

А.Н. Глебов

Доцент, кандидат медицинских наук

М.А. Глебов

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА И СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА NO-СИНТАЗЫ

*Кафедра военной эпидемиологии и военной гигиены
военно-медицинского факультета в учреждении образования
«Белорусский государственный медицинский университет»*

Целью данной работы является оценка активности процессов перекисного окисления липидов и состояния антиоксидантной системы при введении кверцетина и селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы L-лизин-NG-ацетамидина в условиях окислительного стресса, индуцированного введением липополисахарида от *Escherichia coli*. Установлено, что введение кверцетина и селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы ослабляло воспроизведение окислительного стресса.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, липополисахарид, оксид азота.

Одним из ведущих механизмов развития септического шока является окислительный стресс, который развивается в организме в результате дисбаланса между выработкой свободных радикалов и эндогенными механизмами антиоксидантной защиты, что вызывает повреждение тканей через окислительную модификацию основных компонентов клеточной мембраны [5, 8]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что окислительный стресс играет ведущую роль в генезе различных патологических состояний, таких как ишемия-реперфузия, атеросклероз, сердечная недостаточность, гипертензия, почечная недостаточность, кардиомиопатии [7, 11].

В основе развития окислительного стресса лежит чрезмерная выработка активных форм кислорода, азота или недостаточность клеточных механизмов защиты, ограничивающих их образование и негативное воздействие [7]. Данный тип стресса является общим явлением для всех типов клеток, который возникает прежде всего в митохондриях [9]. Неизбежным побочным продуктом митохондриального дыхания являются активные формы кислорода (АФК), вырабатываемые, главным образом, в матриксе митохондрий. В организме развились специфические механизмы защиты против свободных радикалов кислорода, такие как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза и множество других, функция которых состоит в снижении кумулятивной нагрузки АФК внутри клеток или во внеклеточном пространстве. Ведётся дискуссия о том, какие АФК больше повреждают клеточные компоненты при эндогенном окислительном стрессе [3]. Потенциально повреждающими являются и монооксид азота (NO), и другие родственные радикалы, несмотря на наличие разногласий относительно их вклада в патогенез ряда заболеваний [9]. Были проведены исследования, показывающие способность АФК и NO повреждать клеточные компоненты и клетку в целом, но многие вопросы потенциальных

биологических последствий эндогенного окислительного стресса остаются открытыми [2].

Среди различных факторов антиоксидантной системы (АОС) в последнее время отмечается интерес к биологически активным полифенолам растительного происхождения из семейства флавоноидов, и прежде всего к кверцетину. Проявление свойств антиоксиданта у этого флавоноида основано на механизме искусственной ловушки свободных радикалов, что предполагает использование его как возможного перспективного фармакологического средства для борьбы с окислительным стрессом на клеточно-тканевом уровне. Кверцетин рассматривается как один из регуляторов экспрессии белков теплового шока [6]. Индукция данных белков в стрессированных клетках является важным адаптивным механизмом, обеспечивающим минимизирование опасных последствий различных «протеотоксических» воздействий. В то же время, белки теплового шока в реализации своего действия тесно интегрируются с L-аргинин-NO системой. Одним из механизмов защитного действия белков теплового шока является блокада гиперпродукции NO.

Целью настоящей работы является оценка активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояния АОС при введении кверцетина и селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы L-лизин-NG-ацетамидина (L-NIL) в условиях окислительного стресса, индуцированного введением липополисахарида (ЛПС).

Материал и методы. Исследования были проведены на лабораторных крысах-самцах (n=45) массой 190-230 г, содержащихся в условиях вивария при 20 °С. Окислительный стресс моделировали, вводя внутривенно ЛПС от *Escherichiacoli*(Serotype 0111:B4) в дозе 5 мг/кг («Sigma»). Введение кверцетина («Sigma») осуществлялось внутрибрюшинно в течение 4-х дней один раз в сутки в дозе 5 мг/кг. Модуляция L-аргинин-NO системы выполнялась внутривенной инъекцией селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы L-NIL («Sigma») в дозе 2 мг/кг через 45 мин после введения ЛПС. Через 180 мин после введения ЛПС брали образцы тканей (сердца, легких, печени, почек, мышц).

Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) определяли по измерению конъюгированных диеновых структур из образуемых гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот [10]. Уровень оснований Шиффа (ОШ) определяли по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длине волны возбуждения 344 нм и длине волны эмиссии 440 нм на спектрофлуориметре «F-4010» фирмы «Hitachi» [10]. Каталазная активность в биологическом материале оценивалась по количеству израсходованной перекиси водорода, способной образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс на спектрофотометре «СФ-46» при длине волны 410 нм [4]. Содержание α -токоферола определяли по интенсивности флуоресценции гептанового экстракта при длине волны возбуждения 292 нм и длине волны флуоресценции 325 нм на спектрофлуориметре «F-4010» фирмы «Hitachi» [4]. Полученные данные статистически обрабатывались общепринятым методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При окислительном стрессе в тканях интенсифицируются процессы ПОЛ. Уровень ДК возрастал в сердце на 137,6 % (p<0,001), в лёгких на 184,0 % (p<0,001), в печени на 101,2 % (p<0,001), в почках на 90,4 % (p<0,001), в мышцах на 52,1 % (p<0,01) в сравнении с тканями контрольной

группы животных. Близкий характер выявлен в изменении содержания ОШ в тканях. Окислительный стресс сопровождался выраженным приростом этого показателя в сердце на 99,2 % ($p < 0,001$), в лёгких на 111,3 % ($p < 0,001$), в печени на 81,8 % ($p < 0,001$), в почках на 121,3% ($p < 0,001$), в мышцах на 54,5 % ($p < 0,001$). В этих условиях представлялось важным оценить состояние факторов, формирующих антиоксидантную защиту организма. При окислительном стрессе выявлено снижение активности каталазы в сердце с $41,28 \pm 1,79$ до $20,79 \pm 2,32$ ($p < 0,001$), в лёгких с $35,28 \pm 1,69$ до $17,04 \pm 3,18$ ($p < 0,001$), в печени с $93,69 \pm 1,14$ до $46,02 \pm 2,73$ ($p < 0,001$), в почках с $66,04 \pm 2,99$ до $28,24 \pm 4,82$ ($p < 0,001$), в мышцах с $44,04 \pm 2,38$ до $29,74 \pm 2,28$ ($p < 0,001$) мМН₂O₂/сек•гбелка. В данных условиях также установлено снижение содержания а-токоферола в сердце с $191,9 \pm 3,57$ до $123,4 \pm 7,66$ ($p < 0,001$), в лёгких с $280,1 \pm 5,90$ до $126,3 \pm 9,94$ ($p < 0,001$), в печени с $135,6 \pm 3,76$ до $94,3 \pm 4,38$ ($p < 0,001$), в почках с $181,1 \pm 4,59$ до $141,8 \pm 5,69$ ($p < 0,001$), в мышцах с $188,6 \pm 5,70$ до $123,8 \pm 4,45$ ($p < 0,001$) нМ/г.

В условиях окислительного стресса введение кверцетина характеризовалось уменьшением значения показателей активности ПОЛ в тканях у крыс в сравнении с группой животных получавших ЛПС. Для ДК в сердечной ткани оно составило 27,3 % ($p < 0,05$), в лёгочной ткани 27,8 % ($p < 0,05$), в печёночной ткани 30,0 % ($p < 0,01$), в почечной ткани 25,9 % ($p < 0,05$). Уменьшение содержания ОШ составило: 12,7 % ($p < 0,02$) в сердце, 20,3 % ($p < 0,001$) в лёгких, 17,8 % ($p < 0,001$) в печени, 16,0 % ($p < 0,001$) в почках, 13,1 % ($p < 0,001$) в мышцах. Применение кверцетина в сочетании с L-NIL 34,4 % ($p < 0,001$). практически не изменяло состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при этом виде стресса. Однако, изучаемые показатели активности ПОЛ в группе животных, получавших кверцетин и ЛПС, были выше, чем в контрольной группе. Так, уровень ДК был увеличен в сердце на 72,8 % ($p < 0,01$), в лёгких на 104,9 % ($p < 0,001$), в печени на 40,9 % ($p < 0,02$), в почках на 41,0 % ($p < 0,05$), в мышцах на 36,8 % ($p < 0,01$); содержание ОШ было выше в сердце на 74,0 % ($p < 0,001$), в лёгких на 68,5 % ($p < 0,001$), в печени на 49,4 % ($p < 0,001$), в почках на 86,0 % ($p < 0,001$), в мышцах на

