Минздрава России

Астраханский государственный медицинский университет

Кафедра биологии и ботаники

Оксидативный стресс при хронической интоксикации и введение антиоксидантов

Рожкова Ирина Семеновна доцент, кандидат медицинских наук

Аннотация

Изучено состояние свободно-радикальных процессов в тимусе белых крыс - самцов в постнатальном онтогенезе в условиях хронической интоксикации и введении комплекса антиоксидантов. Раскрыты возрастные особенности скорости перекисного окисления липидов и белков вилочковой железы в норме, при хроническом воздействии серосодержащего природного газа и введении витамина Е и тималина. Проведено сравнение динамики уровня свободно-радикальных процессов в гомогенатах ткани крысна различных этапах онтогенеза при хроническом воздействии серосодержащего природного газа и действии комплекса антиоксидантов. Установлено, что полученные экспериментальные данные свидетельствуют о снижении устойчивости ткани тимуса с возрастом и об истощении антиоксидантной системы при хронической интоксикации. Эксперименты показали, что введение комплекса антиоксидантов восстанавливает ослабленную функцию, приводя к снижению уровня свободно-радикальных процессов во всех возрастных группах, но с более выраженным эффектом у старых животных.

Ключевые слова: Интоксикация, свободно-радикальные процессы, возрастные изменения, тимус, оксидативный стресс, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, витамина Е, тималин.

Постановка проблемы. В последние годы наблюдается значительный интерес к изучению перекисной активности липидов, как в норме, так и при различных патологических состояниях, так как этот процесс является одним из важнейших факторов адаптации организма. Нарушение баланса между образованием и разрушением перекисей, а так же избыточное накопление свободных радикалов в плазме крови, приводит к снижению уровня утилизации кислорода и в конечном итоге к дефициту энергии и тканевой гипоксии. Разрушающее действие продуктов перекисного окисления липидов на мембраны клеток, приводит к нарушению процессов передачи информации от внеклеточных регуляторов к внутриклеточным эффекторным системам.

Вилочковая железа (тимус) является центральным органом иммунной системы, от состояния и активности которой во многом зависит выраженность защитных реакций всего организма. Условия труда при переработке природного газа современными технологическими способами характеризуются воздействием на работников сложного комплекса неблагоприятных производственных факторов. Многочисленными исследованиями показано, что основными значимыми воздействиями нефтегазоперерабатывающих комплексов являются комбинация газов: сероводород в смеси с углеводородами, сернистый ангидрид, оксид углерода, оксиды азота, ряд аэрозолей. В связи с этим, современные крупные промышленные комплексы по переработке нефтяного и газового сырья с их мощной инфраструктурой воздействуют почти на все составные части внешней среды (атмосферу, гидросферу и литосферу), растительный и животный мир. В этих условиях, необходимость восстановления нарушенного экологического равновесия требует углубленных исследований воздействия таких продуктов, как сероводород, сернистый ангидрид и др., на организм человека.

Анализ последних исследований и публикаций. Многочисленными исследованиями разных авторов установлено, что сероводород, являющийся составной частью природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ), обладает высокой токсичностью для всего живого, а так же вызывает коррозионное повреждение и разрушение используемого оборудования.

В этих условиях в последние десятилетия в Астраханской области произошло резкое ухудшение экологической обстановки, в том числе связанное, с загрязнением атмосферы продуктами Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ) [4, 6]. Ежегодно в воздушный бассейн Астраханской области поступает до 230 тысяч тонн химических веществ, из которых до 90% составляют выбросы от работы промышленных предприятий и автотранспорта [9]. Серосодержащие продукты АГКМ являются мощным токсическим и стрессорным антропогенным фактором, влияющим на жизненно важные биологические системы, к которым относится так же и иммунная система, вызывающим в процессе старения снижение эффективности антиоксидантной защиты [15, 14, 19], снижение содержания витаминов-антиоксидантов [16] и в конечном итоге способствует свободно-радикальному повреждению компонентов клеток [3, 8] и развитию различных возрастных патологий [20]. В основе отрицательного влияния вредных промышленных факторов на организм человека в числе других лежит нарушение процессов апоптоза. Исследования ряда авторов показали, что при развитии целого ряда заболеваний, связанных с воздействием вредных промышленных факторов на организм человека большое значение имеет нарушение регуляции апоптоза, которое также может служить причиной развития преждевременного старения [12]. Согласно свободно-радикальной теории старения, выдвинутой в середине 50-х годов прошлого века Д. Харманом [17], в процессе возрастной инволюции усиливается перекисное окисление липидов, которое индуцирует апоптоз. Свободные радикалы содержат неспаренный электрон, в результате они могут окислять, т.е. повреждать ДНК, белки, липиды и другие молекулы организма [2,21]. Белок р53 является главной детерминантой клеточного механизма, приводящего к програмированной смерти [5]. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок р53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК, вызываемых например, воздействием природного газа, содержащего сероводород, он активируется, результатом чего является запуск апоптоза.

