

УДК 615.9:613.63

ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИМИ СРЕДСТВАМИ

Мышкин В.А.¹, Бакиров А.Б.¹, Репина Э.Ф.¹, Каримов Д.О.¹, Гимадиева А.Р.²,
Тимашева Г.В.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹, Срубиллин Д.В.³

1-ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

2-ФГБУН «Уфимский институт химии РАН», Уфа, Россия

3-ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия

Цель работы: объединить два взаимосвязанных процесса – перекисное окисление липидов (ПОЛ) и антиокислительную систему (АОС) – и одним цифровым значением показать направленность и глубину изменений в условиях их коррекции антиоксидантами и при отсутствии таковой.

В статье рассматривается возможность применения интегрального показателя окислительного стресса (ОС) в токсикологическом эксперименте. Приводятся конкретные результаты использования дибунола и оксиметилурацила при отравлении тетрахлорметаном, дихлорэтаном, этанолом, ПХБ-содержащим препаратом «Совтол-1», а также их комбинациями. Введение подопытным животным в качестве антиоксиданта оксиметилурацила, а также дибунола в значительной степени нормализует взаимодействие систем ПОЛ–АОС, приближая его к практически здоровым животным. Использование показателя ОС позволяет в более компактной форме представлять экспериментальный материал и расширяет возможности его теоретического обобщения.

Ключевые слова: коэффициент окислительного стресса K , гепатотоксические средства, оксиметилурацил, дибунол, перекисное окисление липидов, антиокислительная система

INTEGRAL ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS IN POISONING WITH HEPATOTOXIC AGENTS

Myshkin V.A.¹, Bakirov A.B.¹, Repina E.F.¹, Karimov D.O.¹, Gimadiev A.R.², Timasheva G.V.¹,
Khusnutdinova N.Yu.¹, Srubilin D.V.³

1-Ufa Research Institute of Occupational Health and Hyman Ecology, Ufa, Russia

2-Ufa Institute of Chemistry of RAS, Ufa, Russia

3-Bashkirian State Medical University, Ufa, Russia

The purpose of the study is to unite two interconnected processes - lipid peroxidation (LPO) - antioxsidative system (AOS) and to determine the trend and in-depth changes using a single digit quantity under the conditions of their correction by antioxidants and without it.

The paper considers a possibility of using an integral index of oxidative stress (OS) in toxicologic experiments. Certain results of using dibunol and oximethyluracil in intoxication by tetrachlormethan, dichloretan, etanol, PCB-containing Sovtol-1 as well as their combinations. Administration of oximethyluracil as an oximethyluracil antioxidant into the experiomental animals as well asdibunol greatly normalizes a relat5ionship between LPO-AOS systems making it closer to

healthy animals. The use of the K OS index makes it possible to present the experimental material in a compact form and raises possibilities of its theoretical generalization.

Key words: *oxidative stress K index, hepatotoxic agents, oximethyluracil, dibunol, lipid peroxidation, antioxidative system*

Важнейшим патогенетическим фактором развития поражения печени ксенобиотиками (промышленными ядами, лекарственными средствами и др.) являются свободнорадикальные процессы, сопровождающиеся усилением образования активных форм кислорода (АФК), ПОЛ и ослаблением АОС.

Для характеристики процессов ПОЛ в токсикологических исследованиях определяются диеновые конъюгаты (ДК) и ТБК-реагирующие продукты (ТБК-рп). Для характеристики системы ингибирующих процессы образования свободных радикалов или инактивирующих продукты ПОЛ на клеточном или субклеточном уровнях – ферменты: супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГПО) или природные вещества, обладающие высокой антирадикальной активностью – токоферолы, тиолы или аскорбиновая кислота. Часто определяют активность SH-групп, восстановленного глутатиона, что связано с более простыми методами исследования и менее дефицитными и дорогостоящими реактивами [1, 5].

Длительное воздействие ксенобиотиков (гепатотоксических веществ) часто вызывает гиперметаболическое состояние печени с повышенным потреблением кислорода гепатоцитами. Уменьшается концентрация витаминов А и Е, а также глутатиона. Дефицит витамина Е усиливает ПОЛ, а нехватка витамина А способствует повреждению лизосом, снижение уровня глутатиона ведет к нарушению функций митохондрий и повышает чувствительность клеток к апоптозу. Все это приводит к истощению уровня АТФ и повреждению печени. Гипоксия, наряду с воспалением и стрессорной реакцией, является важнейшим патофизиологическим фактором усиления свободнорадикальных процессов в организме.

Для разработки наиболее эффективной патогенетической терапии токсического поражения печени необходимы исследования тонких молекулярно-клеточных механизмов развития повреждения, в том числе на основе взаимосвязи процессов ПОЛ и эндогенной АОС в зависимости от степени токсического поражения печени.

