

УДК:616.24-002-092.9-0.91:611.24-0.18.1]-0.92:612.0.15.11.

І.В. Челпанова**ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСУ ТА ДЕСТРУКТИВНИХ ЗМІН У ЛЕГЕНЯХ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ПНЕВМОНІЇ***Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького*

Челпанова І.В. Взаємозв'язок прооксидантно-антиоксидантного статусу та деструктивних змін у легенях при експериментальній пневмонії // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 95-98.

Представлена нами праця висвітлює особливості співвідношення процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантної системи (АОС) та деструкції легеневої тканини на експериментальній моделі гострої пневмонії (ГП). Виявлено, що у хворих на пневмонію значно активізуються процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і при цьому утворюються вільні радикали та перекисні сполуки, які спричиняють безпосередній пошкоджуючий вплив на легеневу тканину і сприяють розвитку в ній запального процесу. Не з'ясованим залишається взаємозв'язок стану прооксидантно-антиоксидантної системи та деструктивних змін у легеневій тканині при експериментальній пневмонії. Моделльний процес ГП в щурів через 2 години після інтраназального зараження культурою *Staphylococcus aureus* супроводжується зростанням вмісту дієних кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), активності супероксиддисмутази (СОД) та каталази в легеневій тканині самців і самок. В подальшому, через 6 годин після зараження, у самців вміст продуктів ПОЛ збільшується, активність СОД і каталази в легенях відносно знижується. На відміну від самців, у яких спостерігалось виснаження ферментної ланки АОС, у самок на шосту годину після зараження ферменти АОС функціонували достатньо ефективно. Наведені зрушення перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи супроводжувалися морфологічними ознаками гострої пневмонії при вивченні мікропрепаратів легень. Підвищення прооксидантної активності з одночасним пригніченням антиоксидантних систем призводить, в кінцевому результаті, до деструкції судинно-стромальних компонентів легеневої тканини. Такий же механізм, очевидно, лежить в основі дезорганізації структур аеро-гематичного бар'єру. В результаті порушення проникності судин мікроциркуляторного русла та стінки альвеол посилюється ексудація в альвеоли тканинної рідини, нарастають процеси еміграції клітин макрофагічної системи.

Ключові слова: прооксидантно-антиоксидантний статус, морфологія, пневмонія, щур.

Челпанова І.В. Взаємозв'язок прооксидантно-антиоксидантного статусу і деструктивних змін у легенях при експериментальній пневмонії // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 95-98.

Представленная нами работа освещает особенности соотношения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы (АОС) и деструкции легочной ткани на экспериментальной модели острой пневмонии (ОП). Выявлено, что у больных пневмонией значительно активизируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), при этом образуются свободные радикалы и перекисные соединения, которые повреждающе действуют непосредственно на легочную ткань и способствуют развитию в ней воспалительного процесса. Не выясненной остается взаимосвязь между состоянием прооксидантно-антиоксидантной системы и деструктивными изменениями в легочной ткани при экспериментальной пневмонии. Моделльный процесс ОП у крыс через 2 часа после интраназального заражения культурой *Staphylococcus aureus* сопровождается ростом содержания диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в легочной ткани самцов и самок. В дальнейшем, через 6 часов после заражения, у самцов содержание продуктов ПОЛ увеличивается, активность СОД и каталазы в легких относительно снижается. В отличие от самок, у которых наблюдалось истощение ферментного звена АОС, у самок через шесть часов после заражения ферменты АОС функционировали достаточно эффективно. Приведенные сдвиги перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы сопровождалась морфологическими признаками острой пневмонии при изучении микропрепаратом легких. Повышение прооксидантной активности с одновременным угнетением антиоксидантных систем приводит, в конечном итоге, к деструкции сосудисто-стромальных компонентов легочной ткани. Такой же механизм, очевидно, лежит в основе дезорганизации структур аеро-гематического барьера. В результате нарушения проницаемости сосудов микроциркуляторного русла и стенки альвеол усиливается экссудация в альвеолы тканевой жидкости, нарастают процессы эмиграции клеток макрофагической системы.

