

СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

С.А. Кантюков*, Л.В. Кривохижина*, Р.Р. Фархутдинов**

*Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск;

**Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

В данном исследовании изучено состояние процессов свободно-радикального окисления (СРО) в крови и гомогенате печени методом регистрации железоиндуцированной хемиллюминесценции и определением продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при остром экспериментальном токсическом поражении печени четыреххлористым углеродом. Показано, что в первые часы острого отравления возрастает интенсивность хемиллюминесценции и накапливаются продукты ПОЛ в ткани печени и крови, обусловленное снижением общей антиокислительности, появлением свободных радикалов, увеличением количества гидроперекисей липидов. Снижение показателей хемиллюминесценции в гомогенате печени к 2–3-м суткам интоксикации относительно первых часов обусловлено возрастанием скорости окисления, повреждением клеток печени, но не усилением мощности общей антиокислительной системы. Характер изменений СРО в крови и печени в динамике ее острого повреждения различен.

Ключевые слова: поражение печени, свободно-радикальное окисление, хемиллюминесценция.

Классическая модель острого токсического гепатита, индуцированная тетрахлорметаном (CCl_4), привлекает внимание исследователей разнонаправленностью действия, приводящего к нарушению многих функций печени: синтетической, дезинтоксикационной, нарушению прооксидантно-антиоксидантного равновесия, гиперпродукции провоспалительных цитокинов и других [3, 5]. В литературе указывается, что повреждение печени тетрахлорметаном обусловлено взаимодействием между ядом и цитохромом P-450 с образованием активных метаболитов CCl_4 в гепатоцитах; активацией макрофагальных клеток печени с усилением образования активных форм кислорода [3, 5, 6].

С учетом того, что симптомы интоксикации у животных при воздействии четыреххлористого углерода начинают проявляться уже в первые часы после введения, а к 6–8-му ч крысы впадали в коматозное состояние, необходимо изучение ранних этапов окислительного напряжения в организме при остром поражении печени, что и послужило целью исследования.

Методы исследования. Острое повреждение печени у крыс вызывали введением через зонд в полость желудка CCl_4 , смешанного с оливковым маслом, из расчета 0,25 мг препарата на 100 г массы тела – опытная группа. В контрольной группе крысы получали оливковое масло. Состояние процессов свободно-радикального окисления в плазме крови и ткани печени оценивали с помощью методов использованных нами ранее в работе [2]. Показатели активности ферментов аспартатамино-трансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы

(АЛТ) определяли с использованием стандартных наборов. Цитоморфологические исследования проводились на кафедре патологической анатомии Башкирского государственного медицинского университета. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistika v. 6.0 for Windows» [1, 4]. Для описания результатов использовали M-среднее значение признака, m-стандартную ошибку среднего, s-среднее квадратичное отклонение, характеристику выборки представляли в формате $M \pm m$. Для анализа нормальности распределения данных применяли критерий Шапиро–Уилка. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием параметрических (Стьюдента) и непараметрических (Манна–Уитни) критериев. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Через 3–6 ч после отравления цитоморфологические исследования выявили вакуолизацию, набухание гепатоцитов, полнокровие сосудов, а через 9–12 ч обнаруживались дистрофические изменения и участки некроза в центральных и промежуточных долях печени. В последующем у крыс развивались явления, характерные для липидной дистрофии печени. Острая интоксикация тетрахлорметаном вызывала значительное повышение амино-трансферазной активности в сыворотке крови. На 1-е и 2-е сутки после введения тетрахлорметана активность АСТ и АЛТ повысилась в 7 и в 10 раз соответственно. Через 72 ч активность АСТ и АЛТ снижалась относительно первых суток воздействия, но оставалась выше

контрольных значений. Максимальная гибель животных была на 24–36-й ч и составила 30 %.

Острое поражение печени с первого часа после введения CCl_4 сопровождается активацией свободно-радикального окисления в крови и максимальной активацией на 24-й ч – спонтанная хемиллюминесценция (СП ХЛ) возрастает более чем в 5 раз.