Состояние показателей АОС существенно изменялось в тканях у крыс при окислительном стрессе в условиях введения антиоксиданта флавоноидной природы. В данных условиях кверцетин не оказывал выраженного защитного действия в сравнении с контрольной группой животных (не получавших ЛПС), что характеризовалось снижением активности каталазы и содержания а-токоферола соответственно в сердце на 23,6 % ($p < 0,01$) и 24,0 % ($p < 0,001$), в лёгких на 23,7 % ($p < 0,02$) и 34,1 % ($p < 0,001$), в печени на 38,3 % ($p < 0,001$) и 19,8 % ($p < 0,001$), в почках на 22,1 % ($p < 0,01$) и 12,8 % ($p < 0,001$), в мышцах – на 16,1 % ($p < 0,001$) уменьшалось достоверно только содержание а-токоферола. В то же время, защитный эффект кверцетина был достаточно выражен на процессы свободнорадикального окисления при окислительном стрессе, что проявлялось в значении соответствующих показателей АОС. Активность каталазы в тканях данной группы животных по отношению к тканям крыс, получавшим только ЛПС, была в сердце выше на 51,7 % ($p < 0,01$), в лёгких на 57,9 % ($p < 0,05$), в печени на 25,6 % ($p < 0,05$), в почках на 82,1 % ($p < 0,001$); увеличение содержания а-токоферола составило в сердце 18,2 % ($p < 0,05$), в лёгких 46,2 % ($p < 0,001$), в печени 15,4 % ($p < 0,05$), в почках 11,4 % ($p < 0,05$), в мышцах 27,9 % ($p < 0,001$). Выявлено что, в условиях модуляции L-аргинин-NO системы (L-

NIL), введение кверцетина существенного влияния на динамику изменения показателей АОС не оказывало.

Антиоксидантная активность флавоноидов обусловлена ингибированием фосфорилирования тирозина и активацией фосфолипазы D в активированных нейтрофилах, миелопероксидазы, а также связыванием переходных металлов, которые вовлечены в разложение H₂O₂ до гидроксильного радикала. Кроме того, возможно образование комплексов флавоноидов с ионами металлов, снижающих тем самым их доступ к жирным кислотам фосфолипидов клеточных мембран. Использование кверцетина, с одной стороны, обладающего антиоксидантным действием, а с другой – подавляющего экспрессию стресс-индуцированных белков теплового шока и, тем самым, снижающего сопротивляемость стрессированных тканей, не столь однозначно [1].

Проведенные исследования показали потенциальное повреждающее действие окислительного стресса, которое может быть ослаблено при соответствующем вмешательстве. Введение кверцетина, L-NIL ослабляло воспроизведение окислительного стресса. В условиях, когда имеет место снижение мощности АОС организма, на фоне нарушения функционирования мембранных электрон-транспортных цепей, усиления радикалообразования в митохондриях и микросомах, роста АФК и локального накопления карбонилированных белков, в реализации механизмов адаптации приобретают значение физиологические факторы, усиливающие устойчивость к стресс-воздействию. Учитывая вездесущую природу АФК внутри эукариотных клеток и множество структур, развившихся для их обезвреживания, важно отметить, что понимание путей ослабления патологических последствий окислительного стресса может быть достигнуто с учётом того, какой механизм повреждён, задействован в его реализации.

Выводы. Таким образом, выявленный характер изменения показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, а также выраженность этих изменений в условиях модуляции как L-аргинин-NO системы, так и введения кверцетина, отсутствие потенцирования их эффекта, определяется, вероятно, близкими механизмами, лежащими в основе генеза сложного комплекса нарушений при этом состоянии, обуславливающих изменение гомеостаза всего организма.

Литература

1. Будагова, К. Р., Жмаева, С. В., Григорьев, А. Н. и др. Флавоноид дигидрокверцетин в отличие от кверцетина не ингибирует экспрессию белка теплового шока в условиях клеточного стресса // Биохимия. 2003. Т. 68. № 9. С. 1287–1294.
2. Зенков, Н. К., Ланкин, В. З., Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М., 2001. 343 с.
3. Зоров, Д. Б., Банникова, С. Ю., Белоусов, В. В. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. 2005. Т. 70. № 2. С. 265–272.