Ключевые слова: прооксидантно-антиоксидантний статус, морфологія, пневмонія, крыса.

Chelpanova I.V. Interrelation between prooxidant-antioxidant status and destructive changes in the lungs of white rats with an experimental pneumonia // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 95-98.

The aim of our study – is to reveal the peculiarities between the processes of lipid peroxidation and AOS and destruction of lung tissue in experimental models of acute pneumonia (AP). Indicators of lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of lung tissue were determined in intact rats and in animals with experimental models of AP after 2 and 6 hours after infection by *Staphylococcus aureus*. So, after rats infection by *Staphylococcus aureus* the rate of lipid peroxidation products was increased and AOS activation took place, particularly its enzymatic level, which was accompanied by a balance between the formation of lipid peroxidation products and their disposal. Later, after 6 hours, we found an increase in lipid peroxidation products formation and superoxide dismutase (SOD) and catalase activity were lowered. Thus, in contrast to males, who have observed depletion of enzymatic AOS level in females at the sixth hour after infection, AOS enzymes were functioned quite effectively. These changes in lipid peroxidation and antioxidant system were accompanied by signs of acute pneumonia in lung specimens. The functioning of the antioxidant system in females is more efficient than in males, which in turn may explain the absence of morphological changes in the lung tissue of females in two hours after infection. However, in males, in contrast to intact animals at this time on a microscopic level revealed a slight thickening of the alveolar septum and cell-round infiltration between them.

On the sixth day, specimens of lung tissue in the lumen of small bronchi mainly accumulated a small amount of mucus and white blood cells, single cells revealed desquamated epithelium. Identified lymphohistocytosis cell infiltration around small bronchi, and infiltration of vessel walls. The alveolar septum were infiltrated, the lumen of the alveoli are filled with serous fluid. Thus, it was formed a great amount of microscopic signs of serous-desquamative pneumonia, located mainly in the basal parts of the lungs. In peripheral areas signs of emphysema are showed.

Key words: prooxidant-antioxidant status, morphology, pneumonia, rat.

Вступ. Представлені дослідження є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних та патологічно змінених клітин та тканин». (№ державної реєстрації 0113U000207).

Вивчення патогенетичних механізмів, ранньої діагностики та своєчасного лікування гострої пневмонії (ГП) набула сьогодні особливого значення і є одним з актуальних напрямків у сучасній терапії, пульмонології та патологічній фізіології. У середньому від 10 до 13,8 на 1000 населення хворіють на пневмонію. Ця патологія займає 30-40% від усіх захворювань легень. За останні 30 років летальність від пневмонії зросла від 1 до 9%, а за умови розвитку тяжких ускладнень у реанімаційних відділеннях досягає 40-50%. До цього часу, незважаючи на , здавалось би, значні успіхи в її лікуванні, за даними ВООЗ, пневмонія займає четверте місце у структурі смертності після серцево-судинних захворювань, злоякісних новоутворень, травм та отруєнь, а в США шосте місце в структурі летальності.

Встановлено, що інфекція, гіпоксія та токсичні фактори створюють умови для підсилення окислення ліпідів клітинних мембран, активації ендогенних фосфоліпаз, пригнічення активності антиоксидантів. Виявлено, що у хворих на пневмонію значно активізуються процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і при цьому утворюються вільні радикали та перекисні сполуки, які спричиняють безпосередній пошкоджуючий вплив на легеневу тканину і сприяють розвитку в ній запального процесу. Не з'ясованим залишається взаємозв'язок стану прооксидантно-антиоксидантної системи та деструктивних змін у легеневій тканині при експериментальній пневмонії.

