

Экспериментальная токсикология тетрахлорметана: оценка влияния на систему липопероксидации

© 2012. С. П. Перетягин¹, д.м.н., руководитель отдела,
С. Ю. Большухин², аспирант, А. К. Мартусевич¹, к.м.н., с.н.с.,
¹Нижегородский научно-исследовательский институт
травматологии и ортопедии,
²Кировская государственная медицинская академия,
e-mail: psp_aro@mail.ru; cryst-mart@yandex.ru

На 60 крысах-самцах линии Вистар введением тетрахлорметана (ТХМ) моделировали острый токсический гепатит, хронический гепатит и цирроз печени. Определяли концентрацию диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в плазме крови, эритроцитах и гомогенате печени. Установлено, что интоксикация ТХМ приводит к сдвигу липопероксидации в ранние сроки после введения токсина. Наиболее выраженная активация липопероксидации наблюдается в гомогенате печени. Длительная интоксикация ТХМ является фактором хронизации окислительного стресса.

We modeled toxic acute and chronic hepatitis and cirrhosis on 60 Vistar line rats by carbon tetrachloride (CTC) injections. Dien conjugates and malon dialdehyde was tested in blood plasma, erythrocytes and liver homogenates. It was stated, that CTC intoxication led to lypoperoxidation changes in early period after CTC injection. Strongly pronounced activation of lypoperoxidation was found in liver homogenates. It was shown that prolonged CTC intoxication is a risk factor of oxidative stress chronization.

Ключевые слова: интоксикация, тетрахлорметан,
перекисное окисление липидов, гепатит, цирроз

Keywords: intoxication, carbon tetrachloride, lypoperoxidation, hepatitis, cirrhosis

В клинике внутренних болезней одно из ведущих мест занимают заболевания печени, вызванные действием промышленных ядов [1, 2]. Тетрахлорметан (ТХМ - CCl_4) является классическим гепатотропным агентом, и даже непродолжительное поступление высоких доз ТХМ способствует развитию жировой дистрофии печени [3 – 5]. В реализации молекулярных механизмов повреждения гепатоцитов ведущая роль принадлежит активным метаболитам и интермедиатам ТХМ, образующимся в процессе его биотрансформации с участием цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ [2, 4]. Свободнорадикальные производные ТХМ способны инициировать процессы аутокаталитической липопероксидации, атакуя двойные связи боковых цепей ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов, что приводит к нарушению физико-химических свойств мембран клеток печени [7, 8]. Повреждение мембранных структур сопровождается модификацией активности большинства внутриклеточных ферментов, ослаблением антитоксической функции печени, нарушением синтетических процессов, разобщением тканевого дыхания и окислительного фосфорилирова-

ния, снижением синтеза АТФ, развитием гипоксии [2, 4, 6 – 8]. В связи с этим в последние годы возрастает интерес к перспективным антиоксидантам, способным предотвращать последствия токсических поражений печени [4, 5, 7, 8].

Цель исследования – изучение состояния липопероксидации при экспериментальном токсическом поражении печени, вызванном различными дозами тетрахлорметана.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на 60 белых крысах-самцах линии Вистар (масса тела 180–210 г). Моделировали острый токсический гепатит (4 и 8 подкожных инъекций ТХМ в виде 66% масляного раствора в дозе 0,2 мл на 100 г массы тела животного), хронический токсический гепатит (20 инъекций ТХМ) и цирроз печени (64 инъекции ТХМ). Введение ТХМ осуществляли через сутки.

Материалом исследования служили кровь и печень крыс. Взятие биоматериала проводили в утренние часы после декапитации живот-

ных под эфирным наркозом. Определяли концентрацию промежуточных диеновых конъюгатов (ДК) и конечных – малонового диальдегида (МДА) продуктов липопероксидации [9]. МДА выделяли из эритроцитарных мембран изопропиловым спиртом [10]. Методика определения МДА в гомогенате печени аналогична его определению в мембранах эритроцитов. Липидную фракцию для определения диеновых конъюгатов в эритроцитах крови и гомогенатах печени экстрагировали гептан-изопропаноловой смесью методом, модифицированным П.И. Цапок с соавт [10]. Изменения исследуемых показателей анализировали через 1 и 10 суток после последней инъекции ТХМ.

