

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.36-002-009-615.917'412.133-06:616-008.9-085.276

Я.И. ГОНСКИЙ, М.М. КОРДА, И.Н.КЛИЩ, Л.С. ФИРА

КОРРЕКЦИЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ И α -ТОКОФЕРОЛОМ НАРУШЕНИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ОСТРОМ ХИМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

Кафедра биохимии Тернопольского медицинского института

Острые и хронические травления различными химическими соединениями — важнейшая проблема современной медицины. Она возникает в связи с широкой распространенностью токсикоманий и алкоголизма, химизацией быта, промышленности и сельского хозяйства. Поэтому актуальной является разработка новых, эффективных методов терапии токсических поражений печени. Ранее нами было показано положительное влияние диметилсульфоксида (ДМСО) на состояние системы антиоксидантной защиты при токсическом гепатите [2]. Настоящая работа является продолжением начатого исследования. Ее цель — изучение возможности коррекции ДМСО, а также комбинаций ДМСО + α -токоферол нарушенных при химическом поражении печени процессов митохондриального и микросомального окисления, а также процессов, протекающих по свободнорадикальному механизму.

Методика. Опыты проведены на белых лабораторных крысах-самцах с массой тела 180—200 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария. Токсический гепатит вызывали путем подкожного введения 50% масляного раствора тетрахлорметана в дозе 2 г/кг на протяжении 4 дней [4]. ДМСО в дозе 1 г/кг и токоферола ацетат в дозе 30 мг/кг вводили подкожно ежедневно на протяжении всего опыта. Исследуемых животных разделили на 5 групп: 1-я — интактные, 2-я — контроль (CCl_4), 3-я — CCl_4 + ДМСО, 4-я — CCl_4 + токоферол, 5-я — CCl_4 + ДМСО + токоферол. На 7-е сутки от начала введения CCl_4 животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Исследовали ткань печени. Микросомы гепатоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [5].

Активность окислительных процессов в микросомах определяли полярографическим методом в среде, содержащей 100 мМ трис-НСI-буфер рН 7,4, 1 мМ ЭДТА, 16 мМ $MgCl_2$ с добавлением 1 мМ НАДФН, 6 мМ диметиланилина (ДМА) и 3 мМ анилина, на полярографе РА-2 (Чехословакия) с помощью открытого платинового электрода. Для определения функциональной активности микросом рассчитывали следующие показатели: скорость поглощения кислорода при окислении эндогенных субстратов ($V_{энд}$), при стимулировании экзогенным НАДФН ($V_{НАДФН}$), диметиланилином ($V_{ДМА}$) и анилином ($V_{ан}$), а также рассчитывали коэффициент стимулирования по отношению $V_{НАДФН}/V_{энд}$.

Об интенсивности свободнорадикального окисления судили по параметрам хемилюминесценции (ХЛ) [1]. Использовали квантометрическую установку, детектором излучения в которой служил ФЭУ-39 А, а в качестве блока индикации использовали электронно-вычислительное устройство ПР-14 М. Графическое отображение процесса получали с помощью самописца КСП-4. При изучении спонтанной ХЛ в кювету вносили 0,5 мл 10% гомогената печени и добавляли 4,5 мл 0,02 М фосфатного буфера рН 7,8. Интенсивность свечения выражали количеством импульсов за 10 с. Затем в кювету вводили 0,5 мл 3% перекиси водорода и на самописце регистрировали вспышку ХЛ. Амплитуду вспышки измеряли от фонового уровня до верхнего уровня свечения и результат выражали в условных единицах.

Митохондрии гепатоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [3]. Скорость дыхания и окислительного фосфорилирования определяли полярографическим методом [5], который позволяет идентифицировать метаболические состояния митохондрий по Чансу и рассчитывать скорость дыхания в этих состояниях: V_2 — к митохондриям добавлен экзогенный субстрат, но нет акцептора фосфора; V_3 — митохондрии обеспечены и субстратом окисления, и АДФ. Также рассчитывали скорость дыхания митохондрий при действии разбавителя динитрофенола — $V_{ДНФ}$, дыхательный контроль по Чансу — ДК, а также соотношение V_2/V_4 , которое характеризует способность митохондриальных мембран удерживать энергетический потенциал (V_4 — скорость дыхания при условии истощения акцептора фосфора в системе).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури. Все экспериментальные данные обрабатывали статистическим методом с использованием параметра Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Острое отравление крыс тетрахлорметаном сопровождается существенными нарушениями процессов микросомального окисления. Как видно из данных табл. 1, у животных 2-й группы на 36% уменьшалась скорость поглощения кислорода микросомами при окислении эндогенных субстратов ($V_{энд}$), нарушалась НАДФН-зависимая цепь эндоплазматического ретикулума (на 31% снизилась скорость поглощения O_2 при введении в систему НАДФН), достоверно снижалась величина коэффициента стимулирования дыхания микросом, на 22 и 26% снижалась НАДФН-зависимая скорость окисления соответственно ДМА и анилина. При введении пораженным животным ДМСО наблюдалось достоверное улучшение показателей $V_{энд}$ и $V_{ан}$. В то же время терапия токоферола ацетатом достоверно улучшила все пять показателей функциональной активности микросом. Но наиболее выраженный эффект был