Мета нашого дослідження- вивчення особливостей співвідношення процесів ПОЛ і АОС та деструкції легеневої тканини на експериментальній моделі ГП.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено на 60 статевозрілих щурах лінії Вістар масою 180-210г. Контрольною групою були 20 інтактних тварин (по 10 самиць і самців), і 40 щурів (по 20 самиць і самців) підлягали інтраназальному зараженню культурою *Staphylococcus aureus*, чим відтворювали у них експериментальну модель ГП. Моделювання ГП здійснювали за методом Шляпнікова та співав. [8]. Усі тварини утримувалися в умовах віварію і робота з ними відповідає «Правилам проведення робіт з використанням експериментальних тварин » та згідно положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин , що використовуються для експериментальних та інших навчальних цілей» (Страсбург,1986), загальних етичних принципів експериментів на тваринах , прийнятих I Національним конгресом України по біоетиці (Київ, 2001г.), Закону України № 3447 -IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Забір матеріалу для мікроскопічного дослідження здійснювали після евтаназії щурів шляхом декапітації після передозування ефірного наркозу. Тканину легень забирали оперативним шляхом та фіксували взятий матеріал у 10 % розчині формаліну, ущільнювали і заливали у парафін. Зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксином і еозином. Мікроскопічні дослідження та фотографування препаратів здійснювали з використанням мікроскопа МБИ -1 та цифровим фотоапаратом Nikon D3100 при збільшенні :ок.х 10, об.х 20. [5].

Показники пероксидації ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи визначали у легеневій тканині інтактних щурів та у тварин при експериментальній моделі ГП через 2 та 6 годин після зараження[1,2,4,7].

Стан вільнорадикального окиснення ліпідів визначали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) [3] і малонового діальдегіду (МДА) [4] . Ступінь активності антиоксидантної системи (АОС) оцінювали за вмістом ферментів супероксиддисмутази (СОД) та каталази [4,6].

Результати досліджень оброблено статистично з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що інтенсивність утворення продуктів ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів у легенях самців і самиць дещо відрізняється за фізіологічних умов.

Так, у самиць у легенях більший вміст ДК і МДА на 12,5 і 12,3%, а каталази на 12,5% порівняно з самцями (таблиця).

Слід відмітити підвищену інтенсивність утворення продуктів пероксидації ліпідів у самців через дві години після інтраназального зараження культурою *Staphylococcus aureus*. Вміст ДК і МДА підвищувався у легеневій тканині самців на 89,7 і 110% відповідно. У цей же час активність СОД та каталази підвищилася на 60,3 і 52,7% відповідно при ГП і порівняно з інтактними щурами (див. таблицю).

Через дві години після зараження в легенях самиць збільшився вміст ДК і МДА на 64,6 і 82,3% відповідно при експериментальній моделі ГП порівняно з інтактними тваринами (див. таблицю). Це супроводжувалося збільшенням активності СОД і каталази на 67,1 і 66,5%. Отже, через дві години після зараження активність СОД і каталази у легенях була вищою у самиць на 16,6 і 19,8% відповідно.

Таким чином, після зараження щурів *Staphylococcus aureus* підвищувалась інтенсивність утворення продуктів ПОЛ і відбувалась активація АОС, зокрема її ферментної ланки, що у самців супроводжувалося підтримкою рівноваги між утворенням продуктів пероксидації ліпідів та їх знешкодженням.

Продовжуючи дослідження самців через 6 годин після зараження у тканинах легень виявлено подальше збільшення вмісту ДК на 27,1% і МДА на 27,6% порівняно з показниками тварин, досліджених через 2 години після зараження.

При цьому зменшувалась активність СОД і каталази на 12,6 і 21,8% відповідно.

Нами встановлено, що вміст ДК і МДА у легенях самців перевищував такий у інтактних тварин на 160,3 і 190,1% відповідно. При цьому відносно зменшувалась активність СОД і каталази перевищуючи при цьому показники здорових тварин на 40,0 і 25,3% відповідно.