Данные обработаны методами вариационной статистики с применением критерия Mann-Whitne.

Результаты исследования

В условиях моделирования острого гепатита достоверные изменения содержания ДК в плазме крови выявлены лишь при интоксикации 8 инъекциями CCl_4 . В этом случае через 1 сутки после его отмены наблюдали достоверное снижение содержания ДК в биосреде по отношению к интактным животным (на 60,9%; $p < 0,05$). Через 10 суток данный показатель увеличивался, но оставался ниже контрольного уровня на 38,1% ($p < 0,05$). В группе интактных крыс через 10 суток значимых изменений содержания ДК не обнаружено.

Более значимое снижение содержания ДК в первой контрольной точке наблюдается при

развитии хронического токсического гепатита (ХГ) и цирроза печени (ЦП), моделируемых 20 и 64 инъекциями ТХМ соответственно. При этом максимальное снижение уровня показателя относительно интактных животных (на 76%; $p < 0,05$) выявлено при ХГ, а при ЦП уровень параметра снижался на 48,2% ($p < 0,05$).

Через 10 суток после отмены CCl_4 содержание ДК в плазме крови при ХГ восстанавливается практически до нормы, а при ЦП нормализации данного показателя не происходит, а наблюдается его снижение до следовых количеств ($0,01 \pm 0,002$ усл. ед/л; $p < 0,01$) (рис. 1). Таким образом, восстановление содержания ДК в плазме крови в первые 10 суток после отмены токсина зависит от тяжести интоксикации (уровень корреляционной связи $r = -0,79$).

Через 1 сут после завершения моделирования патологии достоверные изменения ДК эритроцитов наблюдаются лишь при ХГ и ЦП, что проявляется снижением данного показателя на 38,3% ($p < 0,05$) и на 25% ($p < 0,05$) по отношению к интактным животным (рис. 2). При этом обнаружена обратная зависимость средней силы между содержанием ДК и тяжестью интоксикации ($r = -0,37$).

Через 10 сут после отмены CCl_4 содержание ДК в эритроцитах у крыс с ХГ было ниже, чем в интактной группе, на 77,9% ($p < 0,01$), а при ЦП данный показатель снижался до следовых количеств ($0,04 \pm 0,02$ усл. ед/г; $p < 0,01$). При этом выявлена отрицательная корреляционная зависимость высокой силы между содержанием ДК эритроцитов и выраженностью интоксикации ($r = -0,81$).

