

УДК 616-092.9; 616-092.19

ВЛИЯНИЕ СЕЗОННЫХ БИОРИТМОВ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ У КРЫС С ИНТОКСИКАЦИЕЙ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ^{1,2}Скупневский С.В., ¹Кабоева Б.Н., ^{1,2}Багагова Ф.Э., ¹Джиоев И.Г.¹ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владикавказ, e-mail: inal44@mail.ru;²ФГБУН Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра Российской академии наук и Правительства Республики Северная Осетия-Алания, Владикавказ

Изучение в разные периоды года (март, июнь, октябрь, декабрь) на 40 крысах линии Wistar одинакового возраста (90 ± 5 дней) содержания в крови гидроперекисей и малонового диальдегида выявило достоверные отличия, в то время, как активность каталазы сохраняла относительное постоянство. Однократное введение 40 крысам 0,4 мл 50,0% масляного раствора тетрахлорметана (доза токсиканта 0,2 мл/100 г), независимо от времен года, через сутки вызывает характерные для острого токсического гепатита нарушения кровообращения печени, очагово-диффузную жировую и гидропическую дистрофию гепатоцитов, местами переходящую в некроз. Одновременно повышаются содержания гидроперекисей и малонового диальдегида, особенно в осенне-зимнее время, и слабеет антиоксидантная защиты в этот период года.

Ключевые слова: тетрахлорметан, острый токсический гепатит, дистрофия гепатоцитов, гидроперекиси, малоновый диальдегид, каталаза

INFLUENCE OF SEASONAL BIORHYTHMS ON LIPID PEROXIDATION IN RATS DURING INTOXICATION WITH TETRACHLORMETHANE^{1,2}Skupnevsky S.V., ¹Kaboeva B.N., ^{1,2}Batagova F.E., ¹Dshioev I.G.¹North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, e-mail: inal44@mail.ru;²Institute of Biomedical Research of RAS VSC and Government of RNO-Alania, Vladikavkaz

Evaluation of the hydroperoxides and malondialdehyde content in blood performed on 40 Wistar rats of the same age (90 ± 5 days) revealed reliable differences between them, while the catalase activity is relatively constant during the different periods of year (March, June, October, December). Single injection of 50,0% tetrachlormethane oil solution to 40 rats at a dose of 0,2 ml/100 g within a day, irrespective of season, causes violations of blood circulation in liver, which are typical for acute toxic hepatitis, focal and diffuse globular fatty and hydropic dystrophy of hepatocytes passing sometimes into a necrosis. At the same time the contents of hydroperoxides and malondialdehyde raise, especially in autumn and winter time, and the antioxidant protection weakens during this period of year.

Keywords: carbon tetrachloride, acute toxic hepatitis, hepatocyte degeneration, hydroperoxides, malondialdehyde, catalase

Классическими вариантами создания экспериментального поражения печени с целью изучения механизмов патогенеза и последующего поиска новых гепатопротекторных средств, является модель токсического гепатита, вызванная введением лабораторным животным тетрахлорметана (CCl_4) [1, 4, 5, 8, 9, 10]. И, несмотря на то, что проявления такого гепатита достаточно описаны, но в современной научной литературе по медицине и токсикологии очень мало данных с учетом временной организации, а в имеющихся работах, как правило, описывается лишь роль циркадианных биоритмов, в то время как изучению длиннопериодических циклов, практически, не уделяется внимание, а при постановке хронических экспериментов, или при повторном проведении относительно коротких опытов, но в другое время года, полученные результаты могут значительно отличаться друг от друга, поэтому их объединение и трактовка как единое целое не совсем корректна. В связи с чем целью настоящей ра-

боты явилось изучение годовой динамики образования продуктов перекисного окисления липидов в модели тетрахлорметанового острого токсического гепатита у крыс.

Материалы и методы исследования

Опыты проводили четыре раза в году: марте, июне, октябре и в декабре, используя каждый раз по 40 крыс-самцов линии Wistar одинакового возраста (по 90 ± 5 дней, всего 160 голов). Во время экспериментов все животные находились на стандартной диете вивария со свободным доступом к пище и воде в условиях естественного освещения и непродолжительное время искусственного неяркого освещения, при температуре 20–24 °С.

Во время проведения опытов животных делили на две группы по 20 особей в каждой: экспериментальная и контрольная. Крысам опытной группы однократно через зонд в желудок вводили тетрахлорметан в дозе 0,2 мл/100 г, который смешивали с аналогичным объемом оливкового масла так как тетрахлорметан нерастворим в воде, то есть токсикант вводили в виде 50,0% масляного раствора в объеме 0,4 мл/100 г [4, 5] или же в меньшей дозе, но несколько раз [9].

Все проводимые мероприятия по введению крысам гепатотоксина соответствовали рекомендациям,

описанным в руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [3].

