

Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Коганова З.И., Пинигин М.А., Федотова Л.А., Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Шипулина З.В.

РОЛЬ ГОРМОНОВ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА ОРГАНИЗМА ПРИ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ WISTAR ЭЛЕКТРОЛИЗНОЙ ПЫЛИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва

Введение. Гормоны коры надпочечников играют ведущую роль в адаптации организма человека к воздействию повреждающих факторов. Целью исследования является сопоставление уровней кортизола (К) и биохимических маркеров повреждения организма (МПО) в пробах крови крыс при моделировании ингаляционного воздействия электролизной пыли (ЭП) – компонента выбросов производства алюминия с высоким содержанием смолистых веществ (СВ), в том числе 3-, 4-бензпирена.

Материал и методы. Самцам крыс Wistar 1 раз в мес вводили в трахею ЭП в дозах, соответствующих содержанию животных при концентрациях ЭП 1; 5,2 и 25,1 мг/м³ в пересчёте на массу СВ. Через 2 нед после 1-го и 2-го введения ЭП и через 6 дней после 3-го в сыворотках крови определяли содержание К (методом иммуноферментного анализа) и 6 МПО: интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции, активность каталазы, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (NAG), кислой ДНКазы, ацетилэстеразы и γ-глутамилтрансферазы (ГТТ).

Результаты. Через 2 нед после 1-го или 2-го введения ЭП (содержание К в 2 раза снижено или не изменялось) наблюдались сходные достоверные изменения почти всех МПО; влияние кратности введения выражалось в небольшом усилении окислительного стресса и достоверном увеличении активности ГТТ (маркера предопухолевых изменений) при максимальной дозе. Через 6 дней после 3-го введения ЭП, на фоне увеличения содержания К в крови крыс в 1,5–2 раза, найдены небольшие достоверные изменения только одного маркера (NAG). Полученные данные укладываются в существующие представления о защитной роли К и двухфазном характере его выделения в кровь, позволяют рассматривать отсутствие МПО на фоне увеличения уровня К как транзитную фазу и имеют общие проблемные моменты с синдромом CIRCI (Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency) в клинике критических состояний.

Заключение. Иммуноферментный анализ К легко встраивается в любой токсикологический протокол как показатель адаптивного ответа организма, но необходимы дальнейшие исследования для прояснения его характеристик и построения непрерывной модели из отдельных точек доза-время.

Ключевые слова: адаптивный ответ; электролизная пыль; крысы; интратрахеальное введение; сыворотка крови; кортизол; биохимические маркеры повреждения организма.

Для цитирования: Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Коганова З.И., Пинигин М.А., Федотова Л.А., Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Шипулина З.В. Роль гормонов коры надпочечников в регуляции ответа организма при интратрахеальном введении крысам Wistar электролизной пыли. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(8): 820-826. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-8-820-826>

Для корреспонденции: Хрипач Людмила Васильевна, доктор биологических наук, зав. лабораторией биохимических и молекулярно-генетических методов исследования ФГБУ «ЦСП» МЗ РФ. E-mail: lkhrpach@mail.ru

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения Госзадания ФГБУ «ЦСП» Минздрава России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Хрипач Л.В., Пинигин М.А., Бударина О.В.; организация и постановка токсикологического эксперимента на животных с получением биологического материала – Федотова Л.А., Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Шипулина З.В.; определение кортизола и биохимических показателей в пробах крови крыс – Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Коганова З.И.; математическая обработка и интерпретация результатов, написание текста статьи – Хрипач Л.В.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Поступила 02.07.2019

Принята к печати 23.07.19

Опубликована 09.2019

Khripach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., Koganova Z.I., Pinigin M.A., Fedotova L.A., Budarina O.V., Sabirova Z.F., Shipulina Z.V.

THE ROLE OF ADRENOCORTICAL HORMONES IN THE REGULATION OF ORGANISM RESPONSE TO INTRATRACHEAL INJECTIONS OF ELECTROLYSIS DUST TO WISTAR RATS

Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. Adrenocortical hormones play a leading role in the adaptation of human organism to damaging factors. **The aim of this study** is to compare levels of cortisol and biochemical markers of organism damage (MOD) in blood samples of rats under a model of electrolysis dust (ED) inhalation exposure. ED being component of emissions in aluminum production and has high content of resinous substances (RS), including 3,4-benzpyrene.

Material and methods. Male Wistar rats were injected ED intratracheally once per month, in doses corresponding to keeping of animals at ED concentrations of 1.0; 5.2 and 25.1 mg/m³, calculated on RS mass. 2 weeks after the 1st and 2nd ED administration and 6 days after the 3rd one, blood serum samples were used for determination of cortisol levels (ELISA) and the following 6 MOD: the intensity of luminol-enhanced chemiluminescence, activities of catalase, N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG), acid DNase, acetyltransferase and γ-glutamyl transferase (GGT).

Results. 2 weeks after the 1st and 2nd ED administrations (cortisol content 2 times reduced or not changed), similar significant changes were observed in almost all MOD; 2nd experimental point, if comparing with 1st point, had slight increase in oxidative stress and significant rise in GGT activity (a marker of precancer changes) at the maximum dose. On the contrary, 6 days after the 3rd injection of ED, in parallel with the increase of cortisol content in rat blood by 1.5 - 2 times, small significant changes were found for only one marker (NAG). The obtained data fit into existing

concepts about protective role of cortisol and biphasic nature of its release into the blood, allow us to consider the absence of MOD, in parallel with rising levels of C, as a transit phase and have common problem aspects with CIRCI syndrome (Critical illness-Related Corticosteroid Insufficiency) in emergency medicine.