С первого часа поражения печени в плазме крови возрастали амплитуда быстрой вспышки (А) и светосумма свечения (S). Возрастает количество первичных продуктов ПОЛ (ДК) и вторичных продуктов ПОЛ (ТБК-активных продуктов) (табл. 1). Максимальное увеличение ДК наблюдается на 24-й ч, а максимальное увеличение ТБК АП – на 48-й ч.

Следует отметить, что в динамике развития окислительного напряжения между интенсивностью СП ХЛ и накоплением первичных и вторичных продуктов ПОЛ отсутствует зависимость. Динамика накопления гидроперекисей липидов (А) соответствует динамике накопления первичных и вторичных продуктов. Первоначально повышаются гидроперекиси липидов (А), а через 12–24 ч возрастают первичные и вторичные продукты ПОЛ (рис. 1, 2).

Кроме того, динамика накопления в плазме крови гидроперекисей липидов соответствует динамике изменений окисляемости липидов (рис. 3).

С первого часа острого повреждения печени в ней активируется СРО – возрастает СП ХЛ, амплитуда быстрой вспышки и светосумма свечения, сокращается период индукции, на 3-й ч повреждения увеличиваются ТБК-активные продукты (табл. 2), что свидетельствует о снижении мощно-

сти антиоксидантной защиты, возрастания гидроперекисей липидов, повышения окисляемости липидов.

В контрольной серии (интактная группа) имеется достоверная обратная корреляция средней силы ($r = -0,73$) между СП ХЛ и периодом индукции (ПИ – интегративный показатель мощности антиокислительной системы). Данная связь сохраняется в течение первого часа острого поражения печени.

Но далее с 3-го до 24-го ч повреждения связь между спонтанной ХЛ и ПИ не обнаруживается. На 24–48-й ч повреждения обратные взаимоотношения между ПИ и СП ХЛ восстанавливаются (рис. 4).

В контрольной серии установлена положительная достоверная связь ($r = 0,6$; $p < 0,05$) между спонтанной ХЛ и амплитудой быстрой вспышки; между спонтанной ХЛ и светосуммой свечения ($r = 0,65$; $p < 0,05$), сохраняющиеся до 1-го ч острого повреждения печени. Затем эти связи нарушаются.

Отсутствие положительных или отрицательных взаимосвязей между спонтанной ХЛ, мощностью антиокислительной системы (ПИ), наличием гидроперекисей липидов (А), окисляемостью липидов (S) может быть связано с усилением скорости окисления липидов, провоцируемое появлением свободных металлов переменной валентности. Это находит отражение в накоплении ТБК-активных продуктов, а именно, на фоне снижения амплитуды быстрой вспышки и светосуммы свечения (24–48 ч) наблюдается повышение количества ТБК-активных продуктов.

Нарушение свободно-радикального окисления в ткани печени при ее остром повреждении

Таблица 1

Изменение хемиллюминесценции плазмы крови и содержания в ней продуктов перекисного окисления липидов при отравлении CCl_4

Условия эксперимента	Свечение плазмы (отн. ед.)			ДК ед. Е/мл	ТБК-АП ед. Е/мл
	СП	А	S		
Контроль (n = 30)	0,313 ± 0,07	7,51 ± 0,54	21,4 ± 1,3	0,09 ± 0,007	0,04 ± 0,008
Отравление CCl_4 (n = 60) 1 час	0,58 ± 0,04 ***	9,72 ± 0,47 ***	27,4 ± 1,2 ***	0,17 ± 0,01 **	0,06 ± 0,003
3 часа	0,78 ± 0,06 ***	11,19 ± 0,61 ***	28,3 ± 0,9 ***	0,18 ± 0,008 ***	0,122 ± 0,005 ***
12 часов	1,08 ± 0,05 ***	12,74 ± 0,49 ***	29,7 ± 0,6 ***	0,18 ± 0,009 ***	0,13 ± 0,007 ***
24 часа	1,68 ± 0,08 ***	13,31 ± 0,45 ***	33,5 ± 1,3 ***	0,23 ± 0,006 ***	0,15 ± 0,004 ***
48 часов	1,54 ± 0,07 ***	13,48 ± 0,36 ***	32,6 ± 1,4 ***	0,23 ± 0,005 ***	0,15 ± 0,007 ***
72 часа	0,98 ± 0,05 ***	12,43 ± 0,48 ***	31,0 ± 1,1 ***	0,22 ± 0,008 ***	0,13 ± 0,008 ***