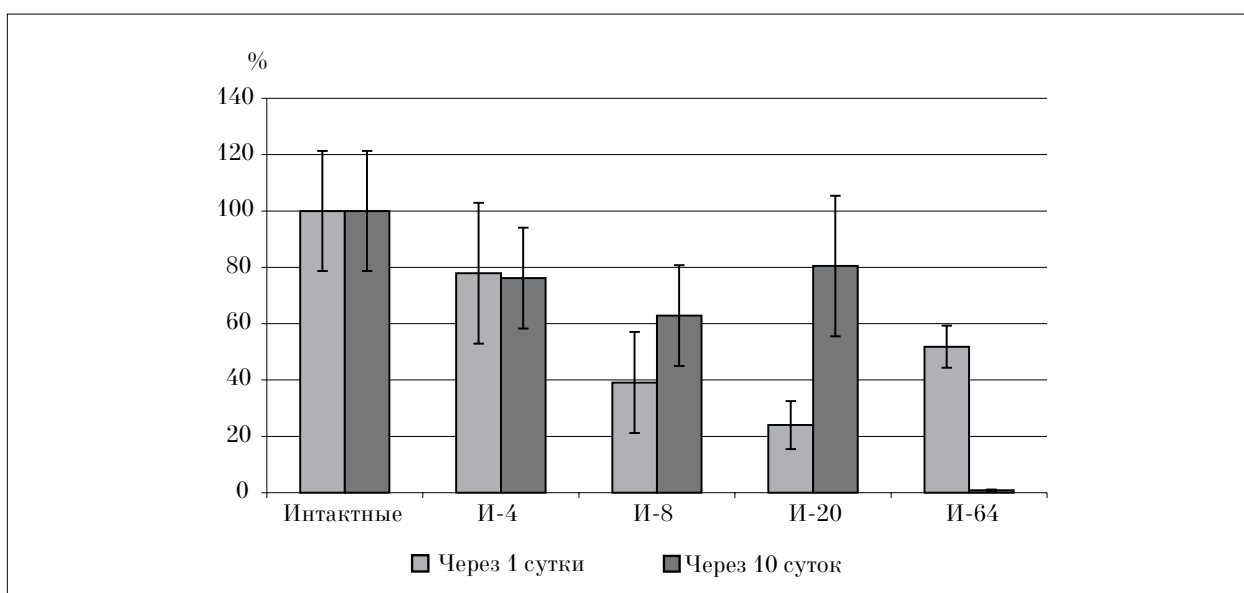


Рис. 1. Изменение содержания диеновых конъюгатов плазмы крови крыс в зависимости от степени тяжести интоксикации тетрахлорметаном (И – число инъекций)

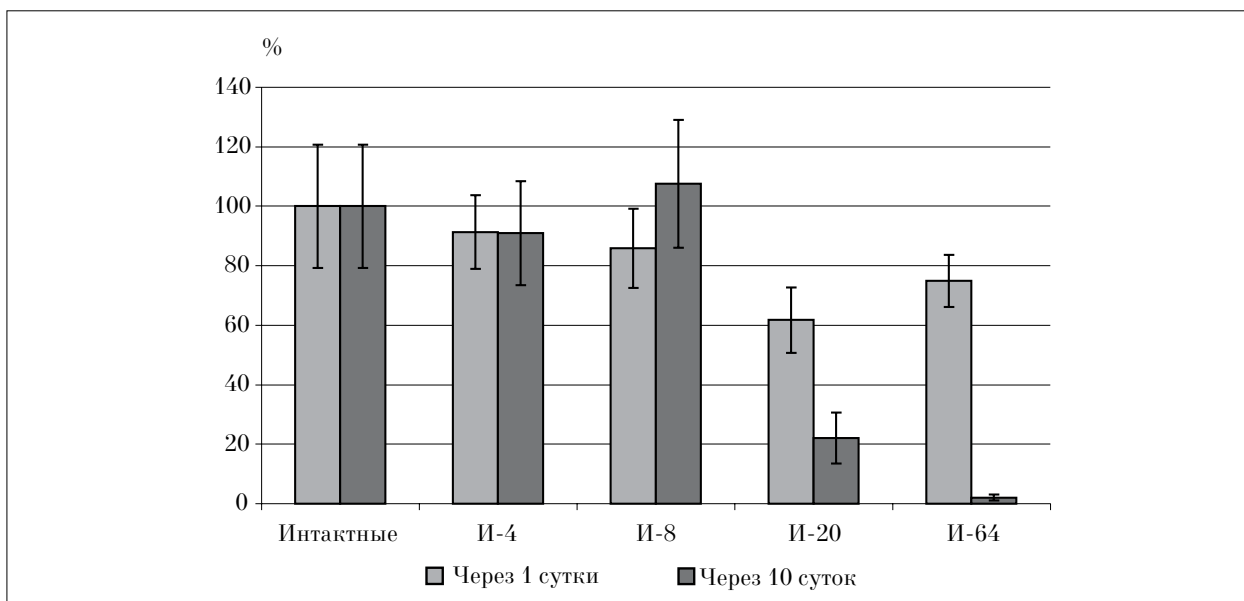


Рис. 2. Динамика содержания диеновых конъюгатов в эритроцитах с учётом степени интоксикации тетрахлорметаном (И – число инъекций)