Таблица 1

Влияние ДМСО и α -токоферола на поглощение кислорода микросомами печени крыс с токсическим гепатитом (нмоль O_2 на 1 мг белка в минуту: $M \pm m$, $n=10$)

Группа животных	V_{ac}	$V_{H_2O_2}$	V_{DMA}	V_{DH}	$V_{H_2O_2}/V_{ac}$
Интактные	9,70 \pm 0,40	15,2 \pm 0,50	8,70 \pm 0,50	5,50 \pm 0,50	1,60 \pm 0,03
CCl ₄	6,20 \pm 0,04*	9,40 \pm 0,03*	6,80 \pm 0,04*	4,10 \pm 0,30*	1,41 \pm 0,05*
CCl ₄ + ДМСО	7,20 \pm 0,30**	9,42 \pm 0,20	6,86 \pm 0,10	5,02 \pm 0,06**	1,31 \pm 0,08
CCl ₄ + токоферол	7,46 \pm 0,09**	11,18 \pm 0,40**	7,40 \pm 0,08**	5,00 \pm 0,04**	1,59 \pm 0,01**
CCl ₄ + ДМСО + токоферол	9,22 \pm 0,28**	13,80 \pm 0,20**	7,62 \pm 0,08**	5,26 \pm 0,04**	1,50 \pm 0,02**

Примечание: Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка — различия достоверны по сравнению с данными у интактных животных ($p < 0,01-0,05$); две звездочки — различия достоверны по сравнению с данными у животных с токсическим гепатитом ($p < 0,01-0,05$)

получен при совместном использовании ДМСО и токоферола ацетата. Так, у животных 5-й группы скорость окисления эндогенных субстратов микросомами гепатоцитов уже достоверно не отличалась от нормы. В значительной степени нормализовались также остальные параметры полярограммы.

Наряду со значительными и, вероятно, первичными изменениями в функционировании ферментных комплексов мембран эндоплазматической сети при токсическом гепатите имеет место поражение митохондрий гепатоцитов и нарушение биоэнергетических процессов в клетках. Как видно из табл. 2, действие гепатотоксина уменьшало скорость поглощения кислорода митохондриями в 2 раза как при отсутствии акцептора фосфора (V_2), так и при его наличии. Скорость дыхания митохондрий при добавлении к ним разобщителя (V_{DH}) у пораженных животных также была достоверно ниже. Одним из наиболее информативных параметров состояния системы окислительного фосфорилирования является коэффициент ДК. В наших исследованиях зафиксировано снижение этого показателя в 1,5 раза, что свидетельствует о нарушении под влиянием токсина регуляторных взаимоотношений между окислительным фосфорилированием и скоростью транспорта электронов. Почти вдвое снизил-

Таблица 2

Влияние ДМСО и α -токоферола на поглощение кислорода (нг-ат. O_2 на 1 мг белка в минуту) и сопряжение дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс с токсическим гепатитом ($M \pm m$, $n=10$)

Показатель	Интактные животные	CCl ₄	CCl ₄ + ДМСО	CCl ₄ + токоферол	CCl ₄ + ДМСО + токоферол
V_2	41,6 \pm 2,0	20,9 \pm 2,6*	20,6 \pm 0,8	28,4 \pm 1,2**	34,4 \pm 1,4**
V_3	97,3 \pm 4,1	50,7 \pm 4,7	60,4 \pm 2,2	66,4 \pm 2,0**	68,5 \pm 2,8**
V_4	36,2 \pm 3,1	28,0 \pm 1,9*	30,5 \pm 1,4	32,5 \pm 1,2	32,8 \pm 1,9
V_{DH}	161,7 \pm 10,0	130,5 \pm 5,8	148,6 \pm 4,2**	150,8 \pm 4,6**	156,0 \pm 5,6**
ДК	2,7 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2*	2,2 \pm 0,3	1,9 \pm 0,4	2,3 \pm 0,2
V_2/V_4	1,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,05*	0,7 \pm 0,02	0,9 \pm 0,01**	1,0 \pm 0,02**