Примечания: СП – спонтанная хемиллюминесценция; А – амплитуда быстрой вспышки; S – светосумма хемиллюминесценции; ДК – диеновые конъюгаты; ТБК-АП – ТБК-активные продукты. Здесь и в табл. 2–3: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ относительно контроля.

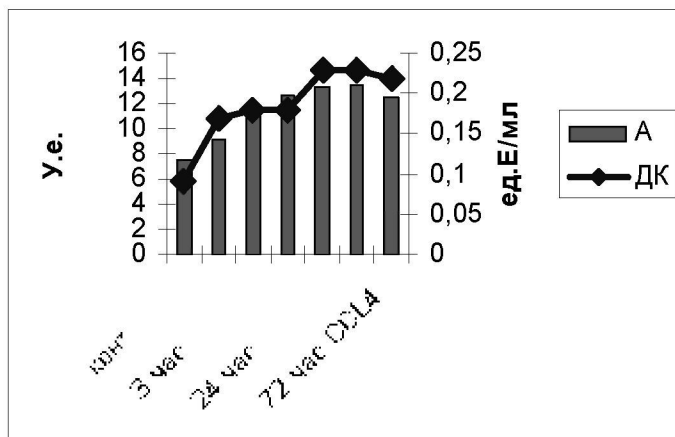


Рис. 1. Динамика изменений амплитуды быстрой вспышки (гидроперекисей липидов) и диеновых конъюгатов в плазме крови

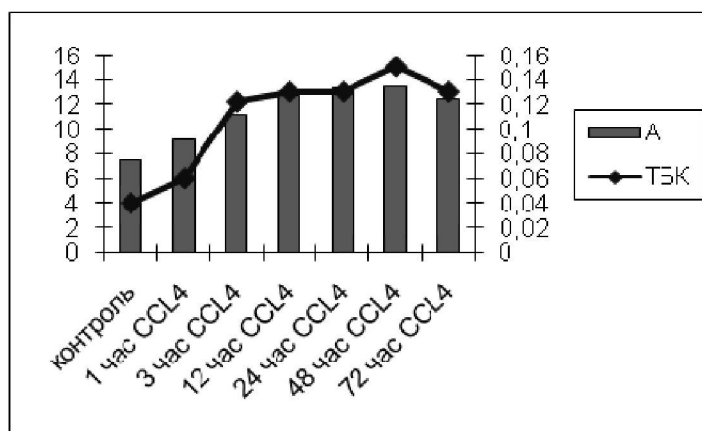


Рис. 2. Динамика изменений амплитуды быстрой вспышки (гидроперекисей липидов) и ТБК-активных продуктов в плазме крови

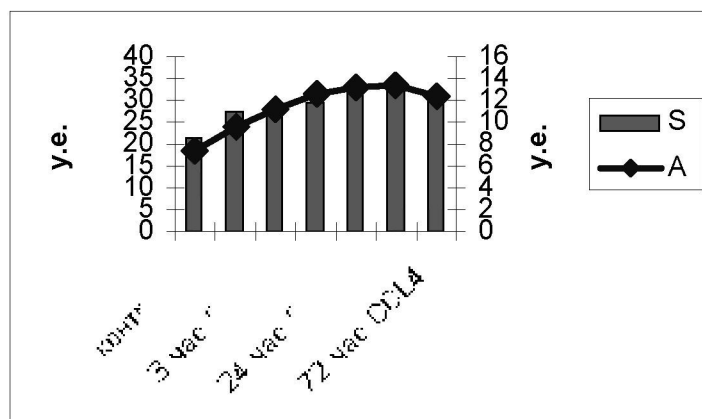


Рис. 3. Динамика изменений амплитуды быстрой вспышки и светосуммы свечения в плазме крови

