УДК 616.36-001.37-021.6:[615.3:547.412.133]-085:615.014.425

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ ВВЕДЕНИИ ОЗОНА В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

[1]Большухин С.Ю., [1]Косых А.А., [2]Перетягин С.П., [2]Мартусевич А.А.

[1]ГОУ ВПО Кировская государственная медицинская академия Росздрава, Киров;

[2]ФГУ Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии МЗСР РФ, Нижний Новгород, e-mail: psp_aro@mail.ru

На моделях тетрахлорметановой интоксикации (воспроизведение острого и хронического токсического гепатита, цирроза печени у крыс) изучено состояние липопероксидации по концентрации ее промежуточных (диеновые конъюгаты) и конечных (малоновый диальдегид) продуктов в плазме крови, эритроцитах и гомогенате печени животных. Оценены особенности сдвигов указанных соединений при внутрибрюшинном введении крысам физиологического раствора, насыщенного различными дозами озона (1, 10 и 100 мкг/кг). Установлено, что при экспериментальной терапии острого гепатита наиболее эффективными оказываются низкие дозы озона (1 и 10 мкг/кг), а при коррекции хронического гепатита и цирроза печени – высокие дозы озона (от 10 до 100 мкг/кг).

Ключевые слова: липопероксидация, гепатит, цирроз, озон, тетрахлорметан

EXPERIMENTAL STUDY OF LYPOPEROXIDATION DYNAMICS AT OZONE THERAPY OF ACUTE AND CHRONIC CARBON TETRACHLORIDE INTOXICATION

[1]Bolshuhin S.Y., [1]Kosyh A.A., [2]Peretyagin S.P., [2]Martusevich A.A.

[1]Kirov state medical academy, Kirov;

[2]Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopaedy, Nizhny Novgorod, e-mail: psp_aro@mail.ru

At carbon tetrachloride intoxication model (acute and chronic hepatitis, cirrhosis) we study lypoperoxidation state by level of its intermediate (dien conjugates) and terminal (malone dialdehyde) products in rats blood plasma, erythrocytes and liver tissue. Specialties of these parameters dynamics are estimated at intraperitoneal injections of ozonated sodium chloride solution (ozone dose 1, 10 and 100 mcg/kg). It was stated, that at experimental treatment of acute toxic hepatitis low ozone doses (1 or 10 mcg/kg) are effective, and at chronic hepatitis or cirrhosis correction high ozone doses (10 or 100 mcg/kg) are necessary.

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

Заболевания печени представляют собой актуальную проблему современного здравоохранения в России и в мире в целом [3, 5, 7, 10]. В структуре данных заболеваний наибольшую распространенность получили гепатиты вирусной этиологии и алкогольное поражение печени, причем наблюдается увеличение тяжелых форм течения гепатитов с высоким риском формирования хронического поражения печени [7, 10].

Возникновение и характер патологического процесса в печени определяются его этиологией, но объединены одним общим механизмом повреждения – активацией процессов липопероксидации (ЛПО) [3–5, 7, 10]. Известно, что процессы ЛПО непрерывно протекают во всех органах и тканях в физиологических условиях и имеют важное метаболическое значение [3, 4, 10]. Контролируя уровень ЛПО, можно корригировать не только течение заболевания, но и функциональное состояние всего организма. Несмотря на успехи, достигнутые в изучении процессов ЛПО, данную проблему нельзя отнести к разряду окончательно разрешенных [3]. Несмотря на наличие большого количества методов и способов лечения патологии печени, ведутся активный поиск и разработка современных и экономичных методов, направленных на устранение токсического действия избытка продуктов липопероксидации [3, 4, 10]. Одним из перспективных путей в решении данной проблемы является разработка и внедрение в комплексное лечение заболеваний печени методов озонотерапии [2, 6, 9].

Цель исследования: оценить динамику показателей активности процессов липопероксидации при введении озона в условиях острой и хронической интоксикации тетрахлорметаном в эксперименте.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на 108 белых линейных крысах-самцах линии Вистар (масса тела 180–210 г.). Для получения озоно-кислородной смеси использовались озонаторы «Озон – М–50» и «Озон – М–100» (ВГУ, Киров). Озонированный физиологический раствор (ОФР) получали путем барботажа озоно-кислородной смесью (концентрация озона 1, 10 и 100 мкг/кг) в течение 15 ми-

нут. Концентрацию озона в растворе контролировали методом йодометрического титрования и спектрофотометрически (СФ-46; длина волны 254,5 нм). ОФР вводили лабораторным животным внутрибрюшинно в течение 10 дней.