Conclusion. Determination of cortisol levels by ELISA assay can be easily incorporated into any toxicological protocol as index of organism adaptive response, but further investigations are needed to clarify its characteristics and to build continuous model from separate time-dose points.

Key words: adaptive response; electrolysis dust; rats; intratracheal administration; blood serum; cortisol; biochemical markers of organism damage.

For citation: Khripach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., Koganova Z.I., Pinigin M.A., Fedotova L.A., Budarina O.V., Sabirova Z.F., Shipulina Z.V. The role of adrenocortical hormones in the regulation of organism response to intratracheal injections of electrolysis dust to Wistar rats. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(8): 820-826. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-8-820-826>

For correspondence: Ludmila V. Khripach, MD, Ph.D., DSci., head of the Laboratory of biochemical and molecular genetics methods of the Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation. E-mail: lkhrpach@mail.ru

Information about authors: Khripach L.V., <https://orcid.org/0000-0003-0170-3085>;

Knyazeva T.D., <https://orcid.org/0000-0001-5279-5018>; Zheleznyak E.V., <https://orcid.org/0000-0001-9339-9310>;

Koganova Z.I., <https://orcid.org/0000-0002-4622-8110>; Pinigin M.A., <https://orcid.org/0000-0001-5291-9009>;

Fedotova L.A., <https://orcid.org/0000-0003-0089-5177>; Budarina O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4319-7192>;

Sabirova Z.F., <https://orcid.org/0000-0003-3505-8344>; Shipulina Z.V., <https://orcid.org/0000-0001-8409-6713>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Contributions: Research concept and design – Khripach L.V., Pinigin M.A., Budarina O.V. Organization and staging of toxicological experiment on animals to obtain biological material – Fedotova L.A., Budarina O.V., Sabirova Z.F., Shipulina Z.V. ELISA and biochemical analysis in rat blood serum – Khripach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., Koganova Z.I. Statistical analysis, interpretation and writing of the manuscript – Khripach L.V. Approval of the final version, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Received: 02 July 2019

Accepted: 23 July 2019

Published: September 2019

Введение

Согласно современным представлениям, в основе адаптации организма человека к воздействию повреждающих факторов, независимо от их конкретной природы (физические, химические, социально-психологические и др.), лежит типовой комплекс нейрогормональных реакций, впервые описанный Гансом Селье в 1936 г. [1]. Концепция Селье определяет этот комплекс как совокупность реакций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы с активацией или ингибированием нисходящих метаболических путей, которая направлена на адаптацию организма к повреждающему фактору и протекает путём смены характерных стадий.

В исходном варианте концепции Селье выделены стадия тревоги (выброс адреналина, выбор «борьба или бегство»), стадия резистентности, поддерживаемая усиленным образованием кортикостероидов, и возможный переход в стадию истощения адаптационного потенциала организма. В работах токсикологов выделяются стадии первичной декомпенсации, адаптации, компенсации или вторичной декомпенсации соответственно наблюдаемым в хроническом эксперименте волнообразным зависимостям «время-эффект» [2, 3].

В стандартные токсикологические протоколы определение содержания в крови биогенных аминов и кортикостероидов не входит [4]. Общестрессорная реакция организма оценивается обычно по весу надпочечников и тимуса, иногда по разработанному Л.Х. Гаркави методу анализа лейкоцитарной формулы [5]. По-видимому, это объясняется большой трудоёмкостью классических методов определения биогенных аминов и кортикостероидов, основанных на тонкослойной, колоночной или высокоэффективной хроматографии после предобработки проб сыворотки жидкостной или твердофазной экстракцией [6–8].

За последние годы в связи с широким распространением иммуноферментного анализа (ИФА) этим методам появилась альтернатива в виде возможности использовать в опытах на животных клинические тест-наборы для определения низкомолекулярных гормонов, в том числе гормона коры надпочечников кортизола. В отличие от

аналогичных тест-наборов для определения пептидных гормонов и других белков они не имеют видовой специфичности, сочетают высокую пропускную способность с бюджетной стоимостью и успешно использовались в ряде модельных эколого-токсикологических исследований [9–12]. С методической точки зрения, определение кортизола с помощью ИФА легко встраивается в любой токсикологический протокол как один из показателей адаптивного ответа организма. Тем не менее необходимо провести предварительные исследования, направленные на изучение информативности этого показателя и его места в общей совокупности биохимических методов оценки состояния организма подопытных животных.

Целью данного исследования является анализ взаимосвязи между содержанием в крови кортизола и стандартными биохимическими маркерами повреждения организма в подостром эксперименте по оценке токсичности электролизной пыли при её интратрахеальном введении крысам Wistar в разных дозах и при разной кратности введения.

Электролизная пыль (ЭП) попадает в атмосферный воздух как один из компонентов выбросов предприятий по производству алюминия [13] и существенно отличается от обычной городской пыли высоким содержанием смолистых веществ (СВ), нерастворимых фторидов и глинозёма. СВ обладают раздражающим, аллергенным и канцерогенным действием. Они образуются в процессе электролиза исходного сырья как продукт возгонки каменноугольного пека – компонента самообжигающихся анодов. При нагревании выше 120 °С каменноугольный пек переходит в жидкотекучее состояние с интенсивным выделением ПАУ, в том числе 3-, 4-бензпирена (БП), в виде фракции СВ [14].

Материал и методы

Эксперимент проводился на самцах крыс линии Wistar с исходной массой тела 250–270 г (по 6 животных в каждой группе). Крысы содержались при естественном освещении в условиях свободного доступа к гранулированному корму и питьевой воде.