демонстрирует эксперимент по накоплению вторичных продуктов ПОЛ при аэробной инкубации гомогената печени (рис. 5, 6). При повреждении печени в течение 1–3-го ч образование ТБК-активных продуктов при инкубации выше, чем в контроле. Более того, на 3-й ч повреждения образова-

ние вторичных продуктов ПОЛ ниже относительно 1-го ч повреждения.

На 12–24-й ч повреждения образование ТБК-активных продуктов одинаково и выше относительно контроля, но на 3-й ч инкубации достоверно не отличаются от значений в контрольных об-

Изменение хемилюминесценции гомогената печени и накопления ТБК активных продуктов при отравлении CCl_4

Условия эксперимента	Хемилюминесценция гомогената				ТБК-АП ед.Е/мл
	СП	A	ПИ	S	
Контроль (n = 30)	0,46 ± 0,01	7,05 ± 0,53	1,8 ± 0,2	102,6 ± 7,2	0,08 ± 0,001
Отравление CCl_4 (n = 60) 1 час	1,62 ± 0,15 ***	10,60 ± 0,6 ***	0,7 ± 0,3 *	141,4 ± 6,4 ***	0,2 ± 0,06
3 часа	1,22 ± 0,06 ***	9,90 ± 0,5 ***	0,6 ± 0,1 *	134,9 ± 5,6 ***	0,18 ± 0,01 ***
12 часов	1,02 ± 0,03 ***	10,89 ± 0,3 ***	0,7 ± 0,1 *	140,9 ± 5,2 ***	0,18 ± 0,01 ***
24 часа	1,11 ± 0,06 ***	10,76 ± 0,3 ***	0,8 ± 0,07 *	128,0 ± 7,9 *	0,21 ± 0,01 ***
48 часов	1,95 ± 0,08 ***	8,1 ± 0,25	0,6 ± 0,1 *	92,7 ± 10,2	0,21 ± 0,01 ***
72 часа	1,81 ± 0,07 ***	8,05 ± 0,2 ***	0,8 ± 0,1 *	109,4 ± 5,3	0,17 ± 0,02 ***

Примечания: СП – спонтанная хемилюминесценция; А – амплитуда быстрой вспышки; ПИ – период индукции; S – светосумма хемилюминесценции; ТБК-АП – ТБК-активные продукты.

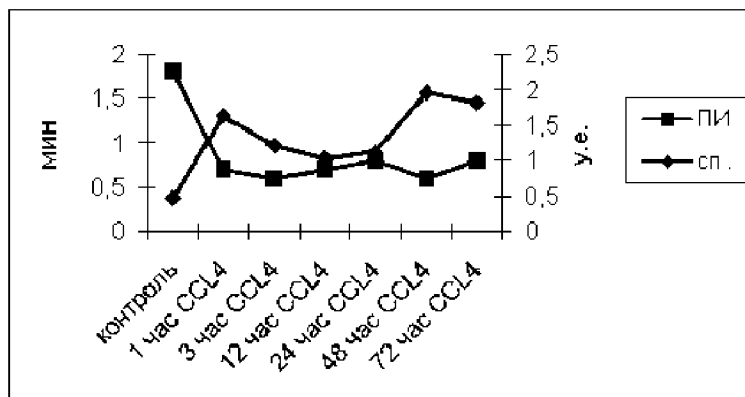


Рис. 4. Динамика изменений спонтанной ХЛ и периода индукции в гомогенате печени при остром поражении

разцах (рис. 5). На 72-й ч повреждения на 2–3-й ч инкубации снижено образование вторичных продуктов ПОЛ как относительно 48-го часа повреждения, так и относительно контроля (рис. 6). И так, с увеличением времени острого повреждения печени в ней нарушается образование вторичных продуктов ПОЛ и именно в эти сроки наиболее низкие значения параметров (А и S), характеризующих количество гидроперекисей липидов и липидов способных подвергаться окислению.

