

УДК 612.354:57.034

СУТОЧНЫЕ РИТМЫ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТОГО УГЛЕРОДА В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОЙ СМЕНЫ СВЕТОВОГО СИНХРОНИЗАТОРА

Высоцкий И. Ю., ¹Лукьянчук В. Д., ²Высоцкий В. И.*

Сумский государственный университет

ул. Санаторная, 31, 40018, Сумы, Украина

¹Луганский государственный медицинский университет

кв. 50-летия Оборона Луганска, 1г, 91000, Луганск, Украина

²Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца

бульвар Т. Шевченко, 13, 01601, Киев, Украина

(получено 05.04.2013, опубликовано 02.07.2013)

Опыты проведены на 72 белых крысах-самцах массой 150-220 г с чередованием светлого и темного периодов времени в соотношении 12:12 и в условиях *ad libitum* питания. Токсическое поражение печени вызывали в различное время суток (6, 10, 14, 18, 22 и 2 ч) путем однократного внутримышечного введения раствора CCl_4 в дозе 0,5 мл на 100 г массы. Забор проб у животных осуществляли через 24 часа от момента введения CCl_4 . Установлено, что наиболее выраженным гепатотоксическим действием CCl_4 обладает в 18 и особенно в 22 ч, что по-видимому связано со значительным увеличением в темное время суток содержания таких мембраносвязанных ферментов, как цитохром P-450-редуктаза и сукцинатдегидрогеназа. Наблюдаемый в этот период времени низкий уровень ДК свидетельствует о более интенсивном разрушении и «разборке» мембран эндоплазматического ретикулаума и значительной утрате ими к концу суток способности метаболизировать CCl_4 до активных радикалов индуцирующих ПОЛ. Фиксируемое на этом фоне достоверное увеличение уровня МДА можно расценивать как результат наступающего истощения активности антиоксидантной системы организма.

Ключевые слова: четыреххлористый углерод, перекисное окисление липидов, аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза.

* vysotsky@med.sumdu.edu.ua

Введение.

Известно, что биологические реакции на введение чужеродных химических веществ имеют циркадные ритмы. Эти ритмы могут прямо зависеть от суточных изменений окружающей среды или быть независимыми от всех внешних изменений [1, 2]. В ряде предыдущих публикаций нами установлена роль сезонных биологических ритмов в гепатотоксичности эпихлоргидрина и четыреххлористого углерода (CCl_4), которые широко применяется в промышленности и в быту [3, 4, 5].

Учитывая, что многие предприятия химической промышленности, использующие в технологическом процессе галоидуглеводороды алифатического ряда, в том числе CCl_4 , работают в трехсменном режиме, нами предпринята попытка экспериментального изучения токсического действия данного

хлорорганического соединения на организм, в зависимости от времени суток.

Материал и методы исследования.

Опыты проводили на 72 белых крысах-самцах массой 150-200 г. Животных содержали при обычной температуре и влажности в железных клетках, на стандартном рационе вивария, с чередованием светлого и темного периодов времени в соотношении 12:12 и в условиях *ad libitum* питания. Адаптация к новым условиям проводилась в течение 15 дней. При этом прирост массы был нормальным.

Токсическое поражение печени вызывали в различное время суток (6, 10, 14, 18, 22 и 2 ч) путем однократного внутримышечного введения раствора CCl_4 в дозе 0,5 мл на 100 г массы. Животных умерщвляли декапитацией через 24 часа от момента введения CCl_4 . О влиянии циркадных ритмов на гепатотоксичность CCl_4 судили по состоянию

перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени, определяемого по содержанию диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Уровень этих продуктов ПОЛ определяли по методу Плацер и соавт. [6]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-4А при длине волн 233 и 532 нм для ДК и МДА соответственно. Содержание продуктов липопероксидации рассчитывали используя коэффициенты молярной экстинкции $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для ДК и $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для МДА.

Степень поражения печени в изучаемых условиях опыта оценивали также по активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови [7]. Активность ЩФ выражали в миллимолях 4-нитрофенола, освобождаемого 1 л сыворотки крови в течение 1 ч, а активность трансфераз – в миллимолях пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации.

Результаты исследований и их обсуждение.