Материалом служили кровь и печень крыс. Взятие биоматериала проводили в утренние часы после декапитации животных под эфирным наркозом. Определяли концентрацию промежуточных (ДК) и конечных (МДА) продуктов липопероксидации [1, 8]. МДА выделяли из эритроцитарных мембран изопропиловым спиртом [8]. Методика определения МДА в гомогенате печени аналогична его определению в мембранах эритроцитов. Липидную фракцию для определения диеновых конъюгатов (ДК) в эритроцитах крови и гомогенатах печени экстрагировали гептан-изопропаноловой смесью методом, модифицированным П.И. Цапок с соавт. (1999) [8]. Данные обработаны методами вариационной статистики с применением критерия Mann-Whitne.

Результаты исследования и их обсуждение

При моделировании острого гепатита 4 инъекциями CCl_4 в обеих контрольных группах наблюдалась тенденция к снижению содержания ДК в плазме крови (рис. 1), сохраняющаяся при введении озона в дозах 1 и 10 мкг/кг. Введение озона в дозе 100 мкг/кг приводило к увеличению показателя на 31,3 % ($p < 0,05$) к опытному контролю. При этом содержание ДК в плазме крови зависело от дозы озона ($r = +0,59$). В эритроцитах крыс контрольных групп содержание ДК оставалось в пределах нормы, а введение 1 мкг/кг озона приводило к увеличению показателя на 58,7 % ($p < 0,01$) к опытному контролю и на 44,7 % ($p < 0,05$) – к норме. При введении 10 мкг/кг озона выявлено снижение содержания ДК на 28,1 % ($p < 0,05$) по отношению к норме. В гомогенате печени через сутки после отмены токсина содержание ДК было выше нормы на 83,1 %, а к 10 суткам данный показатель снизился до нормы. При введении озона в дозе 1 мкг/кг значение ДК сохранялось на высоком уровне, превышая данный показатель животных опытного контроля на 57,5 % ($p < 0,05$), а нормальные значения – на 32,6 % ($p < 0,05$). Введение озона в дозе 10 мкг/кг приводило к снижению содержания ДК до уровня опытного контроля и нормы, в то время как при использовании дозы озона 100 мкг/кг наблюдалось снижение данного показателя по отношению к норме на 30,1 % ($p < 0,05$), а по отношению к опытному контролю изменений не было. Между содержанием ДК в ткани печени и дозой вводимого озона обнаружена обратная зависимость ($r = –0,48$).

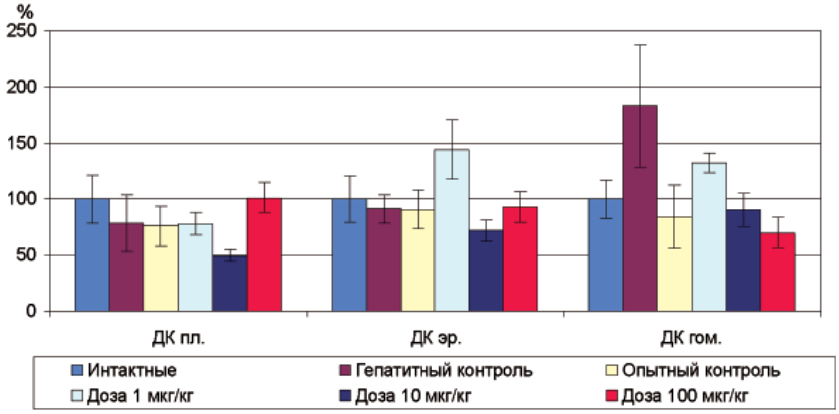

Рис. 1. Динамика содержания диеновых конъюгатов в биосредах крыс при введении озона в условиях острого токсического поражения тетрахлорметаном (4 инъекции)