Таким образом, снижение на 48–72-м ч острого повреждения печени относительно первого часа показателей А и S, на фоне повышения СП ХЛ, вероятно, обусловлено несколькими механизмами – увеличением интенсивности окисления, уменьшением пула легкоокисляемых липидов, и возможно, повреждением молекулярных структур гепатоцитов.

Интенсивность окисления возрастает с первого часа и наибольшая – на 48-й ч повреждения. Это подтверждается соответствующим коэффициентом, рассчитываемым по соотношению: в числителе количество ТБК-АП × 100, в знаменателе сумма количественных значений хемилюминограммы (СП + А + S). Кроме того, с увеличением срока повреждения снижается способность гомогената клеток печени к образованию ТБК-активных продуктов (табл. 3.)

Важный аспект, имеющий практическое значение – насколько характер изменений СРО в крови отражает характер изменений в поврежденной печени. Следует отметить, что при общей активации СРО динамика изменений параметров хемилюминесценции в печени и крови различна и изменения в крови не идентичны изменениям в печени.

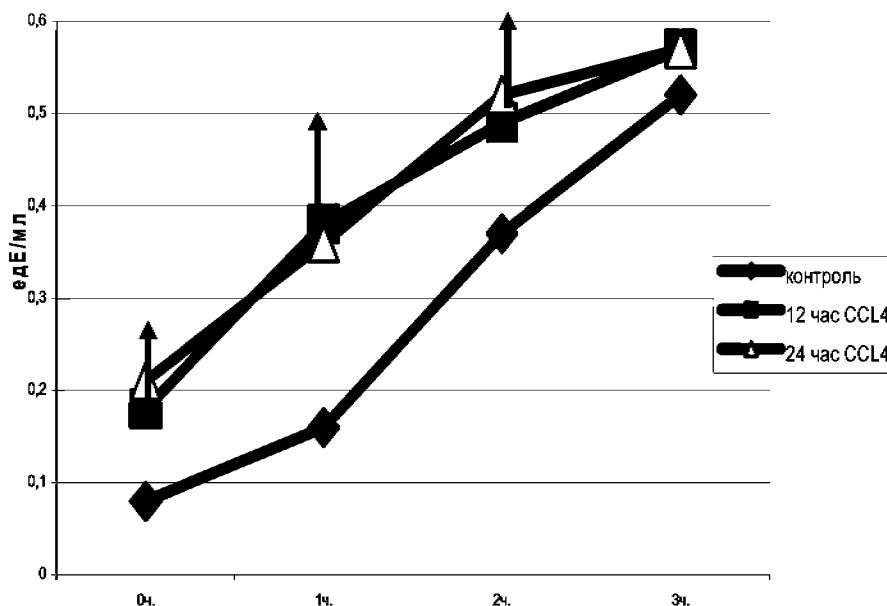


Рис. 5. Накопление ТБК-активных продуктов при аэробной инкубации гомогената печени. Стрелками указаны достоверные изменения относительно контроля