Для интратрахеального введения использовался образец ЭП с массовой долей СВ 6,9% (в том числе БП 0,007%),

Содержание кортизола и биохимические показатели повреждения организма в сыворотке крови крыс Wistar при интратрахеальном введении животным электролизной пыли (ЭП) в разных концентрациях

| Концентрация ЭП в пересчете на массу СВ, мг/м ³ | Кортизол, нмоль/л | Интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции сыворотки, lg имп./мин | Активность каталазы, мКат/л | Активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, нмоль/мин/л | Активность кислой дезоксирибонуклеазы, мкмоль/мин/мл | Активность γ-глутамилтрансферазы, мкмоль/мин/л | Ацетилэстеразная активность, мкмоль/мин/мл |
|--|---|--|--|--|--|--|--|
| <i>Через 2 нед после 1-го введения ЭП в разных концентрациях</i> | | | | | | | |
| Контроль | 107,1 ± 14,6 | 5,56 ± 0,09 | 7,4 ± 0,5 | 32,4 ± 0,7 | 2,30 ± 0,09 | 0,76 ± 0,08 | 3,92 ± 0,12 |
| 1 | 55,0 ± 7,5 ↓ <i>p</i> = 0,03* | 5,98 ± 0,15* ↑ <i>p</i> = 0,04* | 12,2 ± 0,8 ↑ <i>p</i> = 0,002* | 29,4 ± 1,1 <i>p</i> = 0,06 | 2,55 ± 0,16 <i>p</i> = 0,31 | 0,69 ± 0,19 <i>p</i> = 0,82 | 4,08 ± 0,08 <i>p</i> = 0,39 |
| 5,2 | 48,4 ± 7,9 ↓ <i>p</i> = 0,004* | 6,43 ± 0,32 <i>p</i> = 0,09 | 16,2 ± 2,5 ↑ <i>p</i> = 0,026* | 26,8 ± 1,0 ↓ <i>p</i> = 0,009* | 2,48 ± 0,10 <i>p</i> = 0,18 | 1,04 ± 0,18 <i>p</i> = 0,13 | 4,05 ± 0,09 <i>p</i> = 0,48 |
| 25,1 | 51,5 ± 10,8 ↓ <i>p</i> = 0,03* | 5,93 ± 0,27 <i>p</i> = 0,59 | 12,3 ± 1,2 ↑ <i>p</i> = 0,004* | 26,6 ± 1,9 ↓ <i>p</i> = 0,04* | 2,67 ± 0,12 ↑ <i>p</i> = 0,05* | 0,78 ± 0,11 <i>p</i> = 0,70 | 3,97 ± 0,20 <i>p</i> = 0,49 |
| <i>Через 2 нед после 2-го введения ЭП в разных концентрациях</i> | | | | | | | |
| Контроль | 39,8 ± 3,2 | 6,04 ± 0,07 | 10,8 ± 0,7 | 31,5 ± 0,7 | 2,33 ± 0,09 | 0,50 ± 0,10 | 3,79 ± 0,09 |
| 1 | 36,9 ± 4,9 <i>p</i> = 0,79 | 6,86 ± 0,25 ↑ <i>p</i> = 0,009* | 17,6 ± 0,6 ↑ <i>p</i> = 0,009* | 34,5 ± 2,0 <i>p</i> = 0,26 | 2,48 ± 0,10 <i>p</i> = 0,59 | 1,06 ± 0,28 <i>p</i> = 0,13 | 4,01 ± 0,11 <i>p</i> = 0,24 |
| 5,2 | 39,9 ± 7,5 <i>p</i> = 0,54 | 6,80 ± 0,25 ↑ <i>p</i> = 0,015* | 18,8 ± 1,1 ↑ <i>p</i> = 0,002* | 25,3 ± 1,4 ↓ <i>p</i> = 0,009* | 2,55 ± 0,09 <i>p</i> = 0,33 | 0,28 ± 0,11 <i>p</i> = 0,13 | 3,90 ± 0,21 <i>p</i> = 0,69 |
| 25,1 | 43,9 ± 16,1 <i>p</i> = 0,24 | 5,70 ± 0,18 <i>p</i> = 0,24 | 9,9 ± 0,3 <i>p</i> = 0,39 | 28,5 ± 0,6 ↓ <i>p</i> = 0,015* | 2,64 ± 0,07 ↓ <i>p</i> = 0,015* | 1,23 ± 0,25 ↑ <i>p</i> = 0,04* | 3,89 ± 0,07 <i>p</i> = 0,48 |
| <i>На 6-й день после 3-го введения ЭП в разных концентрациях</i> | | | | | | | |
| Контроль | 45,4 ± 2,6 | 6,80 ± 0,14 | 13,3 ± 0,6 | 22,3 ± 1,0 | 2,49 ± 0,06 | 0,49 ± 0,12 | 3,76 ± 0,04 |
| 1 | 79,8 ± 8,6 ↑ <i>p</i> = 0,002* | 6,61 ± 0,16 <i>p</i> = 0,40 | 16,2 ± 1,8 <i>p</i> = 0,16 | 29,3 ± 1,2 ↑ <i>p</i> = 0,002* | 2,29 ± 0,08 <i>p</i> = 0,13 | 0,58 ± 0,14 <i>p</i> = 0,63 | 3,97 ± 0,11 <i>p</i> = 0,10 |
| 5,2 | 97,1 ± 22,2 ↑ <i>p</i> = 0,025* | 6,59 ± 0,12 <i>p</i> = 0,27 | 13,0 ± 0,6 <i>p</i> = 0,70 | 24,3 ± 1,0 <i>p</i> = 0,20 | 2,30 ± 0,08 <i>p</i> = 0,09 | 0,45 ± 0,16 <i>p</i> = 0,83 | 3,88 ± 0,11 <i>p</i> = 0,30 |
| 25,1 | 67,0 ± 11,8 <i>p</i> = 0,31 | 6,66 ± 0,11 <i>p</i> = 0,45 | 13,8 ± 0,6 <i>p</i> = 0,59 | 26,4 ± 0,7 ↑ <i>p</i> = 0,007* | 2,64 ± 0,11 <i>p</i> = 0,31 | 0,27 ± 0,12 <i>p</i> = 0,22 | 3,94 ± 0,10 <i>p</i> = 0,12 |

Примечание. Данные приведены в виде средних значений ± среднеквадратичная ошибка; достоверность различий в двустороннем тесте Манна–Уитни указана по отношению к соответствующей контрольной группе.