В модели острого гепатита после 4 инъекций токсина изменений содержания МДА в плазме крови крыс контрольных групп не выявлено (рис. 2). При введении 1 мкг/кг озона показатель остается в пределах нормы и значений контрольных групп. С увеличением дозы озона (10 мкг/кг) наблюдается снижение концентрации МДА к норме на 19,6 % ($p < 0,05$). При дальнейшем увеличении дозы озона выявлено нарастание содержания МДА в плазме на 60,3 % ($p < 0,01$) к опытному контролю и на 62,9 % ($p < 0,01$) – к норме. Корреляционный анализ выявил прямую корреляцию между уровнем МДА плазмы и дозой озона ($r = +0,82$). В эритроцитах крыс контрольных групп содержание было нормальным. Введение 1 мкг/кг озона вызывало снижение содержания МДА в эритроцитах крови крыс на 22,1 % ($p < 0,05$), а 10 мкг/кг – увеличение показателя на 27,1 % ($p < 0,05$) к опытному контролю. Использование 10 и 100 мкг/кг озона приводило к увеличению концентрации МДА на 63,4 % ($p < 0,01$) и 62,3 % ($p < 0,05$) по отношению к норме соответственно. При этом содержание МДА в эритроцитах напрямую зависело от дозы вводимого озона ($r = +0,42$). В гомогенате

печени крыс гепатитного контроля обнаружено увеличение уровня МДА в 2,82 раза ($p < 0,05$), к 10 суткам – его снижение без достижения нормы (выше ее на 75 %). При введении 1 и 10 мкг/кг озона содержание МДА оставалось выше нормы на 55,9 % ($p < 0,05$) и 50,5 % ($p < 0,05$) соответственно, а при введении 100 мкг/кг озона показатель, снижаясь, не отличался от нормы ($p > 0,05$). Также выявлена зависимость между уровнем МДА гомогената печени и дозой озона ($r = –0,39$).

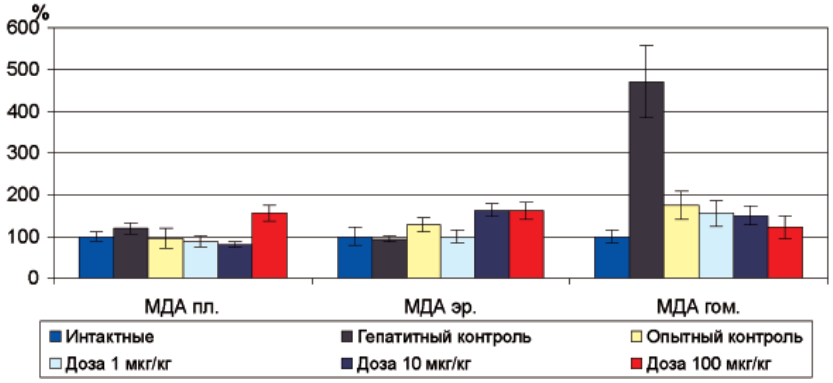

Рис. 2. Динамика содержания малонового диальдегида в биологических средах крыс при введении озона при остром токсическом поражении (4 инъекции тетрахлорметана)

Введение озона при хроническом гепатите приводило к существенным сдвигам содержания ДК плазмы (рис. 3). Так, через 1 сутки после отмены токсина наблюдалось снижение уровня ДК на 76 %, а к 10 суткам – его восстановление до нормы. При введении 1 мкг/кг озона показатель не отличается от опытного контроля и нормы, а применение 10 и 100 мкг/кг озона приводило к снижению концентрации ДК плазмы на 46 % ($p < 0,05$) и 89,1 % ($p < 0,01$) по отношению к опытному контролю соответственно и к норме –на 57,5 % ($p < 0,05$) и 91,2 % ($p < 0,05$) соответственно. Между уровнем ДК плазмы и дозой озона выявлена обратная корреляция ($r = –0,79$). В эритроцитах через сутки после отмены токсина выявлено снижение уровня ДК на 38,3 % ($p < 0,05$) к норме, к 10 суткам – на 77,9 % ($p < 0,01$). При введении 1 и 10 мкг/кг озона содержание ДК эритроцитов увеличилось к опытному контролю в 3,34 раза ($p < 0,01$) и 2,93 раза ($p < 0,01$) соответственно. В первом случае показатель нормализовался, а при введении 10 мкг/кг – оставался сниженным на 35,3 % ($p < 0,05$). Введение 100 мкг/кг озона приводило к сохранению значения на уровне опытного контроля (на 70 % ниже нормы; $p < 0,01$). В гомогенате печени уровень ДК через сутки после отмены токсина превышал норму в 1,9 раза, к 10 суткам происходит его нормализация. Введение озона изменяет параметр лишь по отношению к интактным животным и только в дозе 100 мкг/кг (снижение уровня ДК гомогената печени на 39,1 %; $p < 0,05$). С увеличением дозы озона наблюдается снижение концентрации ДК ($r = –0,40$).

