 \pm 0,501^{\diamond\#\#}$	$22,37 \pm 0,710^{\diamond\diamond\#\#}$	$31,49 \pm 0,630^{\diamond\diamond\#\#}$	$0,03 \pm 0,013^{\diamond\diamond\#\#}$

Примечание: К – интактные крысы, ССГ – крысы стрессированные в результате воздействия природным газом, ССГ + АО крысы стрессированные в результате воздействия природным газом в условиях применения антиоксидантов; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$, сравнимое с контролем; $^{\diamond} p < 0,05$, $^{\diamond\diamond} p < 0,01$ и $^{\diamond\diamond\diamond} p < 0,001$ в сравнении с группой, которая получала ССГ, и с группой ССГ + АО; $^{\#} p < 0,05$, $^{\#\#} p < 0,01$ и $^{\#\#\#} p < 0,001$ в сравнении К группы и подгруппы, которая получала ССГ + АО (обозначения здесь и далее те же).

Наиболее высоким уровень ОМБ оказался в ткани селезенки старых крыс – $0,69 \pm 0,029$ мкмоль/мг белка ($p < 0,05$), хотя у половозрелых контрольных животных уровень на 80% ниже (табл. 2) ($p < 0,001$).

Таблица 2

Уровень свободнорадикальных процессов в селезенке половозрелых крыс, подвергшихся хроническому стрессу на фоне введения комплекса антиоксидантов ($M \pm m$)

Группа (n=10)	Половозрелые животные			
	Исходное ПОЛ нмоль/0,05 г ткани	Спонтанное ПОЛ нмоль/ч	Аскорбатзависимое ПОЛ нмоль/ч	ОМБ мкмоль/мг белка
К	$3,71 \pm 0,351$	$24,40 \pm 0,644$	$20,39 \pm 0,597$	$0,14 \pm 0,036$
ССГ	$10,02 \pm 0,598^{***}$	$73,30 \pm 0,566^{***}$	$62,41 \pm 0,908^{***}$	$0,76 \pm 0,081^{***}$
ССГ+АО	$3,72 \pm 0,655^{\diamond\diamond\#}$	$10,85 \pm 0,625^{\diamond\diamond\#\#}$	$15,40 \pm 0,801^{\diamond\diamond\#\#}$	$0,08 \pm 0,013^{\diamond\#}$

Данные эксперимента показали, что хроническое воздействие серосодержащего газа Астраханского месторождения изменяет активность свободнорадикальных процессов в ткани селезенки, а также уровень антиоксидантной защиты.

Ответная реакция работы исследуемого органа при воздействии экзотоксиканта зависит от возраста изученных животных. Нами обнаружено, что при токсическом стрессе с возрастом увеличивается количество продуктов, которые реагируют с тиобарбитуровой кислотой, именно это и приводит к формированию окислительного стресса. Об этом также свидетельствует рост всех показателей исходного ПОЛ, аскорбатзависимого ПОЛ и спонтанного ПОЛ у старых крыс в сравнении как с неполовозрелыми, так и с половозрелыми животными ($p < 0,001$) (табл. 1, 2, 3).

Таблица 3

Уровень свободнорадикальных процессов в селезенке старых крыс, подвергшихся хроническому стрессу на фоне введения комплекса антиоксидантов ($M \pm m$)

Группа (n=10)	Старые животные			
	Исходное ПОЛ нмоль/0,05 г ткани	Спонтанное ПОЛ нмоль/ч	Аскорбатзависимое ПОЛ нмоль/ч	ОМБ мкмоль/мг белка
К	$3,99 \pm 0,502$	$24,42 \pm 0,815$	$40,27 \pm 0,719$	$0,69 \pm 0,0297$
ССГ	$17,18 \pm 0,931^{***}$	$118,32 \pm 0,295^{***}$	$125,34 \pm 0,755^{***}$	$0,75 \pm 0,057^{***}$
ССГ+АО	$3,79 \pm 0,602^{\diamond\diamond\#}$	$13,25 \pm 0,284^{\diamond\diamond\#\#}$	$113,01 \pm 0,565^{\diamond\diamond\#\#}$	$0,07 \pm 0,025^{\diamond\diamond\#}$

Зафиксированные показатели повышения исходного ПОЛ до уровня $17,18 \pm 0,931$ нмоль/0,05 г ткани, усиление скорости спонтанного до уровня $118,32 \pm 0,295$ нмоль/ч и

индуцированного ПОЛ до уровня $125,34 \pm 0,755$ нмоль/ч соответственно усугубляют токсический эффект сероводорода в ткани селезенки старых крыс (табл. 1-3).

Более низкий уровень исходного ПОЛ ($p < 0,001$) в условиях гипоксии, вызванной воздействием природным газом, зарегистрирован у неполовозрелых животных – $8,14 \pm 0,660$ нмоль/0,05 г ткани.