У самиць, як і у самців через 6 годин після зараження в легенях підвищувався вміст продуктів ПОЛ. Вміст ДК і МДА перевищував показники інтактних самиць на 99,3 і 117,3% відповідно (див. таблицю). Активність СОД збільшувалася на 77,0%, каталази на 51,0% порівняно з групою контрольних тварин. У свою чергу у самиць на відміну від самців у період з другої по шосту годину після зараження не відбулося пригнічення активності ферментів АОС, виявлено лише тенденцію до зменшення активності каталази в легенях. Отже, на відміну від самців, у яких спостерігалось виснаження ферментної ланки АОС, у самиць на шосту годину після зараження ферменти АОС функціонували достатньо ефективно.

Наведені зрушення перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи супроводжувалися морфологічними ознаками гострої пневмонії при вивченні мікропрепаратів легень. Слід зазначити, що функціонування антиоксидантної системи в тварин-самок більш ефективно ніж у самців, що у свою чергу може пояснювати відсутність морфологічних змін у тканинах легень самок через дві години після зараження (рис.1). Водночас у самців, на відміну від інтактних тварин (рис.2) у цей час на мікроскопічному рівні виявлене незначне потовщення між альвеолярних перетинок та їх круглоклітинна інфільтрація.

Таблиця. Інтенсивність утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів і активність антиоксидантної системи у інтактних щурів, у щурів через 2- та 6 годин після зараження ($M \pm m$)

Група тварин	Дієнові кон'югати нмоль/мл	Малоновий діальдегід, нмоль/мл	Супероксид дисмутаза, ум.од.мл	Каталаза, МО/мл	Активність супероксиддисмутази /вміст дієнових кон'югатів/
Інтактні тварини					
Самці (n=10)	12,6 ± 0,8	21,3 ± 0,2	120,3 ± 5,8	44,6 ± 2,1	9,5 ± 0,6
Самиці (n=10)	14,4 ± 0,4*	24,3 ± 0,9*	138,3 ± 3,7*	51,0 ± 2,3*	9,6 ± 0,4
Тварини з експериментальною моделлю ГП через 2 години					
Самці (n=20)	23,9 ± 1,1*	44,7 ± 2,1*	192,8 ± 8,9*	68,1 ± 3,1*	8,1 ± 0,5*
Самиці (n=20)	23,7 ± 1,1*	44,3 ± 1,9*	231,1 ± 1,0*	84,9 ± 4,0*	9,7 ± 0,3
Через 6 годин					
Самці (n=20)	32,8 ± 1,3*	61,8 ± 2,2*	168,5 ± 7,4*	55,9 ± 2,2*	5,1 ± 0,2*
Самиці (n=20)	28,7 ± 1,2*	52,8 ± 2,1*	244,8 ± 11,3*	77,0 ± 3,0*	8,5 ± 0,21*

*<0,05 порівняно з інтактними щурами

На шосту добу, у мікропрепаратах легеневої тканини у просвіті переважно дрібних бронхів накопичувалася невелика кількість слизу і лейкоцитів, виявлені поодинокі клітини десквамованого епітелію. Виявлені осередки лімфогістiocитарної інфільтрації навколо дрібних бронхів (рис.3) і інфільтрація стінок судин (рис.4). Між-

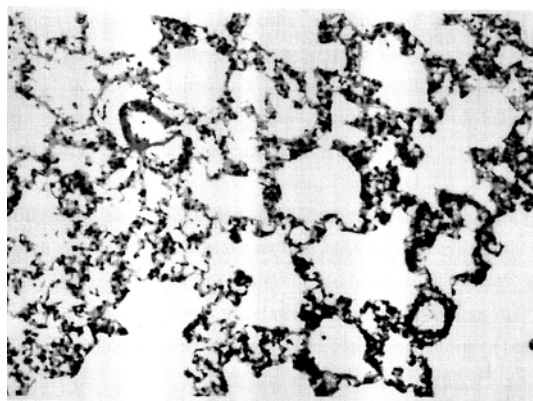


Рис. 1. Тканина легень інтактного статевозрілого щура. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. Об.20,ок.10.