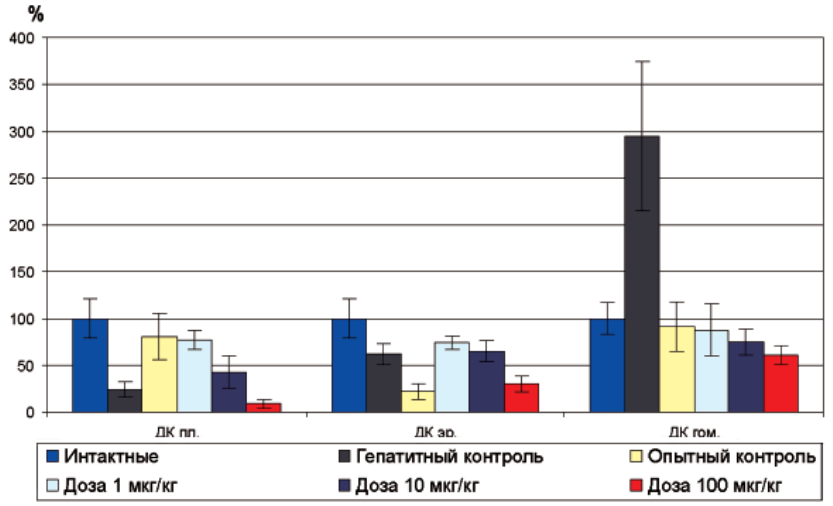

Рис. 3. Изменение содержания диеновых конъюгатов в биологических средах крыс при введении озона при хроническом токсическом поражении (20 инъекций тетрахлорметана)

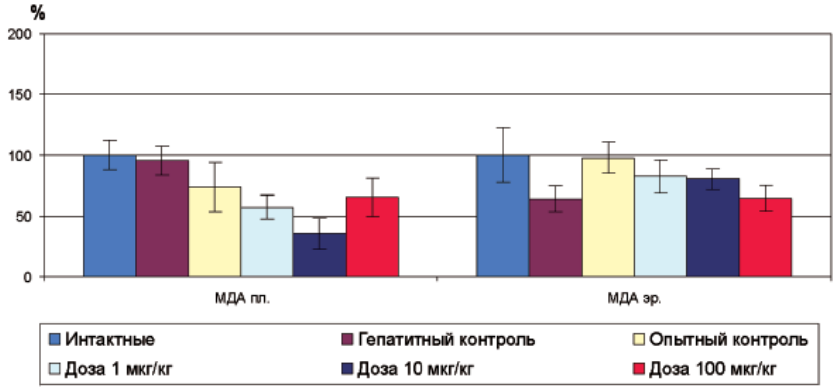

Рис. 4. Динамика концентрации МДА в плазме и эритроцитах крови крыс при введении озона в условиях хронического токсического поражения тетрахлорметаном (20 инъекций)

В рассматриваемой модели изменения уровня МДА в плазме крови крыс опытных групп выявлены лишь при введении 10 мкг/кг озона (снижение к опытному контролю на 51 %; $p < 0,05$) (рис. 4). При введении озона параметр был снижен на 42,8 % ($p < 0,01$), 64,1 % ($p < 0,01$) и 34,5 % ($p < 0,05$) к норме соответственно. В эритроцитах крыс гепатитного контроля наблюдалось снижение содержания МДА на 36 % ($p < 0,05$) к норме, а через 10 суток после отмены гепатотоксина – восстановление до нормы. В опытных группах изменения уровня МДА выявлены лишь при введении 100 мкг/кг озона (снижение к опытному контролю на 33,6 %; $p < 0,05$), а к норме – на 35,1 % ($p < 0,05$). Между содержанием МДА в эритроцитах и дозой озона выявлена обратная зависимость ($r = –0,56$). Изменения МДА в гомогенате печени крыс носят выраженный характер (рис. 5). Так, наблюдаемое через сутки после отмены токсина увеличение показателя к 10 суткам снижается, не достигая нормы и превышая ее в 2,2 раза ($p < 0,05$). При введении 1 мкг/кг озона параметр, снижаясь, оставался выше значений опытного контроля на 33,2 % ($p < 0,05$) и превышал норму в 4,3 раза ($p < 0,05$). При введении 10 мкг/кг озона уровень параметра не отличался от опытного контроля, превышая норму в 3,9 раза ($p < 0,05$). При введении озона в дозе 100 мкг/кг наблюдалось снижение концентрации МДА по отношению к опытному контролю на 37,2 % ($p < 0,01$), но данный показатель оставался выше нормы в 2,02 раза ($p < 0,05$).

