

УДК 615.9:547.562.33:[616.36:616.61/.63]-074:577.125-092.9

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И ГЕПАТОРЕНАЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СТОЙКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ

Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Галимов Д.М., Идрисова Л.Т., Мышкин И.В.
ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Росздрава, Уфа,
e-mail: enikeev@mail.ru

Исследованы биохимические, гистохимические, морфометрические показатели повреждения печени и почек в условиях отравления смесью полихлорбифенилов Совтолом в дозе 600 мг/кг. В условиях подострой интоксикации выявлены увеличение массы печени, активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушение морфометрии и баланса клеточной популяции гепатоцитов, признаки деструктивного повреждения печени – симптомы цитолиза и холестаза, в почках – усиление активности перекисного окисления липидов, снижение ЛДГ, ЩФ, количества гликогена, увеличение липидов, а также изменение объема и состава мочи – появление уроферментов (лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы), что может свидетельствовать о повреждении канальцевого аппарата почек.

Ключевые слова: полихлорированные бифенилы, подострая интоксикация, перекисное окисление липидов, диеновые конъюгаты, ТБК-реагирующие продукты, печень, почки

LIPID PEROXIDATION AND HEPATORENAL DAMAGE IN RATS EXPOSED TO PERSISTENT POLLUTANS

Myshkin V.A., Enikeev D.A., Galimov D.M., Idrisova L.T., Myshkin I.V.
Bashkir state medical university, Ufa, e-mail: enikeev@mail.ru

Biochemical, histochemical, morphometric damage indices of liver and kidneys has been investigated by commercial mixture polychlorinated biphenyls Sovtol – electroisolating sovol and 26-31 % of trichlorobenzene in dose of 600 mg/kg. By subacute intoxication has been revealed: auxesis of liver, activation of lipid peroxidation, morphometry and hepatocyte cell population balance abnormalities, destructive changes liver – cytolysis and cholestasis symptoms, in kidney tissue – increase in activity of lipid peroxidation; reduction of lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), glycogen quantity; increase in lipid quantity, and also urine volume and composition changes – appearance of uroenzymes (lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase), which may be evidence of kidney tubular system disorder.

Keywords: polychlorinated biphenyls, subacute intoxication, lipid peroxidation, conjugated dienes, TBA-reactive products, liver, kidneys

Известно, что процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются ключевым звеном ряда патофизиологических процессов, в том числе таких, как токсическое повреждение [3]. В частности, имеются работы, в которых продемонстрирована интенсификация процессов ПОЛ у животных с поражением печени полихлорированными бифенилами (ПХБ) [10]. Это вполне понятно, если учесть, что в гепатоцитах система инактивации ксенобиотиков тесно сопряжена с ферментативной системой ПОЛ и что активация ПОЛ является начальным звеном цитолиза [3, 4]. В то же время известно что ПХБ способны индуцировать процессы свободнорадикального окисления, помимо печени, в центральной нервной системе, клетках крови, тканях репродуктивных органов, слизистой оболочке желудка, кишечника, поджелудочной железе и некоторых других [10]. При этом отсутствуют экспериментальные данные о роли процессов ПОЛ при сочетанном повреждении печени и почек в условиях экспериментального отравления ПХБ.

В настоящей работе исследована активность реакций ПОЛ при сочетанном по-

вреждении печени и почек ПХБ в условиях интоксикации.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на белых крысах-самцах массой 180–240 г. Поражение печени и почек вызвали путем введения животным опытной группы коммерческого препарата ПХБ «Совтол», включающего смесь тетра-, пента-, гексахлорбифенолов и тетрахлорбензола. Токсикант вводили в желудок крыс с помощью специального металлического зонда в суммарной дозе 600 мг/кг в течение 28 дней. Животным контрольной группы вводили оливковое масло. На 30 сутки эксперимента после декапитации под легким эфирным наркозом у крыс собирали кровь, извлекали печень и почки. Анализ крови, отражающий метаболизм и функцию печени (активность аланинаминотрансферазы – АлАТ, аспаратамино-трансферазы – АсАТ, лактатдегидрогеназы – ЛДГ, щелочной фосфатазы – ЩФ) осуществляли на биохимическом анализаторе Encore clinical system (Австрия). Активность уруканиназы (УрН) исследовали по методу [7]. Уровень диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрическим методом [4, 5]. ТБК-реагирующие продукты (ТБК-РП) – методом Стальной И.Д. и Гаришвили Т.Г [4]. На кристатных срезах ткани печени и почек определяли содержание липидов с помощью окраски суданом черным [1], на парафиновых срезах – содержание гликогена по методу Мак-Мануса-Хочкина [9]. В ткани печени ис-