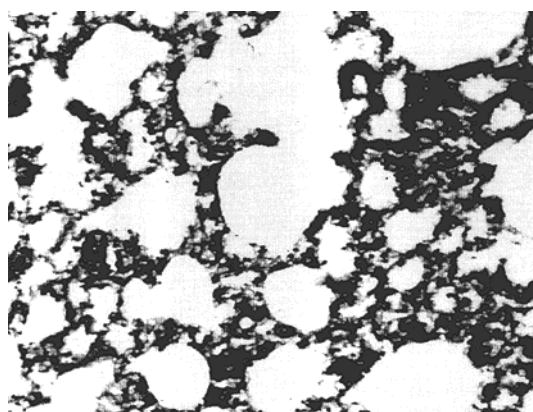


Рис. 2. Тканина легень самки через 2 год. після зараження. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. Об.20,ок.10.

альвеолярні перетинки інфільтровані, просвіт альвеол заповнений серозним ексудатом (рис.4). Таким чином утворювалася велика кількість мікроскопічних осередків серозно-десквамативної пневмонії, розташованих переважно у прикореневих ділянках легень. В периферійних ділянках спостерігалися ознаки емфі-

земи.

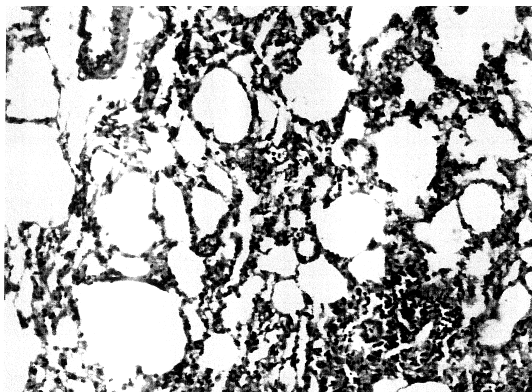


Рис. 3. Тканина легень самця через 2 год. після зараження. Потовщення та інфільтрація міжальвеолярних перетинок. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. Об.20,ок.10.

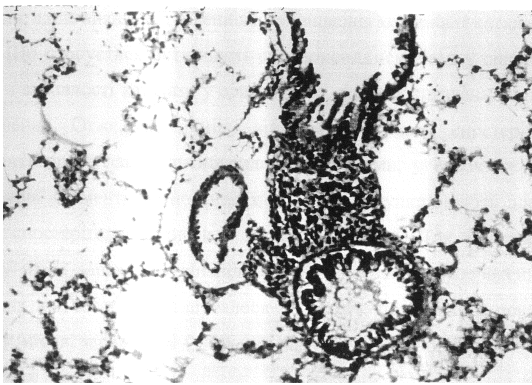


Рис. 4. Тканина легень через 6 годин після зараження. Круглоклітинна інфільтрація бронхів і перибронхіальних ділянок паренхіми легень. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. Об.20,ок.10.

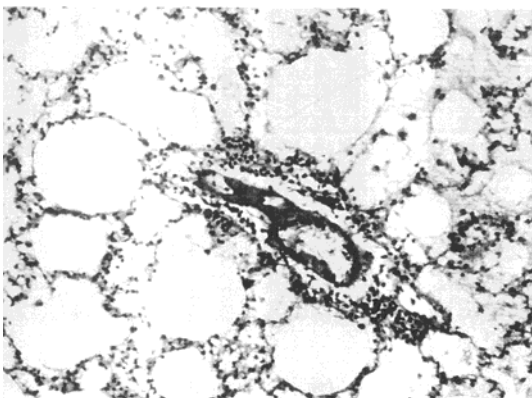


Рис. 5. Тканина легень самця через 6 годин після зараження. Круглоклітинна інфільтрація стінок кровоносних судин і прилеглих ділянок паренхіми легень. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. Об.20,ок.10.