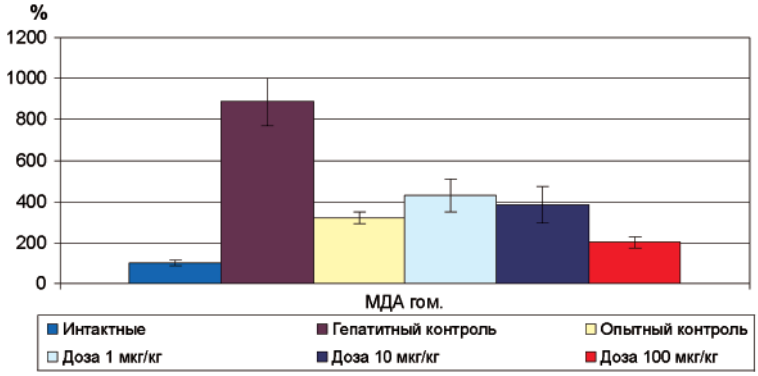

Рис. 5. Изменение содержания малонового диальдегида в гомогенате печени крыс при введении озона при тяжелой интоксикации (20 инъекций тетрахлорметана)

При воспроизведении цирроза печени через сутки после отмены гепатотоксина в плазме наблюдалось снижение концентрации ДК по отношению к норме на 48,2 % ($p < 0,05$), а к 10 суткам – до следовых количеств (0,005 ± 0,002 усл. ед./л). Введение озона приводило к увеличению содержания показателя к опытному контролю, относительно нормы он оставался ниже на 55,3 % ($p < 0,05$), 66,6 % ($p < 0,05$) и 93,3 % ($p < 0,05$) соответственно (рис. 6). При введении озона показатель в эритроцитах снижался по отношению к интактным животным на 83,4 % ($p < 0,01$), 90,6 % ($p < 0,01$) и 77,3 % ($p < 0,01$) соответственно (корреляция с дозой озона $r = +0,47$). В гомогенате печени увеличение содержания ДК, наблюдаемое через сутки после отмены тетрахлорметана, сменялось его снижением до нормы к 10 суткам. Введение озона в дозах 1 и 10 мкг/кг также при-

водило к снижению концентрации ДК до уровня опытного контроля, не отличаясь от нормы. Введение 100 мкг/кг озона приводило к снижению показателя, но он оставался выше опытного контроля на 76,4 % ($p < 0,05$) и нормы на 97,9 % ($p < 0,01$).

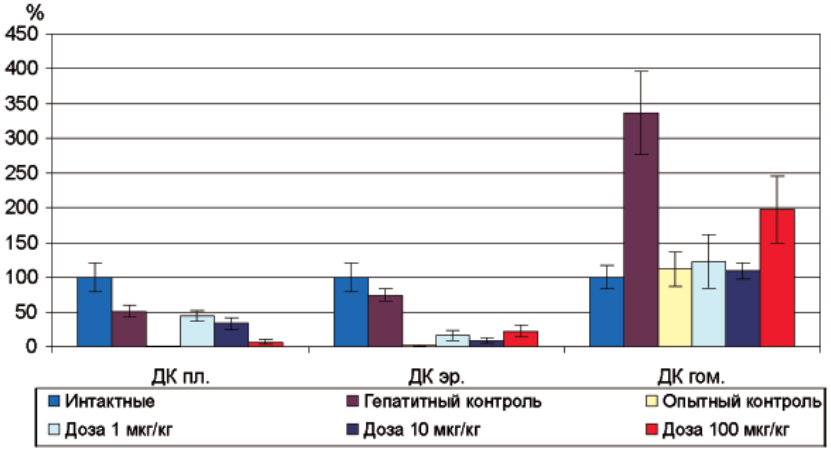

Рис. 6. Динамика концентрации диеновых конъюгатов в биосредах крыс при введении озона при моделировании токсического поражения 64 инъекциями тетрахлорметана