Благодаря высокой проницаемости гистогематических барьеров для сероводорода и образованию низкорастворимых сульфидов, угнетаются ферменты, нарушается кислотно-щелочное равновесие [1]. Ингибируя электронный транспорт в митохондриях, путем формирования прочной связи с железом в молекулах цитохромоксидаз, сероводород вызывает острую тканевую гипоксию [4, 6]. Выраженность защитных реакций организма на внешние воздействия во многом зависит от морфофункционального состояния тканей органов иммунной системы [7, 11], для формирования и функционирования которой необходим апоптоз [5].

Выделение нерешенных ранее частей общей проблемы. В большинстве работ, посвящённых изучению тимуса, приводится его строение без учёта возрастной и вариантной морфологии. Данное обстоятельство может явиться причиной не вполне объективной оценки данных полученных в процессе экспериментальных исследований этого органа. Малоизученным остается вопрос о возрастных и тканеспецифических особенностях реакции тимуса на хроническое воздействие серосодержащего газа, а так же о динамике процессов свободнорадикального окисления обусловленных стрессом.

Цель статьи. Целью данного исследования явилось изучение закономерностей морфофункциональных изменений в тканях тимуса крыс - самцов на различных этапах онтогенеза при хроническом воздействии серосодержащего природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ) и применения комплекса антиоксидантов.

Изложение основного материала. Объектом исследования служили самцы беспородных белых крыс. Интактные и экспериментальные животные были разделены на три группы по 10 особей в каждой по возрастному признаку: 1 группа: молодые - от 15 дней до 1 месяца, 2 группа: половозрелые - 6 - ти месячного возраста, 3 группа: старые - 1-2 лет жизни. Экспериментальные животные подвергались воздействию природного газа АГКМ, содержащего сероводород в концентрации 90 + 4 мг/м3 в течение 6 недель по 4 часа в день. Интактные животные находились также по 4 часа в герметически закрытой затравочной камере, что и опытные, но без присутствия серосодержащего газа. После наркотизации животных этаминалом натрия (внутрибрюшинно в дозе 5 мг на 100г массы тела) производили декапитацию. Процесс перекисного окисления липидов индуцировали добавлением в среду аскорбиновой кислоты и ионов железа (II). Гомогенаты из тканей тимуса, лимфатических узлов и селезенки готовили на фосфатном буферном растворе (рН 7,45). Гомогенизацию проводили при температуре 0 - +40С.

Перекисное окисление липидов основано на взаимодействии одного из конечных продуктов пе- роксидации липидов - малонового диальдегида (МДА) - с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса, имеющий максимум поглощения при длине волны 530532 нм [10, 13, 18]. Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре Baek- man (США). Определялись следующие показатели свободнорадикальных процессов: исходное перекисное окисление липидов (ПОЛ) по уровню содержания малонового диальдегида (МДА) в нмоль/0,05 г сырого веса ткани, а скорость спонтанного (сп. ПОЛ) и аскорбатзависимого (Аск.ПОЛ) в нмоль образовавшегося МДА в пробе за 1 час инкубации. Окислительную модификацию белков в плазме крови определяли на основании реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДФГ) с образованием окрашенных производных динитрофенилгидразона при длине волны 270 нм на спектрофотометре Baekman (США). С применением общегистологических методов и окраски этидием бромидом изучен апоптоз в тканях тимуса в норме и при хроническом воздействии серосодержащего природного газа и в условиях применения комплекса антиоксидантов.

Материалы исследования были обработаны статистически с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Установлено, что вилочковая железа окружена соединительно-тканной капсулой и в большинстве случаев состоит из двух долей. В трёх случаях (4.3%) обнаружена трёхдолевая форма тимуса.

С момента рождения тимус располагается за грудиной в вентральном средостении, и его топография изменяется в процессе постнатального онтогенеза. У крыс в возрасте до трёх недель каудальный полюс вилочковой железы находится на уровне третьего межреберья. К 6 месяцам каудальный полюс достигает своего дефинитивного положения, прикрывая ушко правого предсердия.