Наиболее выраженное достоверное повышение содержания ДК в условиях интоксикации CCl_4 выявлены в гомогенате печени крыс через 1 сут после отмены введения токсина. Так, после 4 инъекций CCl_4 содержание ДК увеличилось на 83,1% ($p < 0,05$), после 8 инъекций CCl_4 – на 152,5% ($p < 0,05$), после 20 инъекций – в 1,9 раза ($p < 0,01$), а после 64 инъекций – в 2,4 раза ($p < 0,01$). Также установлено, что между содержанием ДК в гомогенате печени и выраженностью интоксикации существует зависимость средней силы ($r = 0,66$). Через 10 сут после отмены CCl_4 содержание ДК в гомогенате печени животных всех опытных групп снижается до нормы (рис. 3).

При анализе содержания МДА в плазме крови через 1 сут после завершения курса введения ТХМ ни в одной группе животных достоверных изменений параметра по отношению к интактным животным не выявлено (рис. 4). Через 10 сут после завершения моделирования патологии достоверное снижение данного показателя по отношению к интактным животным обнаружено лишь при токсическом ЦП ($p < 0,01$). Выявленная тенденция к снижению уровня МДА при нарастании тяжести интоксикации ТХМ подтверждена соответствующей корреляцией ($r = -0,84$).

В эритроцитах через 1 сут после отмены CCl_4 достоверные изменения содержания МДА

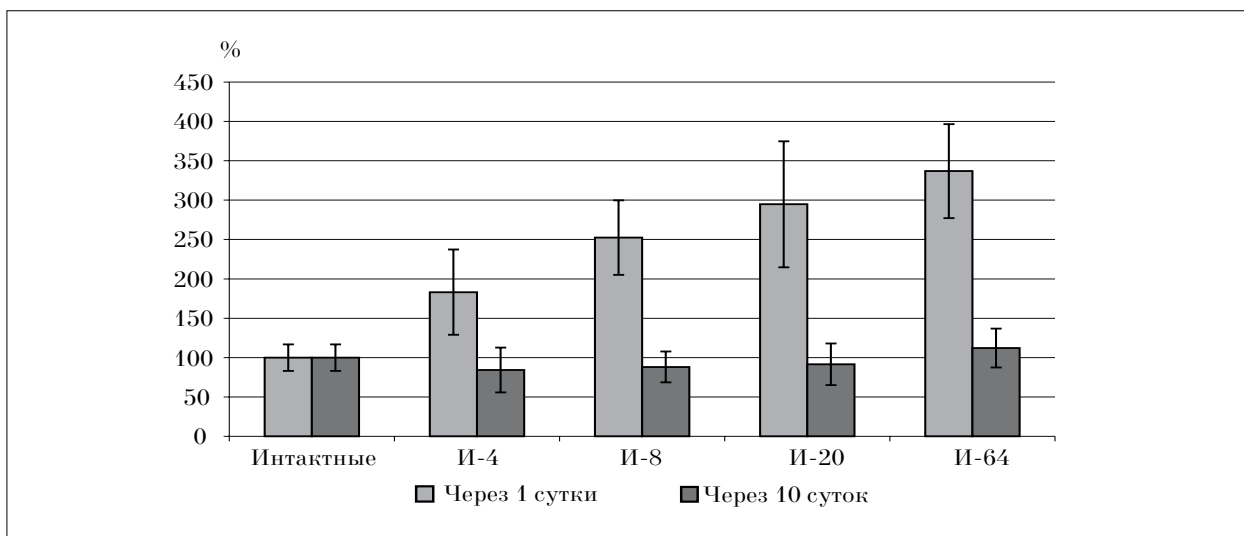


Рис. 3. Изменение содержания диеновых конъюгатов гомогената печени крыс в зависимости от степени токсического поражения тетрахлорметаном (И – число инъекций)