Материалы и методы.

Интегральную оценку окислительного стресса проводили по значению коэффициента окислительного стресса (К) по формуле:

$$K = \left(\frac{\text{ТБК-РП}_0}{\text{ТБК-РП}_K} + \frac{\text{ДК}_0}{\text{ДК}_K} + \frac{\text{ИДС}_0}{\text{ИДС}_K} \right) \div \left(\frac{\text{КАТ}_0}{\text{КАТ}_K} + \frac{\text{ГП}_0}{\text{ГП}_K} + \frac{\text{Г-SH}_0}{\text{Г-SH}_K} \right),$$

где ТБК-РП₀ – содержание ТБК-реагирующих продуктов в печени отравленных крыс;

ТБК-РП_к – содержание ТБК-реагирующих продуктов в печени здоровых крыс;

ДК₀ – содержание диеновых конъюгатов в печени отравленных крыс;

ДК_к – содержание диеновых конъюгатов в печени здоровых крыс;

ИДС₀ – содержание изолированных двойных связей в печени отравленных крыс;
 ИДС_к – содержание изолированных двойных связей в печени здоровых крыс;
 КАТ₀ – активность каталазы в печени отравленных крыс;
 КАТ_к – активность каталазы в печени здоровых крыс;
 ГПО – активность глутатионпероксидазы в печени отравленных крыс;
 ГПК – активность глутатионпероксидазы в печени здоровых крыс;
 Г-SH₀ – содержание восстановленного глутатиона в печени отравленных крыс;
 Г-SH_к – содержание восстановленного глутатиона в печени здоровых крыс.

К определяли для каждого животного, получали среднее значение и ошибку среднюю для каждой группы.

Повреждение печени моделировали путем введения белым крысам-самцам гепатотоксических веществ в следующих дозах:

- * этанол: 7мл/кг массы тела ежедневно в течение 7 дней;
- * тетрахлорметан (ТХМ): 2 мл/кг массы тела через день в течение 30 дней;
- * ПХБ-содержащий препарат Совтол-1: 0,25мл/100 г массы тела дважды в неделю в течение 28 суток + 10% раствор этанола для питья (Патент РФ № 2197018 от 16.02.2000);
- * ТХМ: по 4 мл/кг массы тела крысы 50% масляного раствора, а через 3 часа этилового спирта в желудок по 12,5 мл/кг массы тела 40% раствора в течение 4 дней. Тестирование показателей на 7 сутки;
- * дихлорэтан: 0,01DL50 в течение 3 недель в 10% растворе оливкового масла в желудок;
- * Совтол-1: 0,25мл/100 г массы тела дважды в неделю в течение 4 недель (Патент РФ № 2188457 от 27.08.2002).

Продукты ПОЛ – изолированные двойные связи (ИДС) и диеновые конъюгаты (ДК) – определяли спектрофотометрическим методом [3]. ТБК-реагирующие продукты по общепринятому методу [2]. Состояние АОС оценивали по активности каталазы, глутатионпероксидазы и содержанию в печени восстановленного глутатиона [4].

Таблица 1

Состояние окислительного стресса в печени при введении крысам гепатотоксических средств

Токсиканты (группа крыс)	Модели	Показатели (относит. значения)		
		Σ ПОЛ	Σ АОС	$\frac{\Sigma \text{ПОЛ}}{\Sigma \text{АОС}}$
Контроль	норма	95,1	92,0	1,04
Этанол	гепатит	6,67	2,38	2,8
Совтол-1	гепатопатия	8,13	3,03	2,68
ТХМ	гепатит	5,57	1,71	3,25
ТХМ+этанол	гепатит	5,36	1,48	3,62
2-ДХЭ	гепатопатия	5,1	1,84	2,77
Совтол-1+этанол	токсический цирроз	5,44	1,1	4,9

Примечание: ТХМ – тетрахлорметан, 2-ДХЭ – дихлорэтан.

Результаты и обсуждение.

Анализируя полученные данные (табл. 1), можно заключить, что при воздействии гепатотоксических средств в организме животных происходит срыв адаптационных механизмов: идет накопление продуктов ПОЛ и одновременно подавляется активность показателей АОС.

Введение подопытным животным антиоксидантов дибунола и оксиметилурацила в значительной степени нормализует баланс систем ПОЛ и АОС.

Для иллюстрации приводим данные по изучению протективного действия синтетических антиоксидантов дибунола в дозе 250 мг/кг и оксиметилурацила в дозе 50 мг/кг при профилактическом применении у крыс с токсическим циррозом печени, моделируемым ПХБ-содержащим препаратом Совтол-1 и этанолом (модель является оригинальной, разработанной в отделе токсикологии УфНИИ медицины труда и экологии человека; авторские права защищены патентом РФ № 2197018 от 16.02.2000). Полученные результаты представлены в таблице 2. Они показывают, что у крыс защищенных антиоксидантами, взаимодействие систем ПОЛ и АОС приближается к показателям аналогичных систем у здоровых животных.

Таблица 2

Влияние дибунола и оксиметилурацила на состояние окислительного стресса у крыс при комбинированном поражении печени – Совтолом-1 и этанолом, ($M \pm m$), $n=6$

показатели	Значение показателей в контрольной и опытной группах			
	I группа (контроль)	II группа (дибунол)	III группа (оксиметилурацил)	IV группа (Совтол-1+этанол)
ИДС, усл.ед. опт.пл./100 г	2,7±0,1	4,3±0,6	2,2±0,5	5,5±0,2
ДК, усл.ед. опт.пл./100 г	2,0±0,1	3,2±0,2	2,8±0,3	4,1±0,6
ТБК-РП, ммоль/г	90,4±4,1	98,2±4,0	102,0±13,0	123,3±3,4
КАТ, ммоль/мин/г белка	58,3±3,1	32,8±6,0	33,2±4,8	13,9±2,6
ГП, мкмоль/мин/г белка	20,6±1,0	16,3±2,4	18,0±3,5	11,4±4,1
Г-SH, мкмоль/г	13,1±3,8	8,8±0,7	8,8±0,6	4,2±0,25
К, усл.ед.	1,04	2,8	2,7	4,9

Примечание: ИДС – изолированные двойные связи ($\lambda=220$ нм); ДК – диеновые конъюгаты ($\lambda=232$ нм); ТБК-РП – ТБК-реагирующие продукты ($\lambda=532$ нм); КАТ – каталаза; ГП – глутатионпероксидаза; Г-SH – глутатион восстановленный; * $p<0,05$ между I и IV группами контроля; ** $p<0,05$ различие с группой IV(Совтол-1+этанол).

Таким образом, коэффициент окислительного стресса К является чувствительным параметром для оценки выраженности и глубины окислительного стресса на моделях токсического поражения печени этанолом, дихлорэтаном, тетрахлорметаном, ПХБ-

содержащим препаратом «Совтол-1», а также при комбинированном поражении: ТХМ +этанол и «Совтол-1»+этанол; позволяет одним цифровым значением выразить направленность и глубину изменений двух процессов – ПОЛ и АОС.

При интегральной оценке состояния ПОЛ и АОС у крыс с токсическим поражением печени с помощью расчетного коэффициента окислительного стресса K выявлено, что у крыс с алкогольным гепатитом его значение превышало норму в 2,8 раза, у крыс с совтоловой гепатопатией – в 2,68 раза, у крыс с тетрахлорметановым гепатитом – в 3,25 раза, у крыс с гепатопатией, вызванной введением дихлорэтана, – в 2,77 раза, а у крыс с комбинированным воздействием ТХМ+этанол и «Совтол-1»+этанол – в 3,62 и 4,9 раза соответственно.

Проводимая антиоксидантная терапия дибунолом и оксиметилурацилом оказывает корректирующее влияние на выраженность окислительного стресса в группе крыс с комбинированным поражением печени ПХБ-содержащим препаратом «Совтол-1» и этанолом.

Использование коэффициента окислительного стресса K позволяет в более компактной форме представить экспериментальной материал и расширяет возможности его теоретического обобщения.

Можно констатировать, что в патогенезе токсических поражений печени важную роль играет окислительный стресс и дальнейшая разработка лекарственной терапии, направленной на коррекцию состояния эндогенной АОС и ПОЛ экзогенными антиоксидантами, является актуальной научной задачей.

Список литературы:

1. Абакумов М.М., Давыдов Б.В., Голиков А.П., Голиков П.П. и др. Способ интегральной оценки окислительного стресса при неотложных состояниях / Описание изобретения к Патенту от 27.03.2004 (Заявка 2002105650-152002105650-15, 05.03.2002).
2. Волчегорский И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.С. Колесников. – Челябинск, 2000. – 167 с.
3. Копылова Т.Н., Майоре А.Я. Перекисное окисление липидов при остром и хроническом отравлении этанолом // Вопросы биохимии патологических процессов. – Рига: Знание, 1979. – С.24–27.
4. Львова С.П., Абаева и др. Антиоксидантная система тканей крыс при гипотермии и введении даларгина // Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т.48. – С. 189–195.
5. Олейник А.Н. Влияние антиоксиданта на перекисное окисление липидов при комбинированном поражении печени //Фарм. и токс. – 1983. – № 3. – С. 102–105.