

Некоторые биохимические и цитологические показатели при токсическом гепатите

Л. Б. Бондаренко, Т. Ф. Бышовец, Г. А. Сайфетдинова

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины
Ул. Э. Потьма, 14, Киев, 252057, Украина

В экспериментах на крысах впервые установлено наличие цитотоксического эффекта тетрахлорметана на механизм деления клетки. Он сопровождается изменениями активности 5'-нуклеотидазы и содержания фосфолипидов и холестерина в сыворотке крови и микросомной фракции клеток печени. Впервые показано, что введение на фоне токсического гепатита производного α -токоферола с укороченной боковой цепью, в отличие от самого витамина Е стимулирует активность 5'-нуклеотидазы и нормализует липидный состав сыворотки крови и микросомной фракции клеток печени.

Введение. Возрастание химического загрязнения среды обуславливает особую актуальность исследований процессов биотрансформации ксенобиотиков. Их метаболизм *in vivo*, в основном, предполагает активацию процессов формирования свободных радикалов. Тетрахлорметан, являющийся классическим гепатотоксином и гепатоканцерогеном *in vivo* в реакциях, катализируемых Р-450-зависимыми ферментными системами, преобразуется до свободных радикалов, способных инициировать аутокаталитическое липопереокисление, нарушать протекание процессов обмена белков, липидов и углеводов, а также стабильность мембранных структур клетки [1]. Широкий спектр повреждающих эффектов производных тетрахлорметана определяет необходимость параллельного исследования цитологических и биохимических изменений в организме при его введении.

В частности, если гепатоканцерогенность тетрахлорметана четко установлена для различных видов животных, то результаты изучения его влияния на мутагенез далеко неоднозначны [2]. Тетрахлорметан не вызывал аберраций хромосом и репаративного синтеза ДНК в гепатоцитах *in vivo*, однако данные тестов *in vitro* свидетельствуют о наличии мутагенной активности названного соединения [2].

Запуск процессов мутагенеза в организме сопровождается серьезными изменениями в метаболизме белков, нуклеиновых кислот, нуклеотидов, липидов, энергетическом обмене, вызывает перестройку мембранных структур, отклонения в характере функционирования ряда ферментных систем [3] и, в частности, 5'-нуклеотидазы, играющей важную роль в метаболизме аденозина (эндогенного гепатопротектора) [4]. Участвуя в метаболизме IMP, GMP, CMP, AMP, UMP, 5'-нуклеотидаза может рассматриваться как один из ключевых ферментов обмена белков, нуклеиновых кислот, энергии, а также механизмов передачи информации на организменном и клеточном уровне [5]. Помимо участия в поддержании нормальных метаболических процессов в организме данный фермент существен также и для процессов детоксикации целого ряда ксенобиотиков [6].

Мембраноповреждающий эффект ксенобиотиков и, в частности, тетрахлорметана затрагивает и липидный состав мембранных структур клетки [7].

Доказан полифункциональный характер стабилизирующего воздействия α -токоферола на биомембраны, включающего торможение перекисного окисления липидов, защиту от синглетного кислорода, структурную стабилизацию и модификацию активности мембраносвязанных ферментов [8].

Учитывая все вышеизложенное, целью нашей работы явилось определение цитотоксического эффекта тетрахлорметана в клетках костного мозга

крыс при воспроизведении у них токсического гепатита. Наряду с этим исследовали активность 5'-нуклеотидазы и липидный состав сыворотки крови и микросомной фракции клеток печени при данной патологии и введении витамина Е и его производного с укороченной боковой цепью.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на белых крысах-самцах массой 180—250 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Для цитологических исследований тетрахлорметан (в виде 50 %-го раствора на подсолнечном масле) в дозе 0,2 мл на 100 г массы тела крыс вводили внутривенно 2 раза в неделю на протяжении 1,5 месяца. Через 18 ч после последнего введения тетрахлорметана животным внутривенно вводили раствор колхицина из расчета 5 мкг/100 г массы тела. Через 1,5 ч животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Контрольной группе животных на протяжении 1,5 месяца внутривенно вводили в таком же объеме подсолнечное масло. Извлекали бедренную кость, удаляли эпифизы и с помощью гипотонического раствора (0,75 М КСl) вымывали костный мозг. Препараты метафазных хромосом готовили по общепринятым методам [9], фиксировали смесью этанол : уксусная кислота (3 : 1), окрашивали по Унна-блю. Анализировали препараты под иммерсионным объективом (X 100) микроскопа Microphot с учетом требований к цитогенетическому метафазному анализу [10]. Учитывали также геномные и хромосомные повреждения в наследственных структурах клеток костного мозга.