следовали активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), ЩФ методом азосочетания по М. Берстону [1]. Количественную оценку результатов гистохимических исследований проводили на цитоспектрофотометре (микроскоп с анализатором МТ-9 «ЛОМО») при длине волны 546 нм (ЛДГ), 520 нм (ЩФ) и 340 нм (липиды) на площади зонда 0,8 мкм². При морфометрическом анализе экспериментального материала (ткань печени) использовали морфо- и стереометрические методы. Диурез животных исследовали в течение 3 часов после водной нагрузки [2]. Концентрацию белка в моче методом Лоури [МУК 4.1/4.2.588–96], хлоридов методом Фольгардта, глюкозы – глюкозооксидазным методом. Активность ЩФ и ЛДГ определяли на биохимическом анализаторе «Spectrum» (США).

Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (примечания к приказу МЗ № 755 от 12.08.77) и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей».

Статистическую достоверность результатов исследования оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты изучения повреждающих эффектов ПХБ на печень и почки представлены в табл. 1 и 2. Введение крысам токсиканта сопровождалось существенными нарушениями процессов ПОЛ в печени. Так, в 1,6 раза увеличилось количество ДК и в 1,36 раза – содержание ТБК-РП по сравнению с показателями у интактных животных.

Значительные и, вероятно, первичные изменения процессов свободнорадикального окисления, протекающие на фоне деструктивного повреждения ткани печени, подтверждаются экстремальным повышением активности уруканиназы с нуля до $54,9 \pm 3,5$ ммоль/г·л, выраженной гиперферментемией, увеличением массы печени и сдвигами в популяционном балансе гепатоцитов – преобладанием количества безъядерных при одновременном снижении количества двуядерных гепатоцитов и клеток Купфера.

Таблица 1

Морфофункциональные показатели печени крыс при подострой интоксикации совтолом ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных	
	здоровые крысы ($n = 10$)	совтол ($n = 8$)
Морфометрические показатели		
Относительная масса печени, мг/г	$33,7 \pm 0,50$	$77,8 \pm 1,5^{***}$
Безъядерные гепатоциты, %	$3,25 \pm 0,50$	$21,0 \pm 0,15^{**}$
Двуядерные гепатоциты, %	$11,0 \pm 0,60$	$2,9 \pm 0,10^{**}$
Клетки Купфера, %	$4,3 \pm 0,15$	$3,0 \pm 0,10^{**}$
Ядерно-цитоплазматическое отношение, у.е.	$0,44 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,01^{**}$
Отношение стромы к паренхиме, у.е.	$0,26 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,01^*$
Биохимические и гистозиматические показатели		
УрН, ммоль/г·л	–	$54,9 \pm 3,5^{***}$
АлАТ, ммоль/г·л	$3,3 \pm 0,18$	$9,45 \pm 0,45^{***}$
АсАТ, ммоль/г·л	$10,7 \pm 0,14$	$25,7 \pm 0,43^{***}$
ЛДГ, ммоль/г·л	$29,9 \pm 1,0$	$122 \pm 10,82^{***}$
ЩФ, ммоль/г·л	$15,1 \pm 0,40$	$28,5 \pm 0,94^{***}$
Липиды, у.е.	$8,4 \pm 0,01$	$9,8 \pm 0,02^*$
Гликоген, у.е.	$8,5 \pm 0,02$	$7,5 \pm 0,01^{***}$
Показатели реакций ПОЛ и АОС		
ДК, у.е. опт.пл./100г. тк.	$2,8 \pm 0,11$	$4,5 \pm 0,08^*$
ТБК-РП, нмоль/г	$90,4 \pm 4,1$	$123,1 \pm 3,4^*$

Примечание: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Аналогичная картина нарушений активности ПОЛ развивалась в почках: концентрация ДК у отравленных крыс превышала контрольные показатели в 2,2 раза, а ТБК-РП – в 1,5 раза соответственно (табл. 2). Как известно, ПХБ, обладая высокими липофильными свойствами, легко проникают внутрь клетки, растворяясь во внутриклеточных липидах, нарушают метаболизм, блокируют ферментные системы, что приводит к нарушению клеточных элементов, возникновению жировой дегенерации и дистрофии с последующим развитием некрозов [10].

Гистохимический анализ почечной ткани и биохимическое исследование мочи свидетельствуют о том, что после воздействия ПХБ уровень липидов в ней увеличился белее чем в 2 раза. На этом фоне снижался диурез, развивались глюкозурия, протеинурия (табл. 2), подавлялась активность урoferментов – СДГ и ЩФ. Поскольку ЛДГ локализуется в цитоплазме нефроцитов, а ЩФ – в мембранах клеточной каймы, то повышение уровня данных ферментов в моче следует расценивать, как признак повреждения почечных канальцев.

Таблица 2

Диурез, биохимические показатели мочи и почек при подострой интоксикации крыс совтолом ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных	
	здоровые крысы ($n = 8 - 10$)	совтол ($n = 8$)
Диурез, мл	$5,8 \pm 0,68$	$0,5 \pm 0,33^{***}$
Моча:		
Белок, мг/мл	$2,36 \pm 0,20$	$10,53 \pm 0,18^{***}$
Хлориды, мг/мл	$2,55 \pm 0,22$	$2,16 \pm 0,88$
Глюкоза, моль/л	$0,22 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,13^{**}$
ЩФ, нмоль/г·л	$8,5 \pm 1,22$	$25,8 \pm 2,64^{***}$
ЛДГ, нмоль/г·л	$10,5 \pm 2,0$	$16,9 \pm 5,29^*$
Почечная ткань:		
Гликоген, у.е.	$8,5 \pm 0,15$	$6,36 \pm 0,28^*$
Липиды, у.е.	$4,2 \pm 0,31$	$8,4 \pm 0,05^*$
ЩФ, у.е.	$9,00 \pm 0,11$	$7,8 \pm 0,14^*$
ЛДГ, у.е.	$9,25 \pm 0,02$	$7,9 \pm 0,03^*$
УрН, нмоль/с·л	$1,2 \pm 0,11$	$33,6 \pm 5,5^{***}$
ДК, у.е. опт.пл./100г. тк.	$2,0 \pm 0,09$	$4,4 \pm 0,12^*$
ТБК-РП, нмоль/г	$88,4 \pm 4,1$	$135,8 \pm 15,9^*$

Примечание: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Таким образом, нарушения процессов ПОЛ и функционально-метаболические сдвиги выявляются не только в печени, но и в почках. Усиление активности ПОЛ в почках в условиях токсического действия относительно высоких доз ПХБ может быть связано со сменой динамических фаз адаптационной перестройки антиоксидантных ресурсов и срывом компенсаторных механизмов. С другой стороны, сохранение химического гомеостаза достигается кооперацией систем детоксикации и элиминации с участием метаболических систем печени и почек, а также экскреторной функции почек.

Сочетанное поражение двух органов на фоне интенсификации в них процессов ПОЛ свидетельствует о центральной роли окислительного стресса в ткани печени и почек, что может быть одним из ведущих механизмов токсического поражения гепаторенальной системы полихлорбифенилами. В развитии данного направления целесообразны дальнейшие исследования с использованием других моделей интоксикации и ПХБ-индуцированных видов патологии.

С учетом полученных результатов при разработке комплекса патогенетически обоснованных лечебно-профилактических мероприятий следует учитывать нарушения процессов ПОЛ в печени и почках.

Список литературы

1. Берстон М. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1965. – 390 с.
2. Берхин Е.Б., Иванов Ю.И. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена. – Барнаул, 1972. – 200 с.

3. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Медицина, 1972. – 252 с.

4. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. – Челябинск, 2000. – 160 с.

5. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания перекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.Н. Мишкорудная // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 33–36.

6. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.

7. Мардашев С.Р. Обнаружение уроганиназы в крови при отравлении четыреххлористым углеродом / С.Р. Мардашев, В.А. Буробин // Вопросы медицинской химии. – 1963. – № 7. – С. 93–94.

8. Методические рекомендации к проведению морфологических исследований при экспериментальном обосновании гигиенических нормативов вредных веществ в воздухе рабочей зоны; Утв. 22.11.1983 г. № 2939-83. Приложение 2. – 17 с.

9. Пирс Э. Гистохимия: теоретическая и прикладная. – М.: Мир, 1962. – 929 с.

10. Тутельян В.А. Лашнева Н.В. Полихлорированные бифенилы. – М.: Центр международных процессов ГКНТ, 1988. – Вып. 107. – 62 с.

Рецензенты:

Миннебаев М.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань;

Овсянников В.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 07.07.2011.