Краниальный полюс тимуса у молодых крыс выступает над уровнем яремной вырезки грудины, что в более позднем возрасте наблюдается достаточно редко. К латеральным поверхностям органа прилежат внутренние яремные вены, париетальная плевра, лимфатические узлы и крупное скопление жировой клетчатки, объём которой нарастает к периоду половозрелости, достигая максимума у старых крыс.

У новорожденных крыс средняя масса тимуса составила 7,10±0,33мг, у молодых крыс она увеличивается до 238,2±0,03мг и в дальнейшем не изменяется.

При световой микроскопии тимуса выявляется его дольчатое строение. Размеры долек тимуса достигают максимума у молодых крыс и уменьшаются к периоду наступления половой зрелости. Дольки железы разделяются прослойками соединительной ткани, пучки которой ответвляются от тонкой капсулы органа и проникают на разную глубину внутрь органа. Отдельные дольки имеют поперечный размер от 0,2 до 5 мкм, нередко сливаются друг с другом, образуя древовидные ветвления. В дольках отчетливо различаются наружное более темное корковое вещество и центральное более светлое мозговое вещество. В зависимости от соотношения эпителиальных и лимфоидных клеток и их функционального состояния ти- моцитов в дольке тимуса выделяют 4 зоны. Первая зона - это наружный подкапсулярный слой. В ней в 1-3 слоя располагаются большие лимфоциты и бластные клетки, для которых характерны высокая митотическая активность. Эпителиальные клетки имеют типичную звездчатую или веретенообразную форму, образуя широко петлистая сеть, вокруг кровеносных сосудов, где обнаруживаются и макрофаги. В этой зоне происходит образование Т- лимфоцитов из светлых клеток.

Вторая зона - внутренний кортикальный слой, или собственно корковое вещество тимуса. Здесь накапливаются образовавшиеся Т-лимфо- циты, формируя специфические антигенные детерминанты.

Корковое вещество тимуса представлено несколькими слоями средних и малых лимфоцитов, содержание которых колеблется от 60 до 85%. Лимфоидные клетки наружной части корковой зоны (обычно это лимфобласты) расположены в 3-4 слоя, диаметр клеток - около 7 мкм. В более глубоких отделах этой зоны встречаются макрофаги. Если субкапсулярно можно видеть делящиеся клетки, а также лимфобласты, то внутри коркового вещества находятся главным образом потомки лимфобластов - неделящиеся малые тимусные лимфоциты, расположенные вблизи дендритных корковых эпителиальных клеток. Корковые эпителиальные клетки имеют звездчатую форму за счет длинных и тонких цитоплазматических отростков. Последние соединяются друг с другом с помощью десмосом и образуют «сеточку», где располагаются тимоциты коркового вещества. Ядро тимоцитов овальное, площадь ядра в среднем у молодых крыс составляет 930±0,86 мкм2, у половозрелых - 770±1,22 мкм2, у старых животных 550± 1,01 мкм2.

Третья зона - мозговое вещество, которое постепенно расширяется после рождения крысы. У группы молодых крыс площадь мозгового слоя преобладает над площадью коркового. Мозговое вещество является местом выхода Т-лимфоцитов из органа через венулы в кровоток. Здесь обильно представлены эпителиально-ретикулярные клетки (5- 20%). Количество лимфоидных клеток в мозговом слое меньше, чем в корковом веществе, и в основном это лимфоциты среднего диаметра. Эпителиальные клетки этого слоя могут формировать эпителиальные тяжи, фолликулоподобные структуры, расположенные вокруг шарообразных тимических телец. Эпителиальная сеть в отличие от таковой в корковом веществе становится широкоячеистой. Наблюдаются гипертрофированные клетки. Многочисленные лимфоциты имеют средние размеры.

Тимические тельца представлены концентрическими скоплениями продолговатых и веретенообразных клеток с большим ядром. Размер телец колеблется: у молодых крыс он составляет в среднем около 60 мкм, у половозрелых 300-320 мкм. У старых животных, на фоне возрастной инволюции тимуса, тельца отличаются большой вариабельностью размера от 80 до 250 мкм. Соединительнотканная строма тимуса у молодых крыс представлена как соединительнотканными, так и эпителиальными элементами. При этом удельная длина коллагеновых и ретикулярных волокон в паренхиме и ширина междольковых прослоек относительно стабильна. На этом этапе онтогенеза дольки тимуса имеют вид многоугольников.