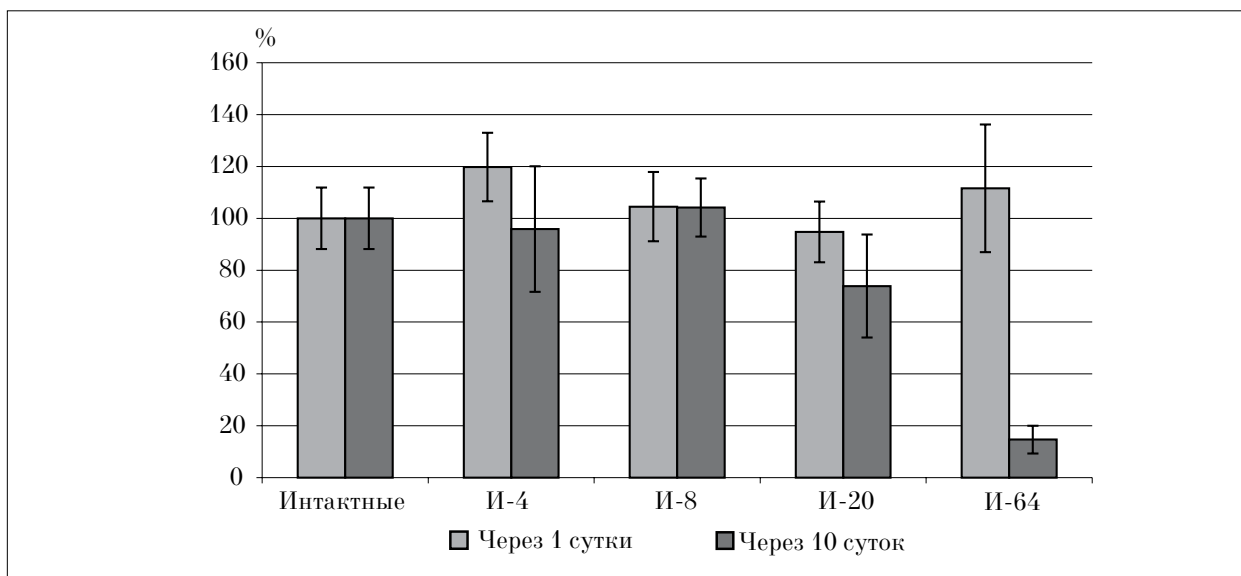


Рис. 4. Концентрация малонового диальдегида плазмы крови крыс в динамике тетрахлорметановой интоксикации (И – число инъекций)