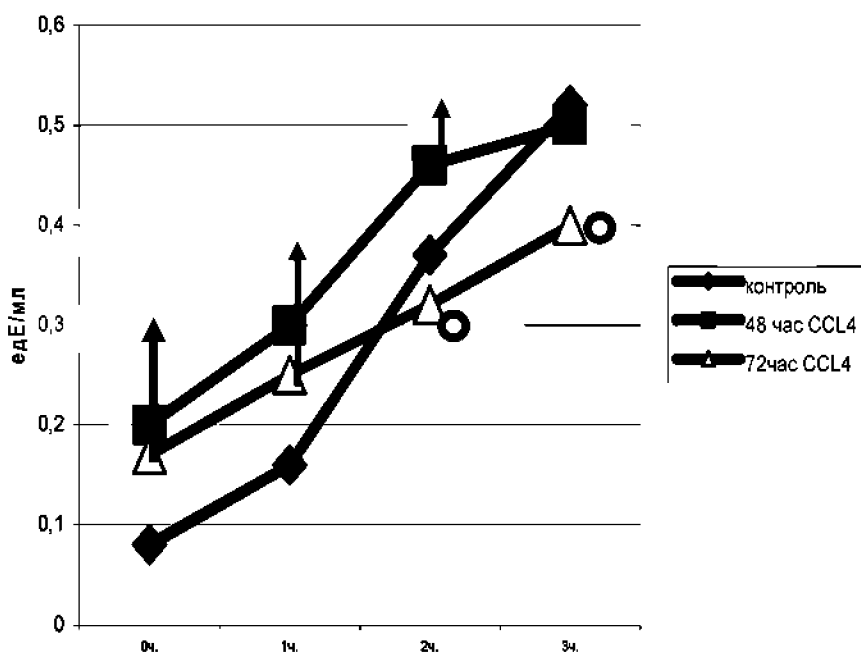


Рис. 6. Накопление ТБК-активных продуктов при аэробной инкубации гомогената печени. Стрелками указаны достоверные изменения относительно контроля, кружком – относительно 48-го часа повреждения

Таблица 3

Прирост вторичных продуктов ПОЛ на 3-й ч инкубации гомогената ткани печени

Прирост ТБК – АП, %	1-й ч поврежд.	3-й ч поврежд.	12-й ч поврежд.	24-й ч поврежд.	48-й ч поврежд.	72-й ч поврежд.
		430 ± 35,2	333 ± 10,5	316 ± 8,5	271 ± 10	294 ± 15,6
	Контроль 650 ± 33,5					

Примечание. Достоверность указана относительно первого часа повреждения. Доказательство усиления скорости образования ТБК-активных продуктов является к 48-му часу повреждения.

Таким образом, острое повреждение печени приводит к активации свободно-радикального окисления. В течение первого часа острого возрастание хемиллюминесценции в ткани печени и крови обусловлено снижением общей антиокислительной активности, наличием свободных радикалов, повышением гидроперекисей липидов, возрастанием пула легкоокисляемых липидов. Снижение амплитуды быстрой вспышки и светосуммы свечения в гомогенате печени к 48–72-му ч относительно первых часов повреждения обусловлено возрастанием скорости окисления, повреждением клеток печени, но не возрастанием мощности общей антиокислительной способности. Характер изменений СРО в крови и печени в динамике ее острого повреждения различен.

Литература

1. Гланц, С. *Медико-биологическая статистика* / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 438 с.
2. Кантюков, С.А. *Состояние процессов свободно-радикального окисления при термической травме разной степени тяжести* / С.А. Кантюков, Л.В. Кривожижгина, Р.Р. Фархутдинов // *Вестник ЮУрГУ. Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура»*. – 2010. – Вып. 24. – № 24 (200). – С. 117–124.
3. Костюк, В.А. *Роль ковалентного связывания и ПОЛ в повреждении печени четырехлористым углеродом* / В.А. Костюк // *Биохимия*. – 1991. – № 10. – С. 1878–1885.
4. Реброва, О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTIKA* / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2006. – 312 с.
5. Kaplowitz, M.D. *Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury* / M.D. Kaplowitz // *Semin Liver Dis.* – 2002. – № 4. – P. 137–144.
6. Fausto, N. *Liver regeneration* / N. Fausto // *Hepatology*. – 2000. – V. 32(1). – P. 19–31.
7. Kaplowitz, M.D. *Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury* / M.D. Kaplowitz // *Semin Liver Dis.* – 2002. – № 4. – P. 137–144.

Поступила в редакцию 16 мая 2011 г.