Для биохимических экспериментов животные были разделены на четыре группы: 1 — интактные; 2 — получавшие этанол с тетрахлорметаном; 3, 4 — получавшие данные гепатотоксины и витамин Е или производное витамина с укороченной боковой цепью соответственно. Гепатотоксины вводили в течение 45 дней трижды в неделю: 1 %-й раствор этанола из расчета 35 мг/кг массы тела и с интервалом 20—30 мин — 20 %-й масляный раствор тетрахлорметана из расчета 20 мг/кг массы тела. Препараты витамина Е и его производного с укороченной боковой цепью вводили перорально (в виде масляных растворов) на протяжении 10 дней ежедневно из расчета 10 мг/кг массы тела за 30 мин до введения гепатотоксинов. На 46-й день эксперимента животных забивали декапитацией. Развитие хронического токсического гепатита контролировали по комплексу общепринятых биохимических и патоморфологических показателей [11].

Для исследований использовали печень и сыворотку крови. Печень промывали через воротную

вену охлажденным 1 %-м раствором КСl, гомогенизировали в 0,05 М трис-НСl (рН 7,4). Микросомную фракцию получали по методам [12, 13]. Белок определяли по Лоури [14]. Липидные экстракты микросом получали по модифицированной методике Фолча [15]. Содержание холестерина определяли по методу [16], предполагающему его взаимодействие с хлористым железом, уксусной и серой кислотами. Определение общих фосфолипидов осуществляли по [16]. В сыворотке крови крыс определяли активность 5'-нуклеотидазы, как в работе [17].

Результаты и обсуждение. Результаты цитологических исследований представлены в таблице. Из полученных данных видно, что тетрахлорметан в исследованной дозе не вызывал изменений структуры хромосом в клетках костного мозга животных, в основе которых лежит непосредственное повреждение самой структуры ДНК. Единичные случаи обнаружения аберраций заключались в появлении пробелов (гепов) в структуре ДНК, которые считаются хромосомной «предпатологией» [18]. Числовые изменения хромосомного набора могут быть обусловлены нарушениями митотического аппарата деления клетки. Определение показателей анеуплоидии является эффективным тестом на мутагенность [19]. Из таблицы видно, что показатели анеуплоидии в опытной группе животных достоверно не отличались от таковых в контроле.

В то же время тетрахлорметан в наших экспериментах достоверно повышал количество геномных изменений, проявляющихся в возникновении клеток различной пloidности, но с преобладанием клеток с набором хромосом, равным 4n. Такие изменения в геноме клетки представляют собой иную, в отличие от хромосомных, класс мутаций. Объектом действия в данном случае является не структура самой ДНК, а непосредственно аппарат

Цитологические изменения в клетках костного мозга крыс, подвергшихся воздействию ССl₄ (%), М ± m, n = 6—7)

Группа животных	Количество		
	структурных аберраций хромосом	анеуплоидных метафаз	полиплоидных метафаз
Контроль	0	13,8 ± 1,3	2,9 ± 0,5
ССl ₄	0,52 ± 0,36	15,3 ± 1,8	6,2 ± 1,5*

*p < 0,05.

деления клетки [20]. Полученные нами результаты согласуются с гипотезой Бродского [12] о том, что полиплоидизация является морфологическим ответом клетки на возрастание функциональной нагрузки под влиянием ксенобиотика. Следовательно, возрастание числа полиплоидных клеток отражает смену этапов компенсаторно-приспособительной перестройки организма [22]. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что цитотоксический эффект тетрахлорметана состоит в воздействии на механизм деления клетки без изменений структуры ДНК.

Цитотоксическое действие CCl_4 может также осуществляться за счет стимуляции биосинтеза цитотоксичных продуктов перекисного окисления липидов и изменения активности ферментов нуклеотидного обмена [1, 23].