отобранный в натуральных условиях из аэрационных фонарей электролизного цеха предприятия по производству алюминия. Введение ЭП в трахеи крыс осуществлялось под рауш-наркозом в виде взвеси в физиологическом растворе в объеме 0,3 мл в трёх дозах с 5-кратным шагом.

Дозы введенной ЭП пересчитывались на условия ингаляционного эксперимента с учётом потребляемого крысами объема воздуха (8,5 мл/мин) и соответствовали непрерывному вдыханию животными СВ в концентрациях 1; 5,2 и 25,1 мг/м³. Контрольным животным вводили физиологический раствор в том же объеме 0,3 мл.

Повторные введения ЭП осуществляли трёхкратно с промежутком между введениями один месяц. Забор венозной крови проводили в трёх временных точках – через 2 нед после 1-го введения, через 2 нед после 2-го введения и через 6 дней после 3-го введения. Сыворотку крови получали естественным свёртыванием без применения активаторов и хранили при температуре –24 °С.

Содержание кортизола в пробах сыворотки крови определяли конкурентным иммуоферментным анализом с помощью тест-наборов «Кортизол-ИФА-БЕСТ» производства ЗАО «Вектор-Бест» (кат. № X-3964). В качестве стандартных биохимических показателей повреждения

организма в пробах сыворотки крови крыс определяли показатели окислительного стресса (интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции сыворотки и активность антиоксидантного фермента каталазы), сывороточные активности лизосомальных ферментов (N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и кислой ДНКазы) и активность ацетилэстеразы как одного из маркёров острой фазы воспаления.

Интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) сыворотки, индуцированной перекисью водорода, определяли модификацией исходной прописи Шестакова с соавт. [15] в среде инкубации, содержащей 140 мМ Na-фосфатного буфера, 1 мМ динатриевой соли ЭДТА, 50 мкМ натриевой соли люминола, 10 мкл/мл сыворотки крови и 6 мМ перекиси водорода [16]. Результаты выражали в виде десятичных логарифмов светосуммы сигнала за первую минуту после добавления перекиси водорода, так как максимумы распределения исходных значений светосумм ЛЗХЛ у людей и лабораторных животных резко сдвинуты влево [17].

Активность каталазы определяли по образованию окрашенного комплекса перекиси водорода с молибденовокислым аммонием [18], активность N-ацетил-β-

D-глюкозаминидазы (NAG) – по скорости отщепления *p*-нитрофенола от модельного субстрата 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида [19], активность кислой ДНКазы – по образованию продуктов гидролиза коммерческого препарата ДНК из тимуса телят [20], активность ацетилэстеразы – по скорости расщепления *p*-нитрофенилацетата [21].

Кроме того, учитывая наличие в ЭП значительного количества БП и других ПАУ, в пробах сыворотки крови определяли активность γ -глутамилтрансферазы (ГТТ, синоним γ -глутамилтранспептидаза) модификацией метода Зейца–Персина [22] с использованием тест-наборов «ГАММА-ГТ-НОВО» (ЗАО «Вектор-Бест»). В экспериментальном канцерогенезе увеличение сывороточной активности ГТТ рассматривается как один из маркёров предопухолевых изменений [23–25].

Достоверность межгрупповых различий показателей определяли с помощью двустороннего непараметрического теста Манна–Уитни в компьютерной программе Statistica v.6.0.

Результаты

В таблице приведены среднегрупповые значения изучавшихся биохимических показателей после 1-го, 2-го и 3-го введений ЭП в разных концентрациях с указанием достоверности различий по отношению к соответствующим контрольным группам крыс. На рис. 1 эти же данные представлены графически в виде диаграмм изменения среднегрупповых значений показателей, выраженных в процентах по отношению к контролю.

Как это следует из представленных данных, ответ организма крыс на воздействие изучаемого препарата зависел преимущественно от промежутка времени между введением ЭП и забором крови. В частности, диаграммы на рис. 1, соответствующие срокам 2 нед после 1-го введения (а) и 2 нед после 2-го введения ЭП (б), различаются по реакции коры надпочечников (а – содержание кортизола в крови снижено; б – не отличается от контроля), но сходны наличием достоверных изменений большинства использованных биохимических показателей повреждения организма – 4 из 6 и 5 из 6 этих показателей на графиках рис. 1, а, б имеют хотя бы одно достоверно отличающееся от контроля среднегрупповое значение.