У половозрелых животных плотность стромы увеличивается. Этот процесс происходит на фоне увеличения ширины междольковых перегородок и удельной длины коллагеновых волокон в паренхиме, что объясняется расширением междольковых соединительнотканных структур и началом интенсивного жирового перерождения органа.

Отдельные участки коркового вещества оказываются заключенными внутри мозгового вещества в виде мелких округлых долек, называемыми корковыми узелками.

Эпителиоретикулоциты соединяются между собой с помощью десмосом, в результате чего формируется сеть, в которой находятся лимфоцитам различной степени зрелости. Гипертрофированные эпителиальные клетки с обширной цитоплазмой имеют вытянутое, часто неправильной формы ядро, по периферии которого сконцентрирован хроматин в виде небольших глыбок. Именно эти клетки образуют свободную сеть, густо заполненную лимфоцитами.

Корковый слой инволюирующего тимуса заселен редкими лимфоцитами и содержит наполненные жировыми вакуолями многочисленные макрофаги. Отмечается инфильтрация мозгового и коркового вещества плазматическими клетками. Наблюдается нарушение тесных соприкосновений между тимоцитами и эпителиальными клетками.

Четвертая зона тимуса образована периваску- лярной соединительной тканью, окружающей сосуды мозгового вещества. Это конечный путь для Т-лимфоцитов и, возможно, первое место встречи с чужеродными антигенами.

Эпителиальные клетки стромы тимуса примыкают к кровеносным капиллярам, окружая их с помощью своих отростков, формируя тем самым узкие канальцы для прохождения капилляров. При этом между эпителиальной мембраной и капиллярами находится периваскулярное пространство, заполненное тканевой жидкостью и содержащее лимфоциты, макрофаги, плазматические и жировые клетки, фибробласты, форменные элементы крови. В результате формируется гематотимусный барьер, между тканевыми структурами тимуса и кровеносным руслом органа.

Так как тимус является открытой системой, максимальные возрастные изменения происходятименно в субкапсулярной зоне и мозговом веществе. Степень изменения параметров тимуса, а также изменение его клеточного состава коррелируют с возрастом животных.

Уровень свободнорадикального окисления в тканях тимуса свидетельствует о возрастных особенностях функционирования иммунной системы в различные периоды онтогенеза.

Хроническое действие серосодержащего газа проявляется стресс - реакцией, сопровождающейся увеличением количества продуктов свободно-радикального окисления: интенсивности ПОЛ и уровня ОМБ.

Таблица 1 Уровень свободно-радикальных процессов в тимусе крыс разного возраста (М±т)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группа | Молодые животные | | | Половозрелые животные | | | Старые животные | | |
|  | Исх. ПОЛ нмоль/ 0,05г ткани | Сп. ПОЛ нмоль/ч | Аск. ПОЛ нмоль/ч | Исх. ПОЛ нмоль/ 0,05г ткани | Сп. ПОЛ нмоль/ч | Аск. ПОЛ нмоль/ч | Исх. ПОЛ нмоль/ 0,05г ткани | Сп. ПОЛ нмоль/ч | Аск. ПОЛ нмоль/ч |
| К | 7,32± 0,357 | 55,57± 0,932 | 66,17±0,553 | 3,22± 0,346 | 32,05± 0,722 | 38,32± 0,584 | 3,96±0,457 | 20,30± 0,634 | 18,76± 0,316 |
| ССГ | 4,44±0,349\* | 40,11± 0,448\* | 52,70± 0,810\* | 4,69± 0,822\* | 30,00± 0,598\* | 48,32± 0,595\* | 18,90 ± 0,712\* | 120,00± 0,693\* | 195,97± 0,694\* |
| ССГ+ АО | 1,77± 0,697\*\* | 3,73± 0,971\*\* | 9,30± 0,359\*\* | 1,14± 0,544\*\* | 15,11± 0,431\*\* | 11,77± 0,416\*\* | 1,0±0,351\*\* | 4,87± 0,459\*\* | 17,21± 0,319\*\* |

Примечание: К - контрольная группа, ССГ - группа, подвергшаяся воздействию серосодержащего газа, ССГ + АО - группа, подвергшаяся воздействию серосодержащего газа на фоне введения антиоксидантов; \*р<0,05-0,001 в сравнении с контрольным значением, \*\*р<0,05-0,001 в сравнении с контрольным значением.

