

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.352.3

©Коллектив авторов

### ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, АКТИВНОСТЬ $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы И ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ НЕФРОПАТИИ У КРЫС, ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЛОРИДОМ КОБАЛЬТА

*А.И. Тедтоева\*, Ф.С. Дзугкоева, И.В. Можяева, С.Г. Дзугкоев*

Учреждение Российской Академии наук институт биомедицинских исследований  
Владикавказского научного центра РАН и правительства РСО – Алания,  
РСО – Алания 362019, Владикавказ, ул. Пушкинская, 40; тел.: (918)8298747;  
эл. почта: angik.74@mail.ru

Хроническая интоксикация хлоридом кобальта сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), угнетением активности супероксиддисмутазы и компенсаторным повышением активности каталазы. Мембранотоксическое действие приводит к торможению активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, угнетению функционального состояния почек, угнетению скорости клубочковой фильтрации и уровня канальцевой реабсорбции воды, уменьшению объема спонтанного диуреза. Одновременно нарушается электролитовыделительная функция почек, понижается экскреция натрия вследствие угнетения  $R_{\text{Na}}$  в почечных канальцах на фоне снижения уровня  $\text{ФЗ}_{\text{Na}}$ .

**Ключевые слова:** кобальт, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, почки, антиокислительная защита клеток.

**ВВЕДЕНИЕ:** Растущие объёмы производства тяжелых металлов (в том числе кобальта) являются причиной поступления и накопления ксенобиотиков в организме, что отрицательно отражается на здоровье человека.

Кобальт (Co) – микроэлемент, являющийся жизненно необходимым биотиком. Важнейшим комплексом трехвалентного кобальта является витамин  $\text{B}_{12}$ . В клетках кобальт может находиться не только в форме витамина  $\text{B}_{12}$  и его производных кобамидных коэнзимов, но и в форме иона, образующего комплексы с рядом органических соединений [1].

Несмотря на биологическую важность этого микроэлемента, избыточное его поступление в организм вызывает патологические изменения в органах и тканях. Известны кобальтовые кардиомиопатии [2, 3], развитие заболеваний дыхательной системы (риниты, бронхиты, фарингиты, ларингиты, пневмонии) и контактные дерматиты [2, 4]. Согласно данным литературы, преобладающее количество Co из крови захватывается печенью и почками и экскретируется Co, в основном, с желчью и мочой [5, 6]. Выявлены корреляционные взаимосвязи между эффектами, вызванными различными дозами, путями поступления металла в организм и его содержанием в органах, крови и экскрецией с мочой [5, 7].

Однако в доступной литературе представлены немногочисленные данные о влиянии хлорида кобальта на функциональное состояние почек и систему перекисного окисления липидов и антиокислительную защиту клеток в эксперименте у крыс.

\* - адресат для переписки

## СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПРИ НЕФРОПАТИИ

Целью настоящего исследования было изучение роли метаболических нарушений, включая перекисное окисление липидов (ПОЛ) и антиоксидантную защиту клеток (АОЗ) при развитии нефропатии у крыс, вызванной введением хлорида кобальта.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 250 г. Хроническую интоксикацию вызывали путем ежедневного введения животным раствора хлорида кобальта подкожно в дозе 6 мг/кг в течение 2 недель и 1 месяца. В соответствии с этим животные были разбиты на 3 группы:

- 1) интактные крысы (контроль);
- 2) животные, получавшие хлорид кобальта парентерально в дозе 6 мг/кг в течение 2 недель;
- 3) животные, получавшие хлорид кобальта парентерально в дозе 6 мг/кг в течение 1 месяца.

Исследовали следующие показатели водо- и электролитовыделительной функции почек: величину спонтанного диуреза, клубочковую фильтрацию (КФ) и канальцевую реабсорбцию воды ( $R_{H_2O}$ ), экскреция  $Na^+$  ( $E_{Na}$ ) и  $K^+$  ( $E_K$ ), фильтрационный заряд  $Na^+$  ( $\Phi Z_{Na}$ ) и  $K^+$  ( $\Phi Z_K$ ), реабсорбцию  $Na^+$  ( $R_{Na}$ ). Об интенсивности ПОЛ в мембранах эритроцитов и в гомогенатах коркового и мозгового слоев почечной ткани судили, определяя содержание малонового диальдегида (МДА) по методу Osakawa T. [8]. О состоянии антиоксидантной защиты (АОЗ) судили по активности каталазы в сыворотке крови, которую определяли по методу Королюка и соавт. [9]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) по торможению автоокисления адреналина. Изучали активность  $Na^+$ - $K^+$ -АТФазы в корковом и мозговом слоях почечной ткани методом Scou [10].