В плазме крови животных гепатитного контроля содержание МДА оставалось в пределах нормы, в то время как в группе опытного контроля снижалось до следовых количеств (0,29 ± 0,1 мкмоль/л). При введении озона в дозах 1 и 100 мкг/кг содержание данного показателя сохранялось нормальным, в то время как при применении дозы 10 мкг/кг оно росло по отношению к норме (на 30,3 %; $p < 0,05$). В эритроцитах крыс контрольных групп содержание МДА оставалось физиологическим. При введении озона наблюдалась обратная зависимость между содержанием МДА в эритроцитах крови крыс и дозой озона ($r = -0,74$). Введение 100 мкг/кг озона приводило к снижению показателя на 38,8 и 50,7 % ($p < 0,05$) к опытному контролю и к норме соответственно (рис. 7).

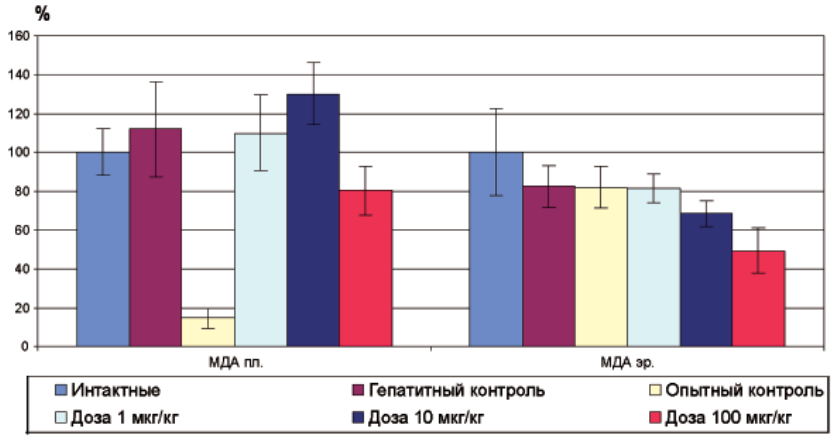

Рис. 7. Изменение концентрации малонового диальдегида в плазме и эритроцитах крови крыс при введении озона при интоксикации 64 инъекциями тетрахлорметана

При циррозе печени наиболее выраженные изменения содержания МДА выявлены в гомогенате печени крыс. Так, через сутки после отмены тетрахлорметана наблюдалось увеличение данного параметра в 6,1 раза ($p < 0,05$) по отношению к норме, а к 10 суткам он снижался, оставаясь выше нормы в 2,9 раза ($p < 0,05$). При использовании доз 1 и 10 мкг/кг уровень МДА гомогената печени снижался, превышая значения опытного контроля на 59 % ($p < 0,01$) и 35,5 % ($p < 0,05$) соответственно, а норму – в 6,1 раза ($p < 0,05$) и в 5,2 раза ($p < 0,05$) соответственно. Введение 100 мкг/кг озона приводило к снижению показателя до уровня опытного контроля, но он оставался выше нормы в 3,4 раза ($p < 0,05$).

Заключение

Таким образом, экспериментально показано, что при остром токсическом гепатите наиболее эффективны низкие дозы озона (1 и 10 мкг/кг), а при хроническом гепатите и циррозе печени требуются высокие дозы озона (10 до 100 мкг/кг).

Список литературы

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

2. Бояринов Г.А. Озонированное искусственное кровообращение. – Н. Новгород: Покровка, 1999. – 318 с.

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

4. Роль перекисного окисления липидов в механизме пролиферации фиброзной ткани печени при экспериментальном хроническом гепатите / А.И. Венгеровский [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1996. – № 2. – С. 37–39.

5. Восстановление экскреторной функции печени антиоксидантами при токсическом гепатите / Л.Ф. Виноградова [и др.] // Вестник РУДН, сер. Медицина. – 2000. – №2. – С. 53–55.

6. Перетягин С.П. Патофизиологическое обоснование озонотерапии постгеморрагического периода: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Казань, 1991. – 29 с.

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

8. Цапок П.И. с соавт. Метод обработки эритроцитарных мембран для биохимических исследований // Инф. листок № 72-99 ЦНТИ. – Киров – 1999. – 3 с.

9. Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozone therapy today // J. Biolog. Regulators and Homeostatic agents. – 1997. – Vol. 10, № 2/3. – P. 31–53.

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

Рецензенты:

Потемина Т.Е., д.м.н., зав. кафедрой патологической физиологии ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», г. Нижний Новгород;

Артифексова А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 04.04.2011.