Результаты изучения активности 5'-нуклеотидазы при токсическом гепатите и введении производных α -токоферола представлены на рис. 1. Видно, что развитие токсического гепатита сопровождается не только морфологическими изменениями

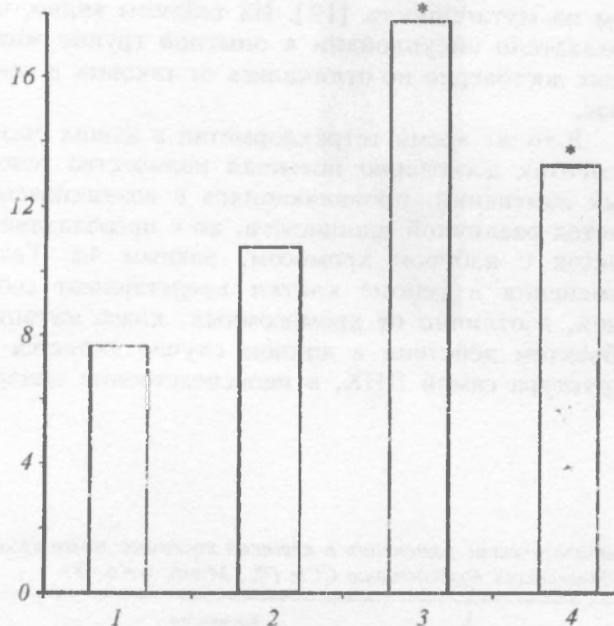


Рис. 1. Активность 5'-нуклеотидазы сыворотки крови крыс (ось ординат) при токсическом гепатите и введении витамина Е или его производного с укороченной боковой цепью ($M \pm m$, $n = 6$, в 10^{-10} моль P_{in} за мин на мг белка): 1 — интактные животные; 2 — токсический гепатит; 3 — токсический гепатит + витамин Е; 4 — токсический гепатит + производное витамина Е с укороченной боковой цепью; * достоверные отличия по сравнению с группой 1

клеток организма (см. таблицу), но и четкой тенденцией к повышению активности данного фермента. Этот процесс, вероятно, осуществляется не за счет синтеза белка *de novo*, а вследствие его высвобождения из мембран клеток после мембраноповреждающего действия тетрахлорметана. Это подтверждается данными других авторов [24], отмечавших снижение активности мембраносвязанной фракции 5'-нуклеотидазы печени крыс с токсическим гепатитом, вызванным CCl_4 . Такое повышение активности фермента может рассматриваться как составляющая компенсаторного ответа организма на введение CCl_4 , поскольку образующийся в результате данной ферментативной реакции аденозин является эффективным гепатопротектором даже при летальных дозах тетрахлорметана у крыс, оказывает антилипопероксидативное действие, регулирует функционирование Р-450-зависимых ферментов и уровень окисления глутатиона [25]. Хотя данное соединение не прекращает образования свободных радикалов в ходе метаболизма тетрахлорметана в организме, однако затрудняет встраивание CCl_4 в липиды микросомной фракции [25]. Кроме того, продукты его катаболизма выступают в качестве «ловушек» свободных радикалов [25].

Введение витамина Е или его короткоцепочечного производного на фоне токсического гепатита приводило к усилению компенсаторной реакции организма на воздействие тетрахлорметана. Уровень активности 5'-нуклеотидазы достоверно повышался по сравнению с нормой в обеих группах: при введении витамина Е — на 65 %, при введении его производного — на 25 %. Такое влияние витамина Е и его производного с укороченной боковой цепью на активность 5'-нуклеотидазы, возможно, обусловлено мембранотропным эффектом данных соединений [8], вызывающим переход части мембраносвязанного фермента в растворимую форму, на долю которой приходится 73 % всей специфической ферментативной активности [26].

Результаты изучения изменений фосфолипидного состава сыворотки крови и микросомной фракции клеток печени при токсическом гепатите и введении производных α -токоферола представлены на рис. 2. Развитие токсического гепатита сопровождается снижением содержания общих фосфолипидов в микросомной фракции (рис. 2, р2). Тенденция к такому же снижению содержания общих фосфолипидов отмечена и в сыворотке крови (рис. 2, р1). Таким образом, наблюдаемые изменения содержания фосфолипидов не могут быть отнесены за счет простого перераспределения данных соединений в организме, а, вероятно, обусловлены сер-