Весь полученный материал подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента на ПК типа IBM PC с использованием программы Microsoft Excel.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Введение хлорида кобальта приводило к изменению водовыделительной функции почек, выражавшемуся в угнетении спонтанного диуреза. Снижение величины спонтанного диуреза зависело от длительности введения хлорида кобальта. Причиной снижения диуреза является уменьшение скорости клубочковой фильтрации как через 2 недели, так и при хроническом введении в течение 1 месяца (табл. 1). Полученные данные при этом высоко достоверны (табл. 1).

Таблица 1. Влияние хлорида кобальта на показатели водо- и электролитовыделительной функции почек крыс.

№	изучаемый параметр	контроль	введение $CoCl_2$ 6 мг/кг 2 нед	введение $CoCl_2$ 6 мг/кг 1 мес
1	диурез (мл/ч)	0,091±0,003	0,07±0,002****	0,02±0,009****
2	КФ (мл/час/100г)	14,69±0,40	11,10±0,29****	8,4±1,61****
3	$R_{H_2O}$ (%)	99,37±0,037	99,52±0,015***	99,6±0,08***
4	$E_{Na}$ (мэкв/час)	9,38±0,26	10,16±0,18**	8,08±0,36***
5	$\Phi Z_{Na}$ (мэкв/час)	1658,16±52,93	1506,45±41,77*	1140,02±24,13****
6	$R_{Na}$ (%)	99,49±0,092	99,32±0,023***	99,29±0,026*
7	$E_K$ (мэкв/час)	6,32±0,36	7,09±0,14*	4,31±0,64***
8	$\Phi Z_K$ (мэкв/час)	53,85±1,47	43,33±1,27****	32,79±1,82****

Примечание: Здесь и в таблицах 2 и 3 статистическая значимость различий с контролем: \* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,02$ ; \*\*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\*\* -  $p<0,001$ .

Угнетение водовыделительной функции почек сопровождается нарушением электролитовыделительной функции, повышением экскреции Na и K с мочой на фоне введения  $\text{CoCl}_2$  в течение 2 недель. При более длительном введении  $\text{CoCl}_2$  (в течение 1 месяца) отмечали задержку  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в организме (т.е. снижение натрий-калиуреза).

Изменение экскреции электролитов сопровождалось угнетением уровня фильтрационного заряда  $\text{Na}^+$  ( $\text{ФЗ}_{\text{Na}}$ ) и  $\text{K}^+$  ( $\text{ФЗ}_{\text{K}}$ ), и одновременно статистически достоверным снижением канальцевой реабсорбции  $\text{Na}^+$  ( $\text{R}_{\text{Na}}$ ) (табл. 1).

Следовательно, изменения экскреции  $\text{Na}^+$  обусловлены не только изменением фильтрационного заряда катиона, но и нарушением его канальцевой реабсорбции. Для анализа механизма нарушения канальцевой реабсорбции Na мы определяли активность мембраносвязанного фермента  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТРаза}$  в корковом и мозговом слоях почечной ткани. Данные показали значительное снижение активности  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТРаза}$  как в мозговом, так и в корковом слоях почечной ткани (табл. 2). Если сравнить данные, полученные при введении хлорида кобальта в течение 2 недель и 1 месяца видно, что более длительное введение приводило к более выраженному угнетением  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТРаза}$ .

Таблица 2. Влияние хлорида кобальта на активность  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТРаза}$  коркового и мозгового слоя почек крыс.

изучаемый параметр	контроль	введение $\text{CoCl}_2$ 6 мг/кг 2 нед	введение $\text{CoCl}_2$ 6 мг/кг 1 мес
$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТРаза}$ (корк. сл.)	3,12±0,33	2,141±0,285*	1,318±0,1248****
$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТРаза}$ (мозг. сл.)	6,68±0,29	5,07±0,32185***	3,15±0,12606****

Примечание. Активность  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТРаза}$  выражена в мкмоль Pi/мг белка/ч.

Поскольку одним из механизмов, по данным литературы [11, 12] повреждающим структуры нефрона, является ПОЛ, мы исследовали содержание МДА в эритроцитах, корковом и мозговом слоях почек (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение уровня МДА в исследуемых тканях происходило при введении хлорида кобальта как в течение 2 недель, так и 1 месяца.

Таблица 3. Влияние хлорида кобальта на уровень МДА и активность ферментов антиоксидантной защиты.

№	изучаемый параметр	контроль	введение $\text{CoCl}_2$ 6 мг/кг 2 нед	введение $\text{CoCl}_2$ 6 мг/кг 1 мес
1	МДА (эритр.) (нмоль/мл)	4,54±0,16	5,08±0,16**	5,324±0,126****
2	Каталаза (сыв-ка) (мкат/л)	225,56±29,09	304,89±14,93**	370,13±2,99****
3	СОД (сыв-ка) (ед/мл)	2,39±0,25	1,228±0,015****	0,822±0,028****
4	МДА (корк. сл.) (нмоль/мг белка)	1,26±0,06	1,733±0,147***	2,158±0,191****
5	МДА (мозг. сл.) (нмоль/мг белка)	2,73±0,10	3,551±0,178****	4,398±0,219****

Поскольку важной причиной активации процессов ПОЛ является угнетение системы антиокислительной защиты [7, 12], мы исследовали активность ферментов антиоксидантной защиты СОД и каталазы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение хлорида кобальта приводит к снижению СОД и повышению активности каталазы. Последнее, очевидно, может рассматриваться в качестве клеточной компенсаторной реакции [1, 11], направленной на снижение интенсивности ПОЛ.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, на фоне хронической интоксикации хлоридом кобальта отмечается активация процессов ПОЛ, изменением активности ферментов АОЗ – СОД угнетается и компенсаторным повышением другого фермента АОЗ – каталазы. Мембранотоксическое действие приводит к изменению функционального состояния почек, выражающееся в угнетении скорости клубочковой фильтрации и уровня канальцевой реабсорбции воды, результатом чего является уменьшение объема спонтанного диуреза [4, 5]. Одновременно нарушается электролитовыделительная функция почек, понижается экскреция натрия и повышается экскреция калия на фоне спонтанного диуреза. Анализ внутрипочечного обмена электролитов на фоне экспозиции хлоридом кобальта показал угнетение  $R_{Na}$  в почечных канальцах на фоне снижения уровня  $F_{Na}$ , что и приводило к повышенной экскреции Na с мочой и снижению концентрации Na в плазме крови. Поскольку ПОЛ изменяет качественный состав фосфолипидов клеточных мембран, структур нефрона клеток канальцев, можно предположить, что биологический насос  $Na^+-K^+-ATP$ аза, находящаяся в липидной фазе, претерпевает конформационные изменения, которые приводят к снижению активности данного фермента.

#### ВЫВОДЫ:

1. На фоне хронической экспозиции хлоридом кобальта отмечается угнетение спонтанного диуреза вследствие угнетения скорости клубочковой фильтрации и снижения уровня канальцевой реабсорбции воды.
2. Снижение диуреза сопровождается повышенной экскрецией  $Na^+$  и  $K^+$  с мочой, обусловленной угнетением канальцевой реабсорбции  $Na^+$ .
3. На фоне хронической интоксикации хлоридом кобальта происходит интенсификация ПОЛ, снижение активности СОД и компенсаторное повышение активности каталазы.
4. Изменение физико-химических свойств мембран клеток почечных канальцев сопровождается угнетением активности  $Na^+-K^+-ATP$ азы, ответственной за процесс канальцевой реабсорбции Na в дистальном отделе нефрона.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. (2004) Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия, Морион, К.
2. Брин В.Б. и др.. (2007) Вестн. нов. мед. технол., **14**(1), 196-198 .
3. Долгих В.Т. (2008) Вестник интенсивной терапии, **1**, 73-74.
4. Афанасьев И.Г., Коркина Л.Г. (2000) Диагностические методы определения окислительного стресса. Методические рекомендации, РГМУ, М.
5. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. (2000) Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации (Хавинсон В.Х., ред.), СПб.
6. Константинов Р.В., Чащин В.П., Никанов А.Н., Фролова Н.М., Чащин М.В. (2005) Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда, СПб.
7. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. (2001) Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях (Пособие для врачей), РКНПКМЗ РФ, М.

8. *Osakawa T., Mathushita S.* (1980) *Lipids*, **15**(3), 137-140.
9. *Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
10. *Scou J.C.* (1957) *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394-401.
11. *Албегова Н.Р.* (2004) Физиологический анализ влияния цеолита ирлит-1 на почечные эффекты хлорида кобальта, его распределение и выведение из организма. Автореф. дисс. канд.наук, Ростов-на-Дону.
12. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А.* (2006) Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. Слово, М.
13. *Орлов Ю.П.* (2008) Вестн. инт. терап., **1**, 73-74.

Поступила: 02. 11. 2009.

**LIPID PEROXIDATION, ACTIVITY OF Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase AND EXZYMES OF ANTIOXIDANT DEFENCE IN RATS WITH NEPHROPATHY INDUCED BY COBALT CHLORIDE**

*A.I. Tedtoeva, F.S. Dzugkoeva, I.V. Mozhaeva, S.G. Dzugkoev*

Institute of Biomedical Studies, Vladikavkaz Scientific Center, Russian Academy of Science and Government of Republic Northern Osetia Alania, Pushkinskaya ul. 40, Vladikavkaz, 362019 Russia; tel.: (918)8298747; e-mail: angik.74@mail.ru

Chronic parenteral administration of cobalt chloride (6 mg/kg) to male rats for 2 weeks or 1 month was accompanied by activation of lipid peroxidation (LPO), a decrease of superoxide dismutase activity and an increase of catalase activity. The membrane toxic action also resulted in a decrease of cortical and medullar Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of kidneys, and the decrease in renal functions (glomerular filtration, renal water reabsorption, spontaneous diuresis, electrolyte excretion).

**Key words:** cobalt, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, kidney, cell antioxidant defense.