Анализируя результаты исследования у молодых и половозрелых крыс в условиях стресса, можно отметить рост скорости спонтанного ПОЛ ($p < 0,05$) у половозрелых животных на 13%, но замедление индуцированного ПОЛ ($p < 0,05$) на 15%. В ткани селезенки неполовозрелых крыс при хроническом стрессе в сравнении с интактной группой этого возраста зафиксировано наибольшее возрастание уровня исходного ПОЛ на 150,5% ($p < 0,001$), наблюдалось увеличение в 3,7 раза скорости спонтанного ПОЛ ($p < 0,001$) и в 3 раза – скорости аскорбатзависимого ПОЛ ($p < 0,001$), также отмечено повышение на 35% уровня ОМБ ($p < 0,01$). Полученные результаты свидетельствуют об усилении свободнорадикальных процессов, индуцированных действием токсиканта на ткань селезенки неполовозрелых крыс, и более выраженных компенсаторных возможностях органа половозрелых животных.

Уровень ОМБ (табл. 1, 2, 3) увеличивается во всех возрастных группах стрессированных животных ($p < 0,001$), что свидетельствует не только об эффекте токсического действия сероводородсодержащего газа на ткань селезенки, но и о его способности развивать оксидативный стресс в органе независимо от возраста крыс.

Тималин в сочетании с α -токоферолом на фоне хронической ингаляции газа проявил выраженные антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства, вызвав снижение уровня изучаемых показателей свободнорадикальных процессов в селезенке крыс трех возрастных групп. Наибольший корригирующий эффект комплексного введения препаратов был зафиксирован у половозрелых крыс в сравнении с контрольными данными ($p < 0,001$) групп молодых и старых животных.

Скорость аскорбатзависимого ПОЛ снижается ($p < 0,001$) как у молодых, так и у старых крыс, но не достигает контрольных значений (табл. 1, 3). Очевидно, это связано с истощением компенсаторных возможностей спленоцитов в этих возрастных группах. Однако комбинирование препаратов в эксперименте вызвало уменьшение уровня ОМБ в сравнении с контролем на 94% ($p < 0,001$) у неполовозрелых крыс, на 43% ($p < 0,05$) этот же показатель зарегистрирован ниже у половозрелых животных и на 90% ($p < 0,05$) меньше у старых крыс. Это еще раз свидетельствует о наличии корригирующего эффекта применяемых препаратов на белковый обмен ткани селезенки.

Заключение

Гипоксия, вызванная воздействием природным газом, приводит к снижению амплитуды колебаний общего белка и альбумина в ткани селезенки всех возрастных групп, хотя кинетическая кривая продолжает сохранять окологасовую периодичность. Зарегистрированные изменения в эксперименте носят обратимый характер, так как введение тималина и α -токоферола модифицирует кинетическую кривую, повышая во всех возрастных группах амплитуду колебаний, а также уровень среднего содержания общего белка и альбумина. Совместное введение используемых в эксперименте лекарственных средств – тималина и α -токоферола – у всех возрастных групп на фоне хронического действия природного газа выявило их антиоксидантные свойства, которые способствовали снижению уровня свободнорадикальных процессов.

Список литературы

1. Барабой В. А., Брехман И. И., Голожин В. Г. и др. Перекисное окисление и стресс. М.: Наука. 2004. 148 с.
2. Боев В. М., Сетко Н. П. Сернистые соединения природного газа и их действие на организм. М.: Медицина. 2001. 216с.
3. Рожкова И.С., Теплый Д.Л. Особенности ритмической активности белков плазмы крови в эксперименте // Sciences of Europe. Praha. 2018. №27. vol. 2. P. 12-14.
4. Шишкина Т.А., Наумова Л.И., Давлатова И.С. Сосудистая реакция стенки тонкой кишки на действие антропогенных факторов // Морфология. 2018. Т. 153. № 3. С. 323.
5. Ярошинская А.П., Лазько А.Е., Зиндан С. Влияние серосодержащего газа на дренажную функцию системы микроциркуляции // Морфология. 2016. Т. 149. Вып. 3. С. 249.
6. Голубкина Е.В., Дюкарева О.С., Тризно Н.Н., Удочкина Л.А., Тризно М.Н. Влияние процессов пероксидации в тромбоцитах на систему гемостаза при воздействии сероводородсодержащего газа // Журн. мед.-биол. исследований. 2019. Т. 7. № 1. С. 40-48.
7. Fukami K., Sekiguchi F., Kawabata A. Hydrogen sulfide and T-type Ca^{2+} channels in pain processing, neuronal differentiation and neuroendocrine secretion. Pharmacology. 2017. Vol. 99. № 3-4. P. 196–203.
8. Wallace J.L., Wang R. Hydrogen Sulfide-Based Therapeutics: Exploiting a Unique but Ubiquitous Gasotransmitter. Nat. Rev. Drug. Discov. 2015. Vol. 14. № 5. P. 329–345.
9. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинко-биохимические аспекты. СПб.: Изд-во Медицинская пресса, 2006. 400 с.

10. Теплый Д.Л. Об участии свободных радикалов и антиоксидантов в молекулярно-клеточных механизмах старения // Свободные радикалы, антиоксиданты и старение. Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2011. С. 5-10.