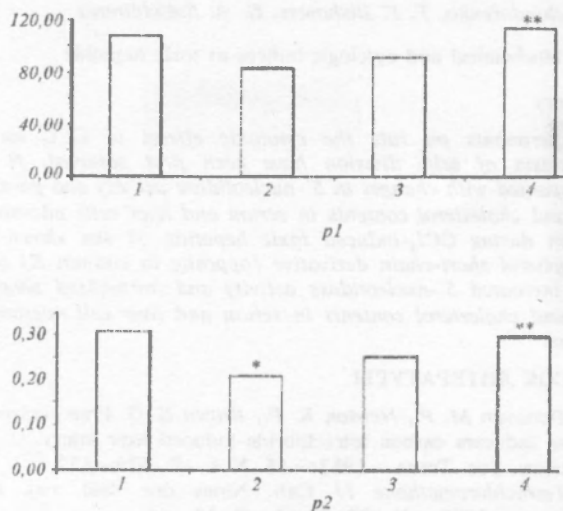


Рис. 2. Содержание общих фосфолипидов в сыворотке крови и микросомной фракции клеток печени крыс при токсическом гепатите и введении витамина Е или его производного с укороченной боковой цепью ($M \pm m$, $n = 6$): 1 — интактные животные; 2 — токсический гепатит; 3 — токсический гепатит + витамин Е; 4 — токсический гепатит + производное витамина Е с укороченной боковой цепью; p1 — сыворотка (в мг%); p2 — микросомы (в мг/мг белка); * достоверные отличия по сравнению с группой 1 и ** с токсическим гепатитом

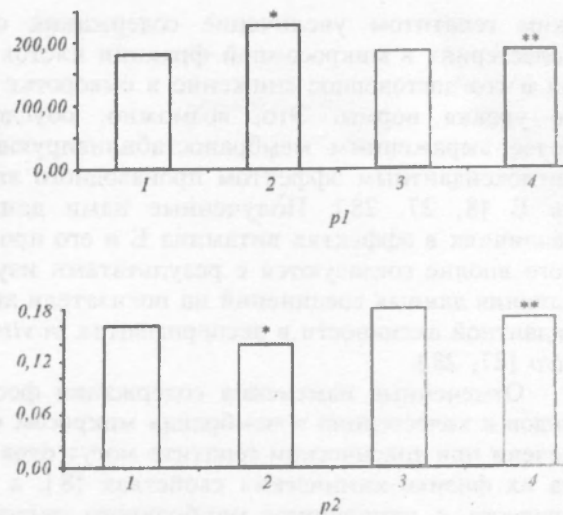


Рис. 3. Содержание общего холестерина в сыворотке крови и микросомной фракции клеток печени крыс при токсическом гепатите и введении витамина Е или его производного с укороченной боковой цепью ($M \pm m$, $n = 6$): 1 — интактные животные; 2 — токсический гепатит; 3 — токсический гепатит + витамин Е; 4 — токсический гепатит + производное витамина Е с укороченной боковой цепью; p1 — сыворотка (в мг%); p2 — микросомы (в мг/мг); * достоверные отличия по сравнению с группой 1 и ** с токсическим гепатитом

езными нарушениями в липидном обмене при токсическом гепатите, вызванном введением тетра хлорметана [1, 2, 7]. Это предположение подтверждается и данными других авторов, отмечавших подавление биосинтеза фосфолипидов в печени крыс, пораженной тетра хлорметаном [7]. Введение α -токоферола не нормализовало данных показателей.

В отличие от самого витамина Е при введении его производного отмечалось достоверное по сравнению с токсическим гепатитом увеличение до уровня нормы содержания общих фосфолипидов как в сыворотке крови, так и в микросомной фракции клеток печени. Такое влияние производного α -токоферола может быть обусловлено особенностями структуры его молекулы, позволяющей данному соединению легче встраиваться в мембраны, образовывать более прочные комплексы с жирнокислотными группировками фосфолипидов, легче регенерировать после свободнорадикального окисления, что приводит к повышенной по сравнению с витамином Е способности подавлять процессы перекисного окисления, интенсифицированные при токсическом гепатите, стабилизировать струк-

туры мембран за счет непосредственного взаимодействия с молекулами фосфолипидов, а также регулировать активность фосфолипаз [8, 27, 28]. С этим вполне согласуются и полученные нами результаты по влиянию витамина Е и его производного с укороченной боковой цепью на содержание общих фосфолипидов в микросомной фракции клеток печени.