Влияние кратности введения ЭП (один или два раза) сказывалось только на выраженности признаков повреждения организма крыс, причём эти различия были относительно небольшими и для каждого из показателей по отдельности могли бы рассматриваться как случайные. Однако для всей совокупности из 6 маркёров они имеют общую смысловую направленность – во второй временной точке эксперимента по сравнению с первой более выражены признаки окислительного стресса (выше интенсивность ЛЗХЛ

сыворотки и ниже активность защитного фермента каталазы); близкий к достоверному тренд «доза-эффект» для сывороточной активности ДНКазы после 1-го введения ЭП ($R = 0,383$; $N = 24$; $p = 0,071$) становится достоверным ($R = 0,518$; $N = 24$; $p = 0,011^*$); достигает границы достоверности увеличение активности ГТТ у крыс, подвергавшихся воздействию наибольшей концентрации ЭП – 25,1 мг/м³. Увеличение сывороточной активности ГТТ считается косвенным свидетельством возникновения ГТТ-положительных локусов – характерных предопухолевых очагов в тканях печени [23–25], лёгких [26], молочной железы [27] и кожи [28] лабораторных животных после введения им модельных канцерогенов. Опять же, само по себе достоверное увеличение активности ГТТ в единственной экспериментальной точке (рис. 2) выглядит недостаточно убедительным, но в комплексе с дозозависимым ростом активности ДНКазы на этот же срок эксперимента может действительно означать, что уже после двух введений ЭП в трахею крыс возникают первые признаки возможной предопухолевой трансформации тканей.

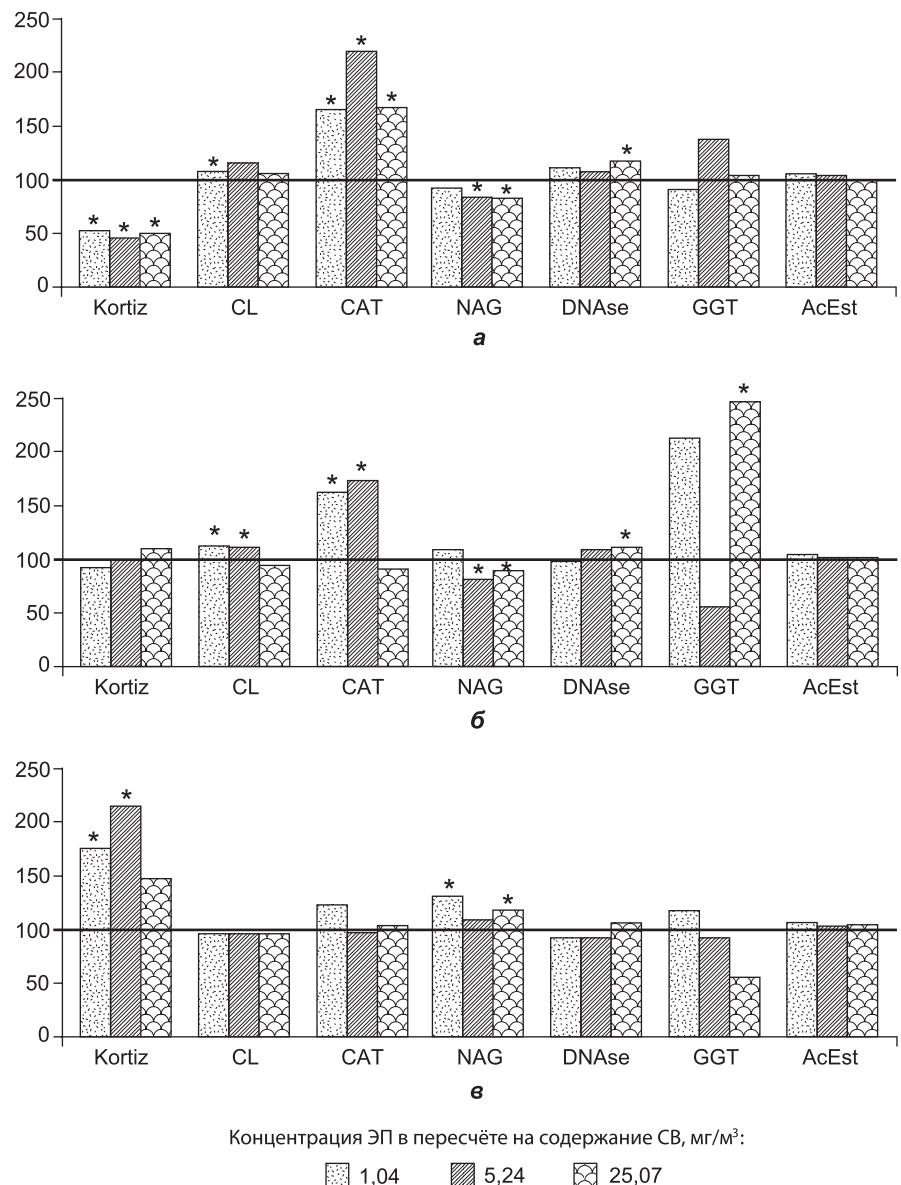


Рис. 1. Изменения средних значений биохимических показателей (в % по отношению к контролю) при 1-м (а), 2-м (б) и 3-м (в) интратрахеальных введениях крысам ЭП в концентрациях 1; 5,2 и 25,1 мг/м³ в пересчёте на содержание СВ.

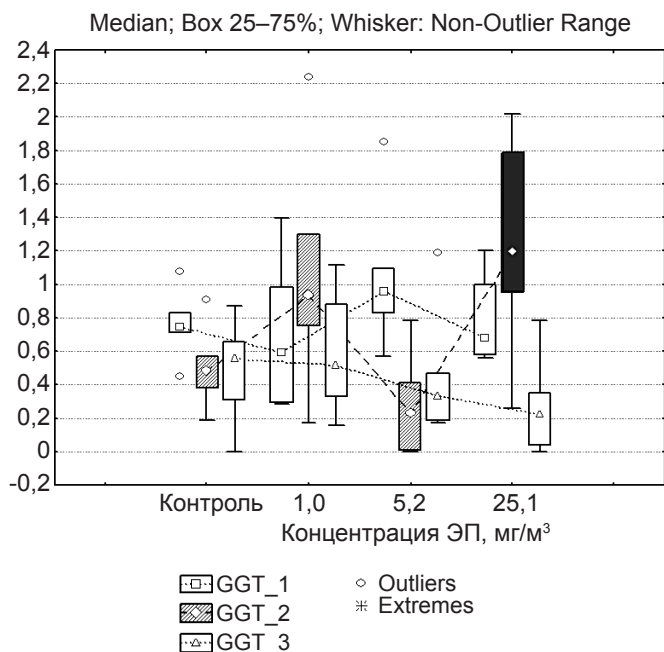


Рис. 2. Медианы и межквартильный размах сывороточной активности ГГТ при 1-м, 2-м и 3-м интратрахеальных введениях крысам ЭП в указанных концентрациях. Тёмной заливкой выделена группа крыс с достоверным отличием от соответствующего контроля.

Поскольку, как это описано выше, влияние кратности введения ЭП ограничивалось модуляцией ответа организма при том же спектре реагирующих маркёров, можно достаточно уверенно считать, что кардинальные различия между графиком на рис. 1, *в* и сходными графиками *а* и *б* объясняются различиями во времени между введением ЭП и забором крови. Через 6 дней после 3-го введения ЭП животным (см. рис. 1, *в*) на фоне увеличения содержания кортизола в крови крыс в 1,5–2 раза наблюдались достоверные изменения только одного из показателей повреждения организма – увеличение сывороточной активности лизосомального фермента NAG при концентрациях ЭП 1 и 25,1 мг/м³ на 31 и 18% соответственно.

Обсуждение

Полученные данные хорошо укладываются в существующие представления о роли «антистрессорных» гормонов коры надпочечников в регуляции ответа организма на повреждение и о двухфазном характере выделения этих гормонов в кровь. Известно, что в ранние сроки адапционного ответа организма содержание в крови кортизола и других гормонов коры надпочечников растёт, что обеспечивает синхронность и этапность в ответе отдельных органов и тканей, а также предохраняет их от чрезмерной реакции на повреждение. В частности, увеличивается артериальное давление крови, содержание в ней глюкозы, стабилизируются мембраны лизосом, сдерживается гиперреакция фагоцитов и клеток иммунной системы, снижается продукция цитокинов и эйкозаноидов, подавляется секреция гистамина. В более поздние сроки возможности этого защитного механизма истощаются, реакция гипоталамо-гипофизарной оси ослабевает, и возникает гипокортизолемиа.

В полном соответствии с этими представлениями на рис. 1 видны обе фазы ответа коры надпочечников на повреждение – ранняя на рис. 1, *в* (6 дней после введения

ЭП, уровень кортизола в крови увеличен, признаки повреждения минимальные) и более поздняя на рис. 1, *а*, *б* (2 нед после введения ЭП, уровень кортизола упал до нормы или ниже нормы, признаки повреждения выраженные). Сравнение графиков на рис. 1, *а*, *б* свидетельствует о том, что «нормального» (то есть присущего интактным животным) уровня содержания кортизола в крови в условиях ответа организма на повреждение уже не хватает для того, чтобы перестроить метаболизм тканей, сняв с них часть экспортных нагрузок и дав им возможность репарировать повреждения. К сходным выводам пришли клиницисты, вводя для отделений интенсивной терапии понятие о синдроме «Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency» (CIRCI, русскоязычный термин «кортикостероидная недостаточность, ассоциированная с тяжёлым заболеванием»), который характеризуется как неадекватное (то есть несоизмеримое с тяжестью заболевания) содержание кортикостероидов в крови пациентов с критическим состоянием [29]. При этом концентрация кортизола может находиться в границах клинической нормы или даже быть выше верхней границы диапазона нормы, но всё же оказывается недостаточной для того, чтобы справиться с уровнем стресса, вызванного болезнью.

Следует отметить нелинейность многих наблюдавшихся нами зависимостей «доза-эффект», которая, по видимому, вызвана тем, что реакция организма животных на введение ЭП в трахею протекает волнообразно, причём со скоростью, зависящей от дозы препарата, – чем выше доза, тем раньше возникает максимальная точка отклонения показателей от нормы и раньше начинается их снижение. В частности, это относится к увеличению содержания кортизола в крови через неделю после трёхкратного введения ЭП (при высокой дозе препарата уровень кортизола в крови уже прошёл через максимальную точку и начинает падать) и к адаптивному увеличению активности каталазы через 2 нед после 1- и 2-кратного введения ЭП (реакция на высокую дозу также более слабая, чем на среднюю).

Интересной деталью является также соотношение сывороточных концентраций кортизола в трёх контрольных группах животных: $107,1 \pm 14,6$ нМ (1-я экспериментальная точка); $39,8 \pm 3,2$ нМ (2-я) и $45,4 \pm 2,6$ нМ (3-я). Объяснить эти данные можно существованием 4-дневного экстрациркадного ритма содержания стероидов в крови здоровых людей и животных: 2 дня наблюдаются сходные между собой более высокие концентрации, а следующие 2 дня – сходные между собой более низкие, с перепадом концентраций между этими фазами в 1,5–2,5 раза [30, 31]. Отсюда можно предположить, что в 1-й и 2-й экспериментальных точках (рис. 1, *а*, *б*) мы видим один и тот же эффект исчезновения экстрациркадного ритма выброса кортизола надпочечниками при всех дозах ЭП, включая минимальную, который в 1-й точке выглядит как резкий скачок сывороточного содержания кортизола вниз при минимальной дозе ЭП, без существенного влияния её увеличения, а во 2-й – как отсутствие различий в содержании кортизола и по сравнению с контролем, и в зависимости от дозы ЭП. В нашем эксперименте этот эффект гормональной дисрегуляции транзитный, поскольку через 6 дней после 3-го введения реакция коры надпочечников явно зависит от дозы ЭП (рис. 1, *в*).

С точки зрения интересов практической токсикологии полученные нами данные свидетельствуют о том, что слабая или даже отсутствующая реакция биохимических маркёров повреждения на фоне резкого увеличения содержания в крови кортизола (рис. 1, *в*) позволяет прогнозировать появление этих маркёров в более поздние сроки.

Заклучение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что между сывороточными концентрациями кортизола и стандартными биохимическими маркерами повреждения организма при введении крысам ЭП в разных дозах и при разной кратности введения существует явная связь, но тем не менее встречается много нюансов, которые можно объяснить только предположительно. Для того чтобы построить непрерывную модель участия кортикостероидов в процессах повреждения и адаптации организма к воздействию токсичных веществ, реконструировав её из отдельных дозовых и временных точек, нужны дополнительные исследования.

Литература

(пп. 6, 8–10, 19, 22–28 см. References)

1. Селье Г. *Стресс без дистресса*. М.: Прогресс; 1982. 126 с.
2. Саноцкий И.В. Некоторые аспекты проблемы адаптации в возрастной токсикологии. *Гигиена и санитария*. 1971; 5: 87–90.
3. Жолдакова З.И., Синицына О.О. Закономерности развития токсического процесса в зависимости от стадий дезорганизации и адаптации. *Гигиена и санитария*. 2014; 5: 112–6.
4. Руководство Р 1.2.3156-13. Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии; 2014. 639 с.
5. Жукова Т.В., Белик С.Н., Свинтуховский О.А., Харагургиева И.М., Кононенко Н.А. Использование общих неспецифических адаптационных реакций организма для гигиенического нормирования химических соединений. *Paradigmata Poznani*. 2016; 4: 150–4.
7. Наконечная С.А. Характер нейромедиаторного ответа в организме животных на воздействие ксенобиотиков бытового назначения. *Вісник української медичної стоматологічної академії*. 2016; 16 (1): 230–3.
11. Новочадов В.В., Калашникова С.А., Полякова Л.В., Денисов А.А., Горячев А.Н. Гормональный статус крыс с хронической эндогенной интоксикацией. *Фундаментальные исследования*. 2006; 5: 76.
12. Калашникова С.А., Полякова Л.В., Кузнецов И.М., Новочадов В.В. Гормональный дисбаланс и хроническая эндогенная интоксикация при дисметаболической нефропатии у крыс. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2007; 1: 16–8.
13. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Кольдибекова Ю.В., Жданова-Заплевичко И.Г., Пережогин А.Н., Клейн С.В. Оценка аэрогенного воздействия приоритетных химических факторов на здоровье детского населения в зоне влияния предприятий по производству алюминия. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(1): 68–75.
14. Борисоглебский Ю.В., Галевский Г.В., Кулагин Н.М., Минцис М.Я., Сиразутдинов Г.А. *Металлургия алюминия*. Новосибирск: Наука; 1999. 438 с.
15. Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. Хемилуминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода. *Вопросы медицинской химии*. 1979; 2: 132–7.
16. Князева Т.Д. Влияние загрязнения атмосферного воздуха химическими соединениями на показатели оксидантного статуса у жителей Москвы: дис. ... канд. биол. наук. М., 2007: 71–3.
17. Хрипач Л.В. Применение свободнорадикальных методов для оценки влияния полихлорированных диоксинов и фуранов на состояние здоровья населения. *Гигиена и санитария*. 2002; 2: 72–6.
18. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16–9.
20. Покровский А.А., Арчаков А.И., Любимцева О.Н. Особенности солубилизации ферментов лизосом и саркоплазматической сети сердца крыс. *Биохимия*. 1967; 32 (4): 824–7.
21. Методические указания к оценке биохимических, морфологических, иммунологических и физиологических показателей ранних изменений функциональных реакций человека при воздействии факторов окружающей среды (под ред. Г.И. Сидоренко и Р.В. Меркурьевой). М.–Пермь; 1986. 138 с.
29. Мальцева Л.А., Мосенцев Н.Ф., Лисничая В.Н., Левчук А.А. Кортикостероидная недостаточность при критических состояниях у взрослых пациентов. *Медицина неотложных состояний*. 2018; 91(4): 45–50.
30. Диатроптов М.Е. Многодневные ритмические изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, уровня интерлейкина-2 и кортизола в периферической крови здоровых доноров. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 152 (11): 564–7.
31. Диатроптов М.Е., Диатроптова М.А., Кондашевская М.В. Анализ показателей инфрадианных ритмов стероидных гормонов и про-

центного содержания нейтрофилов периферической крови у крыс-самцов Вистар. *Фундаментальные исследования*. 2012; 9: 273–7.

References

1. Selye H. *Stress without distress*. M.: Progress; 1982. 126 p. (in Russian)
2. Sanotskij I.V. Some aspects of adaptation problems in age toxicology. *Gigiena i sanitarija [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 1971; 5: 87–90. (in Russian)
3. Zholdakova Z.I., Sinitsina O.O. Regularities in the development of the toxic process in dependence on the stages of disorganization and adaptation *Gigiena i sanitarija [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2014; 5: 112–6. (in Russian)
4. Guidance P 1.2.3156-13. Evaluation of the toxicity and hazard of chemicals and their mixtures for human health. M.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology; 2014 639 p. (In Russian).
5. Zhukova T.V., Belik S.N., Svinukhovskiy O.A., Kharagurgieva I.M., Kononenko N.A. The use of general nonspecific adaptive reactions of the organism for the hygienic rating of chemical compounds. *Paradigmata Poznani*. 2016; 4: 150–4. (in Russian)
6. Al Sharef O., Feely J., Kavanagh P.V., Scott K.R., Sharma S.C. An HPLC method for the determination of the free cortisol/cortisone ratio in human urine. *Biomed. Chromatogr*. 2007; 21(11): 1201-1206.
7. Nakonechnaya S.A. The nature of neurotransmitter response in the organism of animals onto administration of household xenobiotics. *Vіsnik ukraїnskoy medichnoy stomatologichnoy akademii*. 2016; 16 (1): 230–3. (in Russian)
8. Rastgar S., Movahedinia A., Savari A., Zanos H., Rasoli M., Ardeshir R.A. Changes in the pituitary and hypothalamus monoaminergic neurotransmitters after acute and prolonged stress exposure to benzo(a)pyrene in *Acanthopagrus latus*. *S.M. J. Environ. Toxicol*. 2015; 1(1): 1003-1006. (doi: 10.13140/RG.2.1.1924.8724)
9. Gesto M., Soengas J.L., Miguez J.M. Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, β -naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. *Aquatic Toxicology*. 2008; 86: 341–351.
10. Tintos A., Gesto M., Miguez J.M., Soengas J.L. beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 2008; 69(2): 180-186.
11. Novochadov V.V., Kalashnikova S.A., Polyakova L.V., Denisov A.A., Goryachev A.N. Hormonal status of rats with chronic endogenous intoxication. *Fundamental'nye issledovaniya* 2006; 5: 76. (in Russian).
12. Kalashnikova S.A., Polyakova L.V., Kuznetsov I.M., Novochadov V.V. Hormonal imbalance and chronic endogenous intoxication in dysmetabolic nephropathy in rats. *Volgogradskij nauchno-meditsinskij zhurnal*. 2007; 1: 16–8. (in Russian)
13. Zaitseva N.V., Zemlianova M.A., Koldibekova Yu.V., Zhdanova-Zaplevichko I.G., Perezhogin A.N., Kleyn S.V. Evaluation of the aerogenic impact of priority chemical factors on the health of the child population in the zone of the exposure of aluminum enterprises. *Gigiena i sanitarija [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2019; 98(1): 68–75. (in Russian)
14. Borisoglebskij Yu.V., Galevskij G.V., Kulagin N.M., Mintsis M.Ya., Sira-zutdinov G.A. Aluminum metallurgy. Novosibirsk: Nauka; 1999. 438 p. (in Russian)
15. Shestakov V.A., Bojchevskaya N.O., Sherstnev M.P. Blood plasma chemiluminescence induced by hydrogen peroxide. *Voprosy Med. Himii*. 1979; 2: 132–7. (in Russian)
16. Knyazeva T.D. The effect of atmospheric air pollution by chemical compounds on indicators of oxidative status in Moscow residents: Diss. Moscow; 2007. 20 p. (in Russian)
17. Khripach L.V. The use of free radical methods to assess the effect of polychlorinated dioxins and furans on the health status of the population. *Gigiena i sanitarija [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2002; 2: 72–6. (in Russian)
18. Koroljuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for the determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16–9. (in Russian)
19. Punithavathi V.R., Prince P.S. Pretreatment with a combination of quercetin and α -tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sciences*. 2010; 86: 178-184.
20. Pokrovskij A.A., Archakov A.I., Lubimtseva O.N. Peculiarities of solubilization of lysosome enzymes and the sarcoplasmic reticulum of rat heart. *Biohimija*. 1967; 32 (4): 824–7. (in Russian)
21. Guidelines for the evaluation of biochemical, morphological, immunological and physiological indicators of early changes in human functional reactions under exposure to environmental factors (eds. G.I. Sidorenko, R.V. Merkurjeva). М.–Perm'; 1986. 138 p. (in Russian)
22. Szasz G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem*. 1969; 15: 124-136.

23. Denda A., Tsutsumi M., Tsujiuchi T., Eimoto H., Konishi Y., Sato S. Induction of rat liver gamma-glutamyltranspeptidase-positive foci by oral administration of 1-nitropyrene. *Cancer Lett.* 1989; 45(1): 21-26.
24. Yao D., Dong Z., Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobil. & Pancreat. Dis. Internat.* 2007; 6(3): 241-247.
25. Zhou L., Liu J., Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(8): 1175-1181.
26. Kamaraj S., Vinodhkumar R., Anandakumar P., Jagan S., Ramakrishnan G., Devaki T. The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a)pyrene. *Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30(12): 2268-2273.
27. Sankar R.R., Roy S., Samanta S., Maitra D., Chatterjee M. Protective role of vanadium on the early process of rat mammary carcinogenesis by influencing expression of metallothionein, GGT-positive foci and DNA fragmentation. *Cell. Biochem. Funct.* 2005; 23(6): 447-456.
28. Shukla Y., Singh A., Srivastava B. Inhibition of carcinogen-induced activity of gamma-glutamyl transpeptidase by certain dietary constituents in mouse skin. *Biomed. Environ. Sci.* 1999; 12(2): 110-115.
29. Maltseva L.O., Mosentsev M.F., Lisnycha V.M., Levchuk A.O. Corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients. *Meditsina neotlozhnyh sostoyanij.* 2018; 91(4): 45-50. (in Russian)
30. Diatropov M.E. Multi-day rhythmic changes in lymphocytes subpopulations, levels of interleukin-2 and cortisol in the peripheral blood of healthy donors. *Bulleten' of experimental'noj biologii i meditsiny.* 2011; 152 (11): 564-7. (in Russian)
31. Diatropov M.E., Diatropova M.A., Kondashevskaja M.V. Analysis of indicators of infradian rhythms of steroid hormones and the percentage of peripheral blood neutrophils in Wistar rats. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2012; 9: 273-7. (in Russian)