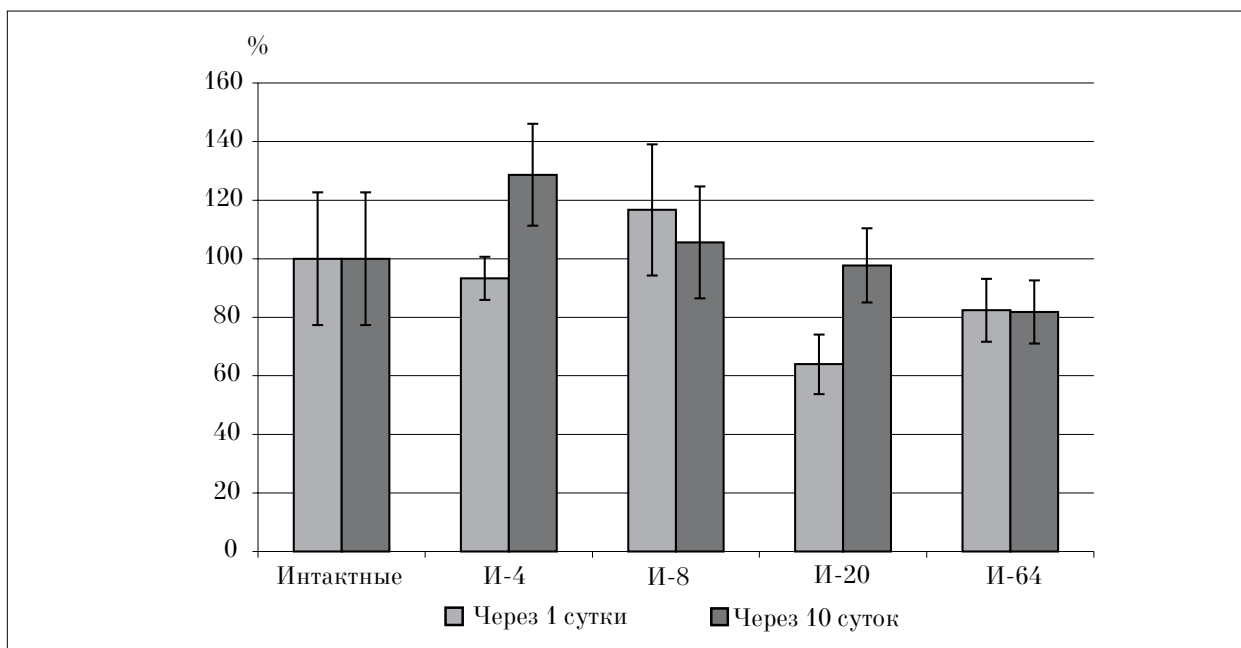


Рис. 5. Изменение содержания малонового диальдегида эритроцитов крови крыс в зависимости от степени токсического поражения тетрахлорметаном (И – число инъекций)

выявлены в модели ХГ (рис. 5). В этом случае указанный показатель снижался на 36% по отношению к интактным животным ($p < 0,05$). Через 10 суток после отмены CCl_4 значение параметра не отличалось от нормального уровня. При этом наблюдается умеренная обратная корреляция между содержанием МДА эритроцитов крови крыс и тяжестью моделируемой интоксикации ($r = -0,44$). В других группах животных значимых изменений содержания МДА в эритроцитах крови крыс не выявлено (рис. 5).

Наиболее выраженные изменения содержания МДА и ДК при интоксикации крыс тетрахлорметаном выявлены в гомогенате печени. Так, через 1 сутки после 4 инъекций CCl_4 выявлено повышение в 2,82 раза содержания МДА по отношению к уровню интактных животных ($p < 0,05$), после 8 инъекций – в 4,77 раза ($p < 0,05$), после 20 инъекций – в 5,3 раза ($p < 0,05$), а – после 64 инъекций CCl_4 – в 6,1 раза ($p < 0,05$). Следует отметить, что между содержанием МДА и степенью интоксикации выявлена прямая сильная корреляция ($r = 0,7$).