Данные по изучению содержания общего холестерина в сыворотке крови и микросомной фракции клеток печени, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что при развитии хронического токсического гепатита в сыворотке крови отмечается повышение (рис. 3, p1), а в мембранах микросомной фракции клеток печени — снижение содержания общего холестерина (рис. 3, p2). Это, очевидно, обусловлено мембраноповреждающим эффектом тетра хлорметана, вызывающим высвобождение части холестерина, встроенного в мембрану, во внеклеточное пространство [1, 2]. Введение α -токоферола не приводило к достоверной нормализации данных показателей. В отличие от самого витамина Е при введении его производного отмечалось достоверное по сравнению с токсиче

ским гепатитом увеличение содержания общего холестерина в микросомной фракции клеток печени и его достоверное снижение в сыворотке крови до уровня нормы. Это, возможно, обусловлено более выраженным мембраностабилизирующим и ангиооксидантным эффектом производного витамина Е [8, 27, 28]. Полученные нами данные о различиях в эффектах витамина Е и его производного вполне согласуются с результатами изучения влияния данных соединений на показатели антиоксидантной активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [27, 28].

Отмеченные изменения содержания фосфолипидов и холестерина в мембранах микросом клеток печени при токсическом гепатите могут отразиться на их физико-химических свойствах [8], а также привести к изменениям мембранного окружения, условий функционирования и удерживания в липидном бислое ряда ферментов. Это предположение подтверждается и результатами других авторов, показавших, что под воздействием хлорохина происходит снижение уровня холестерина в митохондриях клеток печени, сопровождаемое существенным снижением активности НАДН-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и цитохром с-оксидазы [29].

Таким образом, в результате проведенных исследований впервые *in vivo* установлен цитотоксический эффект тетрахлорметана на механизм деления клетки. Он сопровождается изменениями активности 5'-нуклеотидазы и содержания фосфолипидов и холестерина в сыворотке крови и микросомной фракции клеток печени. Впервые показано, что введение на фоне токсического гепатита производного α -токоферола с укороченной боковой цепью, в отличие от самого витамина Е, стимулирует активность 5'-нуклеотидазы и нормализует липидный состав сыворотки крови и микросомной фракции клеток печени.

Л. Б. Бондаренко, Т. Ф. Бишовець, Г. А. Сайфетдинова

Деякі біохімічні і цитологічні показники в умовах токсичного гепатиту

Резюме

В експериментах на щурах вперше виявлено цитотоксичний ефект тетрахлорметану на механізм ділення клітини. Він супроводжується змінами активності 5'-нуклеотидази і вмісту фосфоліпідів та холестерину у сироватці крові і микросомній фракції клітин печінки. Вперше показано, що введення на фоні токсичного гепатиту похідного α -токоферола з укороченим бічним ланцюгом на відміну від самого вітаміну Е стимулює активність 5'-нуклеотидази і нормалізує ліпідний склад сироватки крові і микросомної фракції клітин печінки.

L. B. Bondarenko, T. F. Bishovetz, G. A. Saifetdinova

Some biochemical and cytologic indices at toxic hepatitis

Summary

In experiments on rats the cytotoxic effects of CCl_4 on the mechanism of cells division have been first observed. It was accompanied with changes in 5'-nucleotidase activity and phospholipid and cholesterol contents in serum and liver cells microsomeal fraction during CCl_4 -induced toxic hepatitis. It was shown that α -tocopherol short-chain derivative (opposite to vitamin E) treatment increased 5'-nucleotidase activity and normalised phospholipid and cholesterol contents in serum and liver cell microsomeal fraction.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Donovan M. P., Newton R. P., Brown E. G. Free nucleotides as inducers carbon tetrachloride-induced liver injury // Biochem. Soc. Trans.—1987.—15, N 4.—P. 676—677.
2. Tetrachloromethane // Cah. Notes doc. Inst. nat. rech secur.—1987.—N 127, Suppl.—P. 13—16.
3. Castro G. D., Diaz-Gomes M. I., Castro J. A. 5-Methylcytosine attack by hydroxyl free radicals and during CCl_4 promoted liver microsomeal lipid peroxidation: structure of reaction products // Chem. Biol. Interact.—1996.—99, N 1—3.—P. 289—299.
4. Skladovski A. C., Smolenski R. T., Taaevermier M. et al. Soluble forms of 5'-nucleotidase in rat and human heart // Amer. J. Physiol.—1996.—270, N 4.—P. H1493—H1500.
5. Niedzwiecka J., Jaroszewicz L. Soluble 5'-nucleotidase from thyroid gland partial purification and properties // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1996.—221, N 2.—P. 471—476.
6. Banditeelli S., Baiocchi Ch., Pesi R. et al. The phosphotransferase activity of cytosolic 5'-nucleotidase: a purine analog phosphorylating enzyme // Int. J. Biochem. and Cell Biol.—1996.—28, N 6.—P. 711—720.
7. Gebhart A. M. W., Brabec M. J. Carbon tetrachloride depresses hepatic phospholipid synthesis in rats // Toxicol. Lett.—1985.—24, N 1.—P. 71—78.
8. Спиричев В. Б., Конь И. Я. Биологическая роль жирорастворимых витаминов // Итоги науки и техники.—1989.—37.—С. 160—219.
9. Ford C. E., Hamerton J. H. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes // Stein Technol.—1965.—31.—P. 247—251.
10. Бочков Н. П., Демин Ю. С., Лучник Н. В. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // Генетика.—1972.—8, № 5.—С. 133—141.
11. Скакун Н. П., Писько Г. Т., Мосейчук И. П. Поражение печени четыреххлористым углеродом.—М.: НИИТЭХИМ, 1989.—108 с.
12. Schneider V. C. Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fraction // J. Biol. Chem.—1948.—176.—P. 259—262.
13. Guengerich F. P. Analysis and characterization of enzymes Principles and methods of toxicology // Ed. A. W. Hayes.—New York: Raven press, 1989.—P. 777—814.
14. Lowry O. H., Rosedrough N. N., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193.—P. 265—275.
15. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. Препаративная биохимия липидов.—М.: Наука, 1981.—256 с.
16. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия.—Минск: Беларусь, 1976.—312 с.

17. Heppel L. A., Hilme R. J. 5'-Nucleotidases // Meth. Enzymol.—1955.—2.—P. 5546—5550.
18. Evans H. G. Mechanisms of repair // Genetical Aspects of Radioselectivity.—Vienna, 1966.—P. 31—43.
19. Natarajan A. T. Aneuploidy in somatic cells as a test system for environmental mutagen // Biol. Zbl.—1989.—108, N 5.—P. 391—393.
20. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды.—М.: Медицина, 1989.—272 с.
21. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия: пролиферация и дифференцировка.—М., 1981.—246 с.
22. Беляева Н. Н. Пролиферация и полиплоидизация гепатоцитов как показатели восстановительной регенерации печени при действии химических факторов окружающей среды // Гигиена и санитария.—1989.—№ 3.—С. 48—52.
23. Логинов А. С., Матюшин Б. Н. Цитотоксическое действие активных форм кислорода и механизмы развития хронического процесса в печени при ее патологии // Пат. физ. и эксперим. терапия.—1996.—№ 4.—С. 3—5.
24. Kumaravelu P., Dakshinamoorthy D. P., Subramaniam S. et al. Effect of eugenol on drug-metabolizing enzymes of carbon tetrachloride-intoxicated rat liver // Biochem. Pharmacol.—1995.—49, N 11.—P. 1703—1707.
25. Chagova de Sanchez V., Hernandez-Munoz R., Ganez H. et al. Possible mechanism of adenosine protection on carbon CCl₄ hepatotoxicity. Role of adenosine byproducts and glutathione peroxidase // J. Biochem. Toxicol.—1995.—10, N 1.—P. 41—50.
26. Minano T., Kitakaze M., Morioka T. et al. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity // Amer. J. Physiol.—1996.—270, N 1.—P. H238—H251.
27. Кузьменко И. В., Куница Н. И., Донченко Г. В. Влияние α-токоферола, его аналогов и антиоксиданта инола на перекисное окисление липидов *in vitro* // Укр. биохим. журн.—1993.—65, № 3.—С. 94—99.
28. Куница Н. И., Кузьменко И. В., Алексеев С. М. и др. Участие токоферола и его аналогов в процессах перекисного окисления липидов и транспорте электронов в митохондриях печени крыс *in vivo* // Биохимия.—1993.—58, № 11.—С. 1709—1713.
29. Deepalakshmi P. D., Parasakthy K., Shanthi S. et al. Effect of chlroquine on rat liver mitochondria // Indian. J. Exp. Biol.—1994.—32, N 1.—P. 797—799.

УДК 615.9:616.36-099:576.2.24:577.161.3
Поступила в редакцию 21.01.98