Временная структура эксперимента состояла во введении затравок животным в 11⁰⁰ (накануне опытов вечером крыс пересаживали в чистые клетки и не давали пищи), кормлением через пару часов и через сутки взятием крови из сердца, которое осуществлялось после внутрибрюшинного введения 0,1 мл/100 г общего анестетика в виде аптечного препарата «Золетила» (Франция), состоящего из тилетамина гидрохлорида (анестетик диссоциированного действия, не оказывающий угнетающего влияния на дыхательную систему) и золазепам гидрохлорида (усиливает анестетическое действие тилетамина, вызывает седативное действие, предотвращает судороги, ускоряет восстановление после наркоза). В плазме крови спектрофотометрически определяли содержание гидроперекисей (ГП), а в эритроцитах – малоновый диальдегид (МДА) и активность каталазы (КТ) [2, 6].

О создании модели токсического поражения печени после введения крысам гепатотоксиканта судили по морфологической картине, полученной при световой микроскопии (увеличение в 600 и 1500 раз), после предварительной фиксации биоматериала в 10,0% растворе формалина, изготовления срезов толщиной 7–8 мкм и их окраски гематоксилин-эозином. Содержание животных и постановка опытов проводились в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23 августа 2010 года «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Полученные результаты статистически обрабатывали, используя параметрический метод сравнения средних величин ($M \pm m$), достоверность отличий оценивалась по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Введение крысам тетрахлорметана сопровождается развитием оксидативного стресса в результате того, что на микро-сомах гепатоцитов образуются трихлорме-

тильные радикалы, инициирующие процессы перекисидации липидов [7], при этом степень выраженности печеночной патологии коррелирует с интенсивностью процессов липопероксидации.

Для уверенности в том, что описанные ниже результаты биохимических исследований обусловлены токсическим влиянием тетрахлорметана на печень, начнем с данных гистологических исследований, которые, с учетом того, что опыты ставились во все сезоны года, также проводились четыре раза, но так как при этом не было выявлено каких-либо существенных отличий в зависимости от времени года, представленное описание морфологической характеристики печени является обобщенным, а фотографии выбраны из наиболее полностью отражающих это состояние. Итак, введение крысам тетрахлорметана вызвало (рис. 1) неравномерное от слабого до умеренного кровенаполнение синусоидных капилляров и такое же неодинаковое, но уже до выраженной степени, расширение перисинусоидальных пространств Диссе. При этом на фоне значительной очагово-диффузной крупнокапельной жировой и гидрорической дистрофии гепатоцитов, балочно-радиарное строение долек было стерто. И несмотря на то, что в сохранившихся печеночных клетках отмечались признаки деления ядерного материала, одновременно во многих местах в пределах среднеочаговых долек отмечался некроз гепатоцитов, который в отдельных дольках доходил до субтотального. То есть отмеченные изменения после однократного введения тетрахлорметана можно охарактеризовать как токсический гепатит.

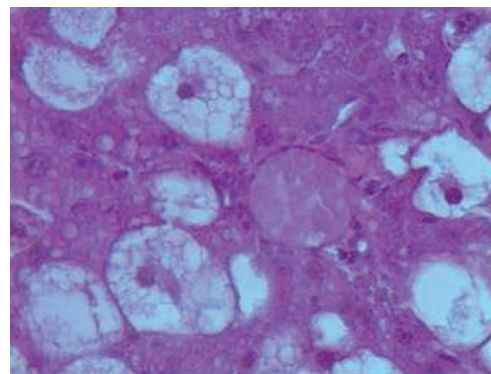
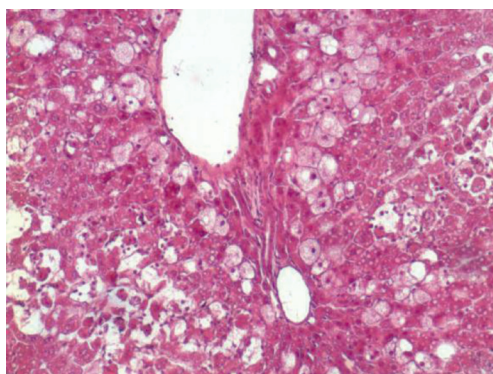


Рис. 1. Морфология печени крыс через сутки после однократного введения тетрахлорметана. Окраска гематоксилин-эозином (x600 и 1500)

Результаты содержания гидроперекисей и малонового диальдегида контрольных групп в течение года были по гидроперекисям следующие:

ми: в марте – $5,72 \pm 0,19$ мкмоль/л, в июне – $7,21 \pm 0,26$ мкмоль/л, в октябре – $7,23 \pm 0,75$ мкмоль/л и $8,08 \pm 0,28$ мкмоль/л в декабре.

Содержание малонового диальдегида мембран эритроцитов у крыс интактной группы весной было $54,02 \pm 0,77$ мкмоль/л, оставшись неизменным ($54,52 \pm 0,59$ мкмоль/л) летом, а осенью и зимой стало меньше – $36,38 \pm 2,76$ и $47,96 \pm 1,36$ мкмоль/л соответственно.

То есть, минимальным содержание гидроперекисей в плазме крови крыс было весной и максимальным – зимой, отличаясь друг от друга на 41,25%, а летом и осенью полученные результаты были почти одинаковыми. В отличие от этого уровень малонового диальдегида был минимальным осенью и максимальным зимой и летом, с отличием в 33,2%.

Введение крысам тетрахлорметана вызвало статистически значимое увеличение содержания гидроперекисей (рис. 2) во все исследуемые периоды, и в марте, по сравнению с результатами интактных животных, превышение было на 42,5% ($p < 0,001$), в июне на 21,2% ($p < 0,01$), в октябре на 42,8% ($p < 0,002$) и на 70,3% ($p < 0,001$) в декабре. А по содержанию малонового диальдегида (рис. 3) отмечались не столь однонаправленные изменения, в частности, весной и летом отмечалось снижение на 6,6% и 9,7%, но без статистически достоверного отличия, а осенью и зимой – повышение на 33,2% и 20,9%, уже имеющее статистически значимые ($p < 0,001$) отличия.



Рис. 2. Годовая динамика содержания гидроперекисей в плазме крови крыс после однократного введения тетрахлорметана



Рис. 3. Годовая динамика содержания малонового диальдегида в эритроцитах крыс после однократного введения тетрахлорметана

Изучение активности каталазы эритроцитов (рис. 4) показало, что активность фермента антиоксидантной защиты у ин-

тактных крыс по сезонам года не изменялась существенным образом, а отмеченные колебания были в пределах статистических

флуктуаций от $6,85 \pm 0,42 \times 10^{-4}$ ME на один грамм гемоглобина (минимальная активность летом) до $7,35 \pm 0,52 \times 10^{-4}$ ME/г Hb (максимальная активность осенью). Введение гепатотоксиканта вызвало тенденцию к снижению активности фермента, особенно осенью и зимой, но при этом результаты в октябре и декабре были практически

одинаковыми, что очевидно было обусловлено тем, что значительное (на 70,3%) увеличение зимой уровня первичного продукта перекисидации липидов гидроперекисей, осенью было компенсировано более выраженным увеличением (на 33,2%) малонового диальдегида, являющегося вторичным продуктом перекисного окисления липидов.



Рис. 4. Годовая динамика активности каталазы эритроцитов крыс после однократного введения тетрахлолорметана

Таким образом, в марте, июне, октябре и декабре у крыс линии Wistar одинакового возраста содержания в крови гидроперекисей и малонового диальдегида имеют статистически достоверные отличия, в то время, как активность каталазы сохраняет относительно постоянное. Введение тетрахлолорметана вызывает токсическое поражение печени и усиливает процесс перекисного окисления липидов, особенно в осенне-зимнее время, с одновременным ослаблением антиоксидантной защиты. При этом в условиях патологии расхождение между максимальными и минимальными значениями оказываются более выраженными, что необходимо учитывать при создании моделей токсического повреждения структур печени.

Список литературы

1. Большухин С.Ю. Экспериментальное изучение состояния липопероксидации при введении озона в условиях острой и хронической интоксикации / С.Ю. Большухин, А.А. Косых, С.П. Перетягин и др. // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 9. – Ч. 1. – С. 15–20.
2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – Мн.: МЕДпресс-информ, 2009. – 920 с.

3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

4. Сатановская В.И. Влияние пантенола и карнитина на ферменты обмена альдегидов в печени у крыс, пораженных тетрахлолорметаном / В.И. Сатановская, П.С. Пронько, А.В. Гайшманова и др. // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2009. – Т. 72, № 2. – С. 39–40.

5. Смольякова В.И. Антиоксидантные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлолорметаном / В.И. Смольякова, М.Б. Плотников, Г.А. Чернышова и др. // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2010. – № 5. – С. 98–101.

6. Справочник по лабораторным методам исследования / Под редакцией Даниловой Л.А. – Изд.: Питер, 2003. – 733 с.

7. Bhat S., Rao G., Murthy K.D. et al. Seasonal Variations in Markers of Stress and Oxidative Stress in Rats // *Indian J of Clin Biochem*. – 2008. – Vol. 23, № 2. – P. 191–194.

8. Boll M., Weber L.W., Becker E. et al. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites // *Z Naturforsch C*. – 2001. – Vol. 56, № 7–8. – P. 649–59.

9. Vinoth Kumar P., Sivaraj A., Elumalai E.K. et al. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats – protective role of aqueous leaf extracts of *Coccinia Grangis* // *Inter J of Pharm-Tech Research*. – 2009. – Vol. 1, № 4. – P. 1612–1615.

10. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model // *Crit Rev Toxicol*. – 2003. – Vol. 33, № 2. – P. 105–136.