ся еще один важный параметр, характеризующий способность митохондриальных мембран удерживать энергетический потенциал, — V_2/V_4 . ДМСО достоверно предупреждал падение скорости поглощения кислорода при введении в систему динитрофенола ($V_{ДНФ}$). В то же время под влиянием токоферола ацетата достоверно улучшались 4 показателя — V_2 , V_3 , $V_{ДНФ}$, V_2/V_4 . Как и в случае с микросомами, наиболее выраженный эффект нами зафиксирован при совместном использовании ДМСО с токоферолом. Так, у животных 5-й группы показатели $V_{ДНФ}$ и V_2/V_4 практически приближались к норме, в значительной степени повышалась также скорость поглощения кислорода в метаболических состояниях V_2 и V_3 (соответственно на 70 и 36% по сравнению с животными 2-й группы).

Значительная эффективность совместного использования ДМСО и α -токоферола подтверждается также результатами изучения параметров ХЛ (табл. 3). Под влиянием данной комбинации почти в 2 раза снизилась интенсивность спонтанного свечения и на 26% снизилась амплитуда вспышки ХЛ. Вероятно, такое угнетение процессов свободнорадикального окисления связано с непосредственным антирадикальным и мембраностабилизирующим действием α -токоферола в липидной фазе, антирадикальным действием ДМСО в водной фазе, облегчением доставки витамина Е к участкам мембран с активированным свободнорадикальным окислением за счет способности ДМСО улучшать проникновение различных веществ в биологические ткани. Возможно, что избыточное количество ДМСО предохраняет α -токоферол от окисления и сохраняет его биологическую активность. Угнетение активированных процессов липопероксидации ДМСО и витамином Е приводит к стабилизации уникальной структуры биомембран, в том числе мембран микросом и митохондрий, что способствует сохранению функциональной активности ферментных комплексов, обеспечивающих процессы микросомального и митохондриального окисления.

Таким образом, комплексное использование препаратов, действующих как в цитозольном, так и в мембранном компартментах клетки — ДМСО и α -токоферола, дает выраженный эффект, на всех исследуемых уровнях более оптимальный, чем эффекты ДМСО и α -токоферола в отдельности. Этот факт позволяет говорить о целесообразности дальнейшего изучения всех возможных аспектов действия предлагаемой комбинации препаратов с возможной перспективой их использования в клинике острых отравлений гепатотропными ксенобиотиками.

Таблица 3
Влияние ДМСО и α -токоферола на показатели спонтанной и инициированной ХЛ печени крыс с токсическим гепатитом ($M \pm m$, $n=10$)

Группа животных	Спонтанная ХЛ, имп/10 с	Амплитуда вспышки инициированной ХЛ, усл. ед.
Интактные	34,9 \pm 1,1	233,0 \pm 21,6
CCl ₄	117,0 \pm 10,0*	597,0 \pm 57,9*
CCl ₄ + ДМСО	102,2 \pm 5,4	585,0 \pm 34,7
CCl ₄ + токоферол	80,5 \pm 5,8**	444,6 \pm 28,7**
CCl ₄ + ДМСО + токоферол	65,4 \pm 4,6**	446,3 \pm 34,6**

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселовский В.А. Спектроскопические методы исследования в физиологии и биохимии. — Л., 1987. — С. 34-37.
2. Гонский Я.И., Корда М.М., Клищ И.Н. // *Вопр. мед. химии*. — 1992. — Т. 38, N 2. — С. 43-44.
3. Карузина И.И., Арчаков А.И. // *Современные методы в биохимии*. — М., 1977. — С. 49-62.
4. Левшин Б.И. Экспериментальная фармакотерапия препаратами селена и тиазолидина токсического поражения печени: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1973.
5. Франк Г.М., Кондрашева Е.И., Мохова Е.И. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М., 1973.

Поступила 10.10.94

CORRECTION OF OXIDATION DISORDERS WITH DIMETHYL SULFOXIDE AND α -TOCOPHEROL IN ACUTE CHEMICAL HEPATIC DAMAGE

Ya. I. Gonsky, M. M. Korda, I. N. Klishch, L. S. Fira

The concomitant use of dimethyl sulfoxide and tocopherol acetate in rats with toxic liver damage induced by tetrachloromethane has been demonstrated to effectively normalize the processes of mitochondrial, microsomal, and free radical oxidation.