Установлено, что в условиях хронической интоксикации более чувствительными к интоксикации оказались клетки ткани тимуса молодых и старых животных.

Выводы и предложения. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при хроническом воздействии серосодержащего природного газа АГКМ интенсивность свободно-радикальных процессов в тканях тимуса характеризуется возрастными особенностями функционирования иммунной системы в ответ на действие токсиканта.

Последствия, вызываемые развитием окислительного стресса, позволяют поставить задачу использования корректирующих антиоксидантов [16].

Предварительное введение витамина Е до начала опыта и введение тималина стрессирован- ным животным привело к снижению уровня свободно-радикальных процессов во всех возрастных группах, но с более выраженным эффектом у старых животных.

Введение сочетанного комплекса антиоксидантов при хроническом воздействии серосодержащего природного газа так же оказало выраженное адаптогенное действие, как у молодых, так и у старых животных. Это говорит о своевременности и целесообразности антиоксидантной коррекции на фоне хронической интоксикации.

тимус антиоксидант газ

Список литературы

1. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях стресса / Е.Е. Дубинина // Вопр. Мед. химии. - 2001. - Т. 47. - Вып. 6. - С. 561 - 581.

. Кольтовер В.К. Свободно-радикальная теория старения: современное состояние и перспективы // Успехи геронтологии. - 1998. - Вып. 2. - с. 37 - 42.

. Кондратенко Е.И. Функциональные взаимосвязи эндокринных и свободнорадикальных процессов у крыс разного пола при изменении освещенности : моногр. / Е.И. Кондратенко. - Астрахань : Астраханский ун-т, 2003. - 195с.

. Мажитова М.В. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная защита разных отделов центральной нервной системы на этапах постнатального онтогенеза белых крыс в норме и при действии промышленных серосодержащих поллютантов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / М.В. Мажитова. - Астрахань. - 2012. -44 с.

. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель / В.С. Новиков - СПб.: Наука, 1996. - 276с.

. Полунин И.Н. Токсический отек легких при остром отравлении сероводородсодержащим газом / И.Н. Полунин, Р.И. Асфандияров, Н.Н. Тризно. - Астрахань. - 1999. - 219с.

. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. - 2002. - №4. - С. 237-243.

. Рожкова И.С. Показатели свободнорадикальных процессов в иммунной системе крыс на различных этапах онтогенеза / И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Астраханский мед. Журнал. - 2012. - т. 7. - № 4. - с. 223 - 225.

. Саноцкий И.В. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм / И.В. Саноцкий, В.Н. Фоменко. - Москва: Медицина, 1979. - 232с.

. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой 1977. - С. 66-68.

. Стефани Д.В., Зернов И.И. Клеточные мембраны при иммунном ответе /Д.В. Стефани, И.И.Зернов // Проблемы мембранной патологии в педиатрии. - М: 1984. С.151-161.

. Суханов Г.А. Апоптоз / Г.А. Суханов, О.Е. Акбашева. - Томск.: Изд-во ТПУ, 2006. - 172с.

. Теплый Д.Л., Аюпова Н.А. Особенности морфологической картины сыворотки крови мышей разных возрастных групп при экспериментальном стрессе / Д.Л. Теплый, Н.А. Аюпова // Естественные науки: Журнал фундаментальных и прикладных исследований. - 2005. - №.10.-С.47-50.

14. Adachi H., Ishii N. Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in Caenorhabditis elegans // J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci. - 2000. - Vol. 55, № 6. - P. 280-285.

. Arivazhagan P., Ramanathan K., Pan- neerselvam C. Effect of DL-alha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats // Chem. Biol. Interact.

. Arockia-Rani P.J., Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging // Exp. Gerontol. - 2001. - Vol. 36, № 10. - P. 1713-1726.

. Harman D. The aging process major risk factor for disease and death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. - Vol. 88. - P. 5360-5363.

. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 1979, 95(2), P.351-358.

. Shinohara R., Mano T., Nagasaka A. et al. Lipid peroxidation levels in rat cardiac muscle are affected by age and thyroid status // J. Endocrinol. - 2000. Vol. 164, № 1. - P. 97-102.

. Sodergren E., Cederberg J., Vessby B., Basu S., Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats // Europ. J. Nutr. - 2001. - Vol. 40, № 1. - P. 10-16.