Как видно из данных, представленных в таблице, наиболее выраженное поражение печени в результате воздействия CCl_4 отмечалось в 18 и особенно 22 ч. Так, содержание МДА в печени, активность АлАТ и АсАТ в сыворотке крови в 18 часов возрастали на 94, 139 и 61%, а в 22 ч – на 243, 215 и 60% соответственно. Следует отметить, что между интенсивностью образования ДК под влиянием CCl_4 в различное время суток и уровнем МДА не прослеживается прямая зависимость. В частности, если увеличение образования ДК в 6 и 10 ч было примерно одинаковым, то содержание МДА в печени в 6 ч возрастало на 43%, а в 10 ч лишь на 16%. В 18 ч при статистически не значимой интенсификации образования ДК, уровень МДА возрастал на 94, а в 22 ч – на 243%. Причем в 22 ч содержание ДК в печени под влиянием воздействия CCl_4 не увеличивалось, а напротив – уменьшалось, в среднем на 30%. В результате этого в 18 и особенно в 22 ч резко уменьшалось отношение ДК/МДА, что свидетельствует, по-видимому, об истощении антиоксидантной системы защиты

организма. Важно подчеркнуть, что повышение уровня концентрации МДА является весьма характерным для окислительного стресса, вызываемого в ткани печени CCl_4 [8].

Определяемые нами стационарные уровни ДК и МДА зависят от соотношения этих двух процессов, которые регулируются антиоксидантной системой, одним из доминирующих компонентов которой является витамин Е. В пользу этого суждения указывают данные литературы, согласно которым содержание его в печени претерпевает значительные биоритмические колебания, обуславливаемые интенсивностью свободнорадикальных процессов [9]. Наблюдаемый нами высокий уровень ДК и низкий МДА при поражении печени CCl_4 в 10 ч свидетельствует, по-видимому, о более интенсивной инактивации в это время под влиянием витамина Е свободных радикалов, так как диеновая конъюгация появляется в сущности на стадии образования свободных радикалов, а витамин Е участвуя в неферментативной антиоксидантной защите, реагирует со свободными радикалами ведущими цепи окисления с образованием малоактивных радикалов, не способных реагировать с новыми ненасыщенными жирными кислотами [10].

Следует особо подчеркнуть выявленную нами закономерность в действии CCl_4 , которая с 6 до 22 ч характеризовалась постепенным уменьшением уровня ДК, а с 10 до 22 ч – напротив увеличением накопления МДА.

Изучение активности ЩФ в сыворотке крови при воздействии CCl_4 показало, что ее активность практически не изменялась в 6 и 14 ч, незначительно, но статистически достоверно возрастала в 10 и 2 ч и была высокой в 22 и особенно 18 ч (см. табл.). В последнем случае ее активность была на 164% выше, чем в группе контрольных животных.

Это свидетельствует, как следует из ранее полученных нами данных по изучению влияния CCl_4 на желчеотделение, что в развитии токсической гепатопатии в это время наряду с цитолитическим, имеет место и холестатический компонент.

Таблица 1. Показатели гепатотоксичности CCl_4 в разное время суток ($M \pm m$, $n=6$)

Условия опыта	Время суток (в ч)	ДК, нмоль/г	МДА нмоль/г	АлАТ, ммоль/л·ч	АсАТ, ммоль/л·ч	ЩФ, ммоль/л·ч
Контроль	6	0,44±0,03	50,42±3,08	0,50±0,03	0,81±0,03	16,10±0,97
CCl_4		0,92±0,05*	72,43±4,38*	1,17±0,08*	0,73±0,04	16,75±0,72
Контроль	10	0,67±0,03	62,39±4,84	0,83±0,11	1,03±0,04	10,30±0,42
CCl_4		1,31±0,06*	72,22±5,16	1,24±0,11*	1,58±0,11*	13,90±0,84*
Контроль	14	0,62±0,05	55,98±5,26	0,65±0,08	0,75±0,03	13,30±0,44
CCl_4		0,98±0,03*	100,64±7,20*	1,16±0,13*	0,80±0,02	13,30±0,62
Контроль	18	0,93±0,04	65,38±6,53	0,81±0,07	0,74±0,05	9,85±0,58
CCl_4		1,02±0,05	126,70±9,85*	1,94±0,17*	1,19±0,07*	26,05±1,31*
Контроль	22	1,26±0,07	51,07±4,67	0,91±0,08	1,37±0,09	11,45±0,95
CCl_4		0,87±0,06*	174,99±10,96*	2,87±0,17*	2,19±0,09*	21,25±1,14*
Контроль	2	0,75±0,07	65,59±7,44	0,66±0,07	1,01±0,06	13,25±0,51
CCl_4		1,01±0,06*	102,57±8,93*	1,14±0,14*	1,44±0,07*	17,70±1,13*

Примечание: звездочкой обозначено $P < 0,05$.

Выводы.

Таким образом, анализ результатов проведенных нами исследований показал, что наиболее выраженным гепатотоксическим действием CCl_4 обладает в 18 и особенно 22 ч, что, по-видимому, связано со значительным увеличением в темное время содержания таких мембраносвязанных ферментов как цитохром P-450-редуктаза и сукцинатдегидрогеназа [11]. Известно, что именно цитохром P-450 принимает активное участие в распаде тетрахлорметана и образовании активного радикала CCl_3 , что приводит к интенсификации ПОЛ. По данным В.Е. Когана и соавт. [12] существует обратная связь между содержанием продуктов липопероксидации, уровнем цитохрома P₄₅₀ и НАДФН-цитохромредуктазы. Наблюдаемый в нашем эксперименте низкий уровень ДК в темное время при поражении печени CCl_4 , не смотря на высокую активность микросомальных ферментов вероятно связан с более интенсивным разрушением и «разборкой» в этот период мембран эндоплазматического ретикулума и утратой ими в значительной степени к концу суток способности метаболизировать CCl_4 до активных радикалов, способных индуцировать ПОЛ. Значительное увеличение на этом фоне МДА можно расценивать как одно из следствий резкого истощения в течение суток активности антиоксидантной системы организма, и в частности основного ее компонента – витамина Е.

Список использованной литературы:

1. Bimodal Clock Gene Expression in Mouse Suprachiasmatic Nucleus and Peripheral Tissues Under a 7-Hour Light and 5-Hour Dark Schedule / W. Tsuyoshi, N. Emiko, N. Nobukiro [et al.] // Journal of Biological Rhythms. – 2007. – V. 22, Issue 1. – P. 58-68.
2. Ontogeny of Circadian Organization in the Rat / Y. Shin, Y. Tomoko, E. W. Biscoe [et al.] // Journal of Biological Rhythms. – 2009. – V. 24, Issue 1. – P. 55-63.
3. Высоцкий И.Ю. Сезонная гепатотоксичность четыреххлористого углерода // Фармакол. и токсикол.: Респ. междувед. сб. – К., 1985. – Вып. 20. – С. 82-86.
4. Скакун Н.П., Высоцкий И.Ю. Эффективность витамина Е и селенита натрия при поражении печени четыреххлористым углеродом в зависимости от сезона года // Вопр. питания. – 1984. - № 6. – С. 50-54.
5. Висоцький І.Ю. Токсикодинаміка та терапія гострих інгаляційних отруєнь епоксидними смолами: Автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.03.06 / Державна установа «Інститут фармакології та токсикології». – Київ, 2007. – 44 с.
6. Плацер З., Видлакова М., Кужела Л. Процессы перекисления липидов при повреждении и ожирении печени // Чехосл. мед. обозрение. – 1970. – Т. 16, № 1. – С. 30-41.
7. Клінічна лабораторна діагностика / Б.Д. Луцик, Л.С. Лаповець, Г.Б. Лебедь [та ін.]; за ред. проф. Б.Д. Луцика. – К.: ВСВ «Медицина», 2011. – 288 с.
8. Algasonmi S. Carbon Tetrachloride-induced Hepathotoxicity: Protective Effect of

Rocket *Eruca sativa* L. in Rats // American Journal of Chinese Medicine. – 2010. – V. 38, Issue 1. – P. 75-88.

9. Паранич А.В. Сезонные изменения содержания витамина Е в организме белых крыс разного возраста // Физиол. журн. – 1984. – Т. 30, № 2. – С. 217-222.

10. Владимирова Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

11. Miller Margaret A., Parker Janice M., Colas Antomo E. Circadian rhythm of rat hepatic cytochrome P-450 reductase // Life Sci. – 1978. – V. 23, № 3. – P. 217-222.

12. Об участии процесса перекисного окисления липидов в механизмах ритмических суточных изменений содержания цитохрома P-450 в мембранах эндоплазматического ретикулума печени / В.Е. Коган, Ю.П. Козлов, М.В. Биленко [и др.] // Науч. докл. высш. шк. Биол. н. – 1981. – № 11. – С. 26-29.

DIURNAL RHYTHM OF CARBON TETRACHLORIDE HEPATOTOXICITY IF A LIGHT SYNCHRONIZER IS CHANGED UNNATURALLY

Vysotskiy I. Yu., Lukyanchuk V. D., Vysotskiy V. I.

Sumy State University

2, Rymskogo-Korsakova St., 40007, Sumy, Ukraine

Lugansk State Medical University

1B, 50 Rokyv Oborony Luganska Block, 91000, Lugansk, Ukraine

O. O. Bogomolets National Medical University

13, T. Shevchenko Boulevard, 01601, Kyiv, Ukraine

The experiments were carried out on 72 white male rodents weighing 150-220 g with *ad libitum* diet during the light and dark periods. These periods were striped in the ratio of 12:12. The toxic damage of liver was caused during the various day periods (at 6am, 10am, 2pm, 6pm, 10pm and 2am) by the intramuscular injection of CCl₄ solution at a dose of 0.5 ml per 100 g body weight. The samples were gathered in 24 hours after the injection of CCl₄. It was pointed that the most significant hepatotoxic influence of CCl₄ was at 6pm and 10pm. Perhaps, it is connected to large amount of enzymes contained in the membrane, such as cytochrome P450-3A-reductase and succinate dehydrogenase. The low level of diene conjugates was observed during this period of time, which was the evidence for more serious damages and disruption of the endoplasmic reticulum membranes. Later these membranes were slightly able to metabolize CCl₄ to active radicals, which normally induce lipid peroxidation. The significant increase of malondialdehyde level was measured on a background of these conditions. It can be considered as the result of antioxidant system activity exhaustion.

Key words: carbon tetrachloride, lipid peroxidation, aspartataminotransferase, alanineaminotransferase, alkaline phosphatase.

ДОБОВІ РИТМИ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТІ ЧОТИРИХЛОРИСТОГО ВУГЛЕЦЮ В УМОВАХ ШТУЧНОЇ ЗМІНИ ДІЇ СВІТЛОВОГО СИНХРОНІЗАТОРА

*Висоцький І. Ю. *, Лук'янчук В. Д., Висоцький В. І.*

Сумський державний університет

вул. Римського-Корсакова, 2, 40007, Суми, Україна

Луганський державний медичний університет

вул. 50-річчя Оборони Луганська, 1г, 91000, Луганськ, Україна

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця

бульвар Т. Шевченка, 13, 01601, Київ, Україна

Експерименти було проведено на 72 білих крисах-самцях масою 150-220 г з чередуванням світлого та темного періоду доби у співвідношенні 12:12 та за умови *ad*

libitum харчування. Токсичне ураження печінки спричиняли у різні періоди доби (6, 10, 14, 18, 22 і 2 год) шляхом одноразового внутрішньом'язового введення розчину CCl_4 з дозуванням 0,5 мл на 100 г маси. Забір проб у тварин проводили через 24 години з моменту введення CCl_4 . Встановлено, що найбільш виражений гепатотоксичний вплив CCl_4 має о 18 і особливо о 22 год, очевидно це пов'язано зі значним збільшенням у темний період доби вмісту таких мембрано-зв'язаних ферментів, як цитохром Р-450-редуктаза та сукцінатдегідрогеназа. Відмічений у цей період доби низький рівень ДК свідчить про більш суттєві порушення та «розриви» мембран ендоплазматичного ретикулуму й значна втрата ними здатності метаболізувати CCl_4 під кінець доби до активних радикалів, які індукують ПОЛ. На цьому рівні зареєстровано помітне збільшення рівня МДА, яке можна розцінювати як результат виснаження активності антиоксидантної системи організму.

Ключові слова: чотирихлористий вуглець, перекисне окислення ліпідів, аспартатамінотрансфераза, аланінамінотрансфераза, лужна фосфатаза