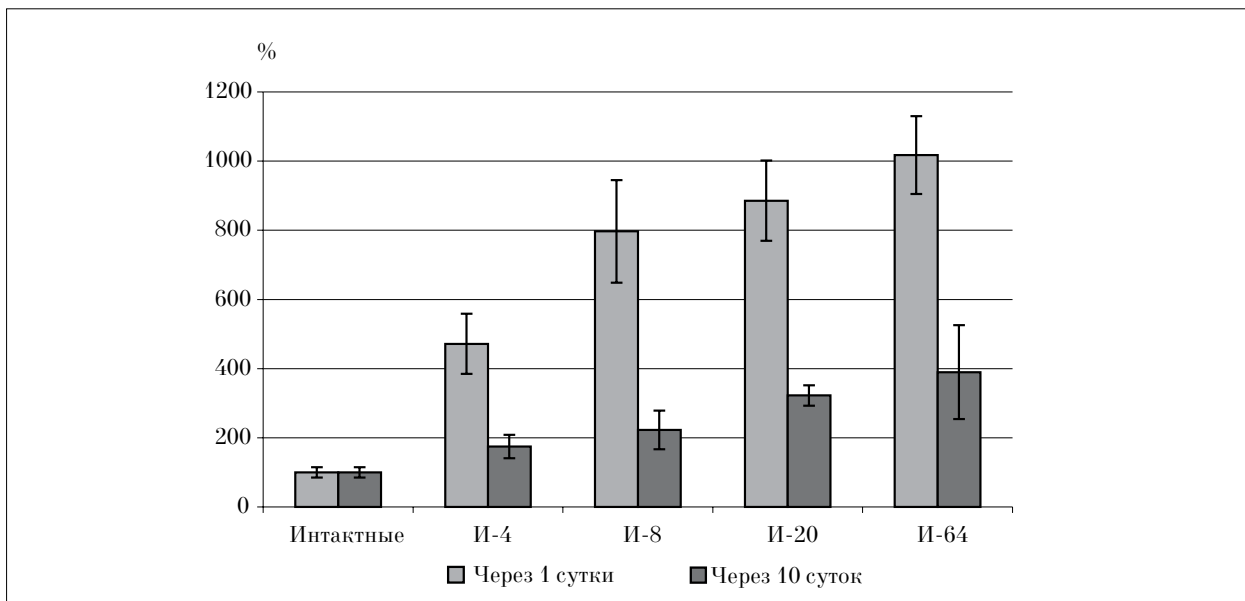


Рис. 6. Динамика содержания малонового диальдегида в гомогенате печени в зависимости от степени токсического поражения тетрахлорметаном (И – число инъекций)

Через 10 сут после завершения введения токсина происходит снижение содержания МДА, сохраняясь на уровне выше нормального на 75% после 4 инъекций тетрахлорметана ($p < 0,05$), после 8 инъекций CCl_4 – на 123% ($p < 0,05$), после 20 инъекций – на 222% ($p < 0,05$), а после 64 инъекций – на 290% ($p < 0,05$) (рис. 6). Между концентрацией МДА и выраженностью интоксикации выявлена прямая зависимость, приближающаяся к сильной ($r = 0,69$).

Выводы

1. Интоксикация тетрахлорметаном приводит к существенному сдвигу процессов липопероксидации, способствуя к формированию окислительного стресса в ранние сроки после введения токсина.

2. Наиболее выраженная активация липопероксидации наблюдается в гомогенате печени крыс, подвергшихся интоксикации.

3. Длительная интоксикация тетрахлорметаном является фактором хронизации окислительного стресса, являясь предиктором токсической патологии печени.

Литература

1. Liss G., Lewis J.H. Drug-induced liver injury: what was new in 2008? // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009. V. 5. № 8. P. 843–860.
 2. Morita M., Akai S., Hosomi H. et al. Drug-induced hepato-toxicity test using gamma-glutamylcysteine synthetase knockdown rat // *Toxicol. Lett.* 2009. V. 189. № 2. P. 159–165.

3. Венгеровский А.И., Батурина Н.О., Чучалин В.С., Саратиков А.С. Роль перекисного окисления липидов в механизме пролиферации фиброзной ткани печени при экспериментальном хроническом гепатите // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 1996. № 2. С. 37–39.

4. Саратиков А.С., Венгеровский А.И. Влияние гепатопротекторов, содержащих фосфолипиды, на зависимость от цитохрома Р-450 антитоксическую функцию печени при экспериментальном токсическом гепатите // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1999. Т. 127. № 4. С. 392–394.

5. Шилова И.В., Краснов Е.А., Суслов Н.И. Гепато-защитные свойства фракций экстракта лабазника вязолистного при экспериментальном токсическом гепатите // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2008. Т. 146. № 47. С. 54–57.

6. Pera N., Phung N., Farrel G.C. Oxidative stress in hepatic fibrogenesis: implications from a nutritional model of nonalcoholic steatohepatitis // *Hepatology.* 1999. V. 30. P. 493–494.

7. Буеверов А.О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2002. № 4. С. 21–25.

8. Скворцов В.В. Пероксидация липидов и антиоксидантная система в гепатологии // *Гепатология.* 2003. № 3. С. 7–13.

9. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб.: ИКФ «Фоллиант», 2000. 104 с.

Цапок П.И., Галкин А.А., Караваев С.А. Метод обработки эритроцитарных мембран для биохимических исследований // *Информационный листок Кировского ЦНТИ № 72–99.* Киров. 1999. 3 с.