Висновки: Таким чином можна стверджувати, що зрушення у прооксидантно-антиоксидантному статусі тварин з експериментальною пневмонією знаходять морфологічне відтворення у легенях. Підвищення прооксидантної активності з одночасним пригніченням антиоксидантних систем призводить, в кінцевому результаті, до дестру-

кції судинно-стромальних компонентів легеневої тканини. Такий же механізм, очевидно, лежить в основі дезорганізації структур аеро-гематичного бар'єру. В результаті порушення проникності судин мікроциркуляторного русла та стінки альвеол посилюється ексудація в альвеоли тканинної рідини, наростають процеси еміграції клітин макрофагічної системи.

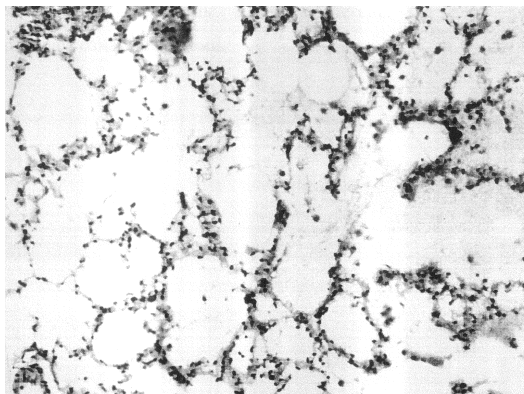


Рис. 6. Тканина легень через 6 годин після зараження. Слиз і десквамований епітелій в альвеолах. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. Об.20,ок.10.

Перспективи подальших досліджень. В перспективі планується більш детальне вивчення деструктивних змін легеневої тканини з використанням методів імуно- та лектиногістохімії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Артишевський А.А. Гистология с техникой гистологических исследований. / А.А Артишевський, А.С. Леонтьков – Минск: Выш.школа, 1999 – 236с.
2. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в крови / В.Б. Гаврилов, М.И.Минькорудная //Лабораторная диагностика ИБС. - К.:Здоров'я. – 1989.- С.170-171.
3. Гудима А.А. Дослідження процесів вільнорадикального окиснення при гострому ураженні легень // Бюлетень Х читань ім. В.В. Підвисоцького. – Одеса. - 2011.- С 42-43.
4. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов ПОЛ в реакции с тиобарбитуратовой кислотой / Э.Н. Коробейникова // Лаб. дело.-1989.-№ 7.-С.8-10.
5. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. / Г.А. Меркулов// – Л., 1969.– 406 с.
6. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов у здоровых детей/ И.А. Переслегина // Лаб.дело.-1989.-№11.- 20 с.
7. Регада М.С. Пневмония. / М.С. Регада, М.М. Регада, І.В.Челпанова, С.І.Мироненко // Монографія. Вид. п'яте, доп. Та перероб.-Львів, 2012.-С 154.
8. Шляпников В.Н. Экспериментальные модели острых пневмоний, вызванных условно-патогенными бактериями и их ассоциацией / В.Н. Шляпников, Т.А.Солодова, С.А.Степанов. - Саратов: Изд-во Саратов. Мед.ин-та,1988.- 33 с.
9. Ewig S. Community- acquired pneumonia. Epidemiology, risk and prognosis //Eur.Respir.Mon.- 1997.- № 3.-Р. 13-35.
10. Grey G.S. Acute respiratory disease in the military. Federal Practitioner.-1995.- №12.-Р.27-33.
11. Hedrick J.A. Community-acquired upper respiratory tract infections and the role of third-generation oral cephalosporins /J.A. Hedrick //Expert Rev Anti Infect Ther. 2010.- 8(1)-Р. 15-21.
12. Surgical lung biopsy for diffuse pulmonary disease: experiens of 196 patients / Y-C.Lee, C-T.Wu, H-H. Hsu et al. // Thorac. Cardiovasc. Surg, 2005. Vol.129, № 5.-Р.984-990.

Надійшла 21.11.2013 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін