

BOGDAN MODZELEWSKI, PAWEŁ CZARNECKI

Wpływ Dexavenu na aktywność bariery antyoksydacyjnej ustroju w doświadczalnym zapaleniu otrzewnej*

The Influence of Dexaven on the Antioxidative Barrier in Experimental Peritonitis

Klinika Chirurgii Ogólnej UM w Łodzi

Streszczenie

Wprowadzenie. W mechanizmach obronnych ustroju, przed destrukcyjnym wpływem wolnych rodników tlenu w posocznicy, istotną rolę pełni bariera antyoksydacyjna. Szczególnie ważną rolę odgrywają w niej dysmutaza nadtlenkowa (SOD) i peroksydaza glutationowa (GPx).

Cel pracy. Zbadanie wpływu steroidów i czasu ich podania na aktywność SOD i GPx w doświadczalnym zapaleniu otrzewnej.

Materiał i metody. Do badań użyto 90 dorosłych szczurów, u których wywołano rozlane zapalenie otrzewnej przez przewiązanie i nakłucie przeciwkrezkowego brzegu kątnicy (CLP). Do grupy pierwszej (I) należało 30 szczurów, które nie otrzymywały leku. W grupie II (30 szczurów) podano Dexaven na 2 godziny przed CLP, a w grupie III w 8 godzin po CLP. W osoczu zwierząt oznaczano przez 3 doby aktywność SOD i GPx.

Wyniki. Odsetek zgonów w grupie II był istotnie statystycznie niższy niż w grupach I i III. Aktywność SOD znacząco obniżyła się w grupie I (1887,9–1562,6 U/gHb) i w grupie III (1874,7–1689,8 U/gHb). W grupie II utrzymywała się na niezmienionym poziomie, by wzrosnąć do 2412,7 U/gHb w końcu obserwacji. Aktywność GPx w grupie I obniżyła się 26,55–22,23 U/gHb, w grupie III 26,98–23,62 U/gHb. Aktywność GPx w grupie II wzrosła 27,33–29,87 U/gHb.

Wnioski. 1. Aktywność SOD i GPx u zwierząt doświadczalnych istotnie statystycznie obniża się w miarę rozwoju zapalenia otrzewnej. 2. Podanie steroidów we wczesnej fazie ciężkiego zapalenia działa korzystnie i zmniejsza odsetek zgonów zwierząt doświadczalnych. 3. Badanie aktywności enzymatycznych czynników antyoksydacyjnych może służyć monitorowaniu aktywności procesu zapalnego (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 1, 11–15).

Słowa kluczowe: bariera antyoksydacyjna, dysmutaza nadtlenkowa, peroksydaza glutationowa.

Abstract

Background. The key role in system defense against destructive influence of oxygen free radicals is played by the anti-oxidative barrier, especially superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx).

Objectives. The aim of this study was to investigate the influence of steroids and the time of administration on SOD and GPx serum activities in experimental peritonitis.

Material and Methods. Ninety adult rats were used in this study, in which diffuse peritonitis was elicited by means of cecal ligation and puncture (CLP). Group 1 consisted of 30 non-medicated rats. In Group 2 rats, dexaven was administered 2 hours before CLP, and in Group 3 rats – 8 hours before CLP. Animal serum activity of SOD and GPx was measured.

Results. Group 2 mortality rate was significantly lower than in Groups 1 and 3. The SOD activity decreased significantly in Group 1 animals (1887.9–1562.6 U/gHb), and in Group 3 (1874.7–1689.8 U/gHb). In Group 2 its level remained constant increasing to 2412.7 U/gHb at the very end of observation period. Group 1 GPx activity decreased (26.55–22.23 U/gHb), and in Group 3 it also decreased (26.98–23.62 U/gHb). Group 2 GPx activity increased (27.33–29.87 U/gHb).

* Praca finansowana z tematu własnego UM nr 502-11-007.

Conclusions. 1. SOD and GPx activities significantly decreased in the course of diffuse peritonitis in study animals. 2. Steroid administration at the early phase of severe diffuse peritonitis showed a favorable effect coexistent with study animal mortality rate limitation. 3. The assessment of anti-oxidant serum activity may serve as an inflammation monitoring tool (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 1, 11–15).

Key words: antioxidative barrier, superoxide dismutase, glutathione peroxidase.

Kliniczny przebieg rozlanego zapalenia otrzewnej (r.z.o.) w dużym stopniu jest warunkowany oksydacyjną aktywnością wolnych rodników tlenu (WRT) [1–4]. Mechanizmem obronnym ustroju przed destrukcyjnym oddziaływaniem czynników peroksydacji jest bariera antyoksydacyjna ustroju [5–7]. Bariere tę w głównej mierze tworzą dysmutaza nadtlenkowa (SOD) i peroksydaza glutationowa (GPx) [7]. Celem pracy jest zbadanie wpływu steroidów i czasu ich podania na aktywność SOD i GPx w doświadczalnym zapaleniu otrzewnej. Przedstawiana praca jest kontynuacją wcześniejszych, własnych dociekań nad rolą glikokortykoidów w stanach septycznych [8].

Material i metody

Do badań użyto 90 dorosłych szczurów chowu wsobnego, samców, szczepu Wistar, u których wywołano rozlane zapalenie otrzewnej (r.z.o.) przez przewiązanie i nakłucie przeciwkrezkowego brzoгу kątnicy (CLP – *cecal ligation and puncture*). Zabieg wykonano w dootrzewnowym znieczuleniu heksobarbitalem, w dawce 50 mg/kg m.c. [9, 10]. Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Grupę I stanowiło 30 szczurów z r.z.o., które nie otrzymywały leku. Pozostałe zwierzęta zróżnicowano w zależności od czasu podania *dexamethasone phosphate sodium* (Dexavenu – Jelfa) w dawce 100 mg/kg m.c. Do grupy II należało 30 szczurów, którym podano Dexaven na 2 godziny przed CLP. W grupie III było 30 szczurów, które otrzymały podobną dawkę leku w 8 godzin po CLP. Czas podania leków wynikał z wcześniejszych doświadczeń. Zwierzęta pozostawały w obserwacji przez 3 doby. W osoczu zwierząt oznaczano aktywność SOD i GPx. Krew do badań pobierano w ilości 15 µl ze splotu naczyniowego w worku żłowym zwierzęcia w odstępach 6-, 12-, 24-, 48- i 72-godzinnych od operacji bądź do śmierci szczura. Aktywność SOD określano na podstawie reakcji utleniania ortodianizydyny metodą Martina [11], a aktywność GPx spektrofotometrycznie metodą Rice-Evansa przy zalecanej długości fali [11].

Szczury, które padły bądź przeżyły 3 doby doświadczenia były usypiane i poddawane sekcji. Autopsja miała na celu potwierdzenie istnienia r.z.o. Eksperyment otrzymał aprobatę Komisji

Etyki i Nadzoru Nad Badaniami na Ludziach i Zwierzętach Akademii Medycznej w Łodzi (nr 3/181/98).

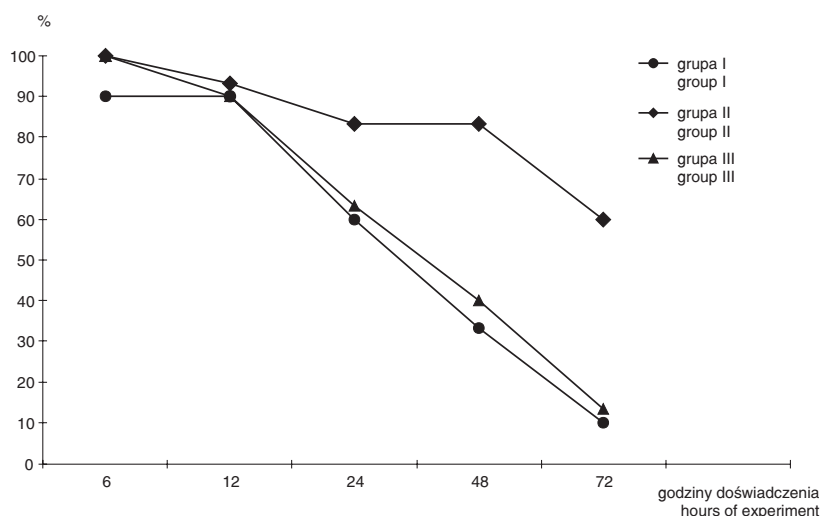
W celu statystycznego opracowania danych określono wartości średnie w grupie, odchylenie standardowe i przedział ufności dla wartości oczekiwanej. Do badań wykorzystano test *t*-Studenta, test Snedecora i test różnic znamienych przy założeniu $p < 0,05$.

Wyniki

Wyniki badań przedstawiono na rycinie i w tabelach 1–2. Liczba zwierząt, które przeżyły w poszczególnych grupach zmniejszała się w kolejnych godzinach doświadczenia. Do 12. godziny nie obserwowano istotnych statystycznie różnic między grupami w liczbie padłych zwierząt. W 24. godzinie stwierdzono znamienność różnic między grupą pierwszą a drugą ($p = 0,018$) oraz drugą a trzecią. ($p = 0,022$). W 72. godzinie obserwacji różnice te stały się bardziej istotne między grupą I a II ($p = 0,0023$) oraz II a III ($p = 0,0022$). Różnice między grupą I a III były nieistotne statystycznie ($p > 0,05$) we wszystkich przedziałach czasowych.

W toku obserwacji aktywność SOD w grupie I, w odniesieniu do wartości wyjściowych, znamienne obniżyła się w 48. godzinie badania ($p = 0,032$). Aktywność SOD w grupie II utrzymywała się na niezmiennym poziomie do 24. godziny obserwacji ($p > 0,05$), by w 48. godzinie wzrosnąć istotnie statystycznie ($p < 0,033$) w odniesieniu do wartości wyjściowych, a w ostatnim badaniu różnice osiągnęły wysoką znamienność ($p = 0,0021$). W grupie III aktywność SOD była podobna do badań uwidocznionych w grupie I. Różnice istotne statystycznie między badaniami w grupie I i III stwierdzono dopiero w 72. godzinie obserwacji przy $p = 0,021$. Różnice między grupą I a II były istotne od 24. godziny obserwacji ($p = 0,0067$) i wzrosły do wysoce znamienych w ostatnim przedziale czasowym ($p = 0,0023$). Istotne statystycznie były również różnice między grupą II a III (w 72. godzinie $p = 0,0012$).

W czasie obserwacji aktywność GPx w osoczu w grupie I obniżyła się znamienne w 12. godzinie doświadczenia ($p = 0,023$), a po 72 godzinach różnice były istotne statystycznie ($p < 0,0031$).



Ryc. 1. Odsetek zwierząt, które przeżyły kolejne doby doświadczenia w poszczególnych grupach

Fig. 1. Percentage (%) of animals that survived subsequent experiment days with regard to the group number

Tabela 1. Zmiany aktywności dysmutazy nadtlenkowej (SOD) w U/gHb w grupach zwierząt

Table 1. Changes of superoxide dismutase serum activity (U/g Hb) in animals groups

Czas badania – godz. (Time – hrs)	Grupa I (Group I)			Grupa II (Group II)			Grupa III (Group III)		
	wartość średnia x (mean)	odchylenie standardowe (standard deviation) ±	przedział ufności od-do (range)	wartość średnia x (mean)	odchylenie standardowe (standard deviation) ±	przedział ufności od-do (range)	wartość średnia x (mean)	odchylenie standardowe (standard deviation) ±	przedział ufności od-do (range)
6	1887,9	54,7	1532,1–1998,2	1933,2	49,9	1698,9–2212,8	1874,7	59,9	1432,8–1922,8
12	1804,7	65,7	1499,9–1876,9	1987,9	71,8	1722,8–2311,8	1811,7	58,6	1329,9–2101,2
24	1755,1	68,9	1511,8–1898,9	1921,3	69,8	1801,1–2189,9	1801,8	62,1	1421,8–1991,8
48	1606,6	71,1	1477,8–1765,7	2261,8	65,8	1879,2–2453,8	1719,9	69,1	1498,9–1801,9
72	1562,6	59,8	1222,8–1689,9	2412,7	66,9	1877,1–2512,7	1689,8	66,8	1512,8–1876,9

Tabela 2. Zmiany aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) U/gHb w grupach zwierząt

Table 2. Changes of glutathione peroxidase serum activity (U/g Hb) in animals groups

Czas badania – godz. (Time – hrs)	Grupa I (Group I)			Grupa II (Group II)			Grupa III (Group III)		
	wartość średnia x (mean)	odchylenie standardowe (standard deviation) ±	przedział ufności od-do (range)	wartość średnia x (mean)	odchylenie standardowe (standard deviation) ±	przedział ufności od-do (range)	wartość średnia x (mean)	odchylenie standardowe (standard deviation) ±	przedział ufności od-do (range)
6	26,55	6,22	22,1–27,8	27,33	8,11	23,6–29,8	26,98	5,62	21,9–28,3
12	25,12	5,02	21,8–26,8	27,99	5,82	24,6–30,1	27,11	7,32	25,1–29,2
24	24,78	5,11	22,1–29,8	27,32	7,43	24,9–31,1	26,11	6,75	22,2–27,1
48	23,21	5,82	20,3–29,1	28,11	6,91	25,8–32,3	24,73	8,11	21,7–28,1
72	22,23	3,99	20,5–28,2	29,87	5,39	27,9–32,9	23,62	6,32	20,2–25,8

W grupie II aktywność ta utrzymywała się na niezmiennym statystycznie poziomie do badania w 24. godzinie. Cechy istotności różnic w odniesieniu do wartości wyjściowych odnotowano w 48. godzinie obserwacji przy $p = 0,034$ i w ba-

daniu po 72 godzinach ($p = 0,014$). W grupie III spadek aktywności był znamieny w badaniu po 48 godzinach ($p = 0,034$). Różnice między grupą I a II były znamienne od 12. godziny badania ($p = 0,032$) do wysoce znamienych w 72. godzi-

nie obserwacji przy $p = 0,0023$. Podobne zależności odnotowano porównując aktywność GPx między grupami II a III. Różnice aktywności GPx wśród zwierząt z grupy I i III były nieistotne we wszystkich przedziałach czasowych ($p > 0,05$).

Omówienie

Wcześniejsze operacje pozorowane (SHAM *operations*) wykazały brak istotnego wpływu znieczulenia i otwarcia jamy otrzewnej na aktywność oznaczanych enzymów [8]. W przedstawionych badaniach udokumentowano wyraźne różnice w grupach zwierząt dotyczące liczby zgonów oraz odmienną dynamikę zmian oznaczanych markerów w zależności od czasu podania leku. Najniższy odsetek zgonów był wśród szczurów, które otrzymały Dexaven przed wywołaniem r.z.o. Najwyższą śmiertelność stwierdzono wśród zwierząt, którym nie podano Dexavenu. Częstość zgonów w grupie zwierząt otrzymującej Dexaven w okresie rozwiniętych objawów zakażenia nie odbiegała istotnie od grupy porównawczej.

Wielu autorów uważa, że zahamowanie nie-swoistej reakcji zapalnej, przebiegającej z wytłumieniem odpowiedzi odpornościowej organizmu w rozwiniętym zespole septycznym, może przyczynić się nawet do wzrostu odsetka zgonów [12–14]. Porównując liczbę zgonów wśród szczurów w grupie I i III autor nie potwierdził tej obserwacji. Analizując przyczyny zachodzących procesów należy podkreślić, podobnie jak inni autorzy, znaczenie sekrecji ogromnych ilości WRT w rozwoju posocznicy [15–18]. Aktywność peroksydacyjna natomiast jest unieczynniana przez enzymatyczne inhibitory, które tworzą barierę antyoksydacyjną ustroju. Wśród nich SOD i GPx są uważane za pierwszą linię obrony ustroju [7]. W miarę trwania doświadczenia obserwowano obniżanie się stężeń SOD i GPx we krwi ginących zwierząt. Jest to wyraz obniżania się potencjałów antyoksydacyjnych we krwi w miarę rozwoju zakażenia i występuje zbieżnie z pogorszeniem rokowania. Wynika to stąd, że SOD jako metaloenzym katalizuje reakcje dysmutacji anionrodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu. W ten sposób inhibitory peroksydacji pośrednio

uniemożliwiają aktywowanie przez WRT kaskady niekorzystnych procesów biologicznych.

Aktywność ochronną w systemie antyoksydacyjnym, w stosunku do komórki, przed toksycznym działaniem wodorotlenku podobną do SOD ma GPx. W przedstawianej pracy aktywność zarówno GPx, jak i SOD wykazywała tendencję do narastania potencjałów antyoksydacyjnych w miarę poprawy przeżywalności zwierząt. Obniżenie aktywności GPx można wiązać z częściowym wyczerpaniem możliwości antyoksydacyjnych ustroju w czasie nasilonego procesu zapalnego lub ze zużyciem zredukowanej formy glutationu. Zmniejszona aktywność SOD i GPx, będących podstawową częścią systemu antyoksydacyjnego, może być zatem powodem braku zrównoważenia procesów wytwarzania aktywnych postaci tlenu i zdolności ustroju do ich unieczynniania, co sprzyja rozwojowi stanu zapalnego. Reaktywne formy tlenu w dużych stężeniach mogą bowiem niszczyć wiele struktur białkowych wchodzących w skład enzymów antyoksydacyjnych. Ma to szczególne znaczenie, gdy SOD jest obecna przede wszystkim w cytoplazmie, GPx natomiast występuje głównie w mitochondriach komórkowych. Zjawisko powyższe jest o tyle istotne, że autorzy podkreślają rolę czynnika jądrowego κB (NF κB) w rozwoju posocznicy, który uczestniczy w przekazywaniu sygnału do jądra komórki. [19]. Dexaven ma hamować powstawanie tego czynnika [8]. Tym można by tłumaczyć obserwowany w doświadczeniu korzystny wpływ Dexavenu podanego szczurom przed CLP i brak tego efektu w warunkach zastosowania leku w rozwiniętym zapaleniu otrzewnej.

Reasumując można przyjąć, że niedobór aktywności potencjałów antyoksydacyjnych jest przyczyną bądź objawem istnienia stanu zapalnego. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że wpływ steroidów na przebieg uogólnionej reakcji zapalnej w ciężkim zakażeniu jest złożony i nie do końca poznany. Jest to zbieżne z opiniami innych autorów [8, 20]. Przeprowadzone badania przyczyniają się do dalszego poznania patogenezы posocznicy oraz stwarzają przesłanki do rozważenia celowości stosowania antyoksydantów w terapii stanów septycznych.

Piśmiennictwo

- [1] Fujimura N, Sumita S, Aimonio M, Masuda Y, Shichinohe Y, Narimatsu E: Effect of free radical scavengers on diaphragmatic contractility in septic peritonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162 (6), 2159–2165.
- [2] Modzelewski B, Czekalski P, Markert R: Proinflammatory cytokines with free oxygen radicals in septic syndrome. *Pol Merk Lek* 1997, 2 (12), 389.
- [3] Bela P, Bahl R, Sane AS, Sawant PH, Shah VR, Mishra VV: Oxidative stress status: possible guideline for clinical management of critically ill patients. *Panminerva-Med* 2001, 43 (1), 27–312.

- [4] **Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H:** Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2003, 31 (4), 1048–1052.
- [5] **Kong CW, Tsai K, Chin JH, Chan WL, Hong CY:** Magnolol attenuates peroxidative damage and improves survival of rats with sepsis. *Shock*. 2000, 13 (1), 24–28.
- [6] **Karen SG:** Superoxide dismutase and catalase, a possible role in established pancreatitis. *Am J Surg* 1986, 151, 152–162.
- [7] **Pietras T, Nowak D, Mazerant P, Romanowska M, Leder M, Kurmanowska Z, Komos J, Musial A:** Effect of bacterial endotoxin on the activity of catalase and superoxide dismutase in selected organs of mice. *Curr Pulm* 1997, 1, 2, 101–108.
- [8] **Modzelewski B, Sarzala M, Czarnecki P:** Badania nad przydatnością glikokortykosteroidów w leczeniu doświadczonego zapalenia otrzewnej. *Pol Merk Lek* 2002, 69, 228–231.
- [9] **Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo J, Perez LF:** Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001, 33 (2), 77–79.
- [10] **Ritter C, Andrades M, Frota ML Jr Bonatto F, Pinho RA:** Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med* 2003, 29 (10), 1782–1789.
- [11] **Rice-Evans CA, Diplock AT, Simons MCR:** *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam 1981.
- [12] **Tokyay R, Kaya E, Gur ES, Tuncel P, Ozbek R, Ozturk E:** Prostaglandin synthetase inhibition reduces peritonitis-induced early liver oxidant stress. *Surg Today* 1999, 29 (1), 42–46.
- [13] **Sharma VK, Dellinger RP:** Recent developments in the treatment of sepsis. *Expert Opin Investig Drugs* 2003, 12, 2, 139–152.
- [14] **Mizobe K, Kishihara K, Ezz Din el Naggar R:** Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. *J Neuroimmunol* 1997, 73, 81–89.
- [15] **Zanotti S, Kumar A, Kumar A:** Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs* 2002, 11, 8, 1061–1075.
- [16] **Ajuebor MN, Gibbs L, Flower LJ:** Investigation of the functional role played by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in interleukin-1 induced murine peritonitis. *Br J Pharmacol* 1998, 125, 319–326.
- [17] **Mercer-Jones MA, Shrotri MS, Heinzelmann M:** Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 1999, 65, 249–255.
- [18] **Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A, Gonzalez-Reimers E, Milena A, de-la-Vega MJ, Rodriguez-Rodriguez E, Gomez-Sirvent JL:** Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine* 2001, 21, 15, 4, 232–236.
- [19] **Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC:** Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1998, 102, 1645–1652.
- [20] **Butty VL, Roux-Lombard P, Garbino J, Dayer JM, Ricou B, Network TG:** Anti-inflammatory response after infusion of p55 soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein for severe sepsis. *Eur Cytokine Netw* 2003, 14, 1, 15–19.

Adres do korespondencji:

Bogdan Modzelewski
Klinika Chirurgii Ogólnej UM
Kopcińskiego 22
90-153 Łódź

Praca wpłynęła do Redakcji: 3.10.2003 r.

Po recenzji: 26.02.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 13.10.2004 r.

Received: 3.10.2003

Revised: 26.02.2004

Accepted: 13.10.2004