

УДК 616.61-099-092.9+577.3]:546.175

В.О.Костенко

Зміни енергетичного метаболізму в нирках білих щурів у динаміці гострої інтоксикації нітратом натрію

В експерименте на белых крысах изучали влияние нитрата натрия в дозе ЛД50 на изменения энергетического метаболизма в почках. Установлено, что острая интоксикация нитратом натрия сопровождается значительным угнетением ресинтеза АТФ, разобщением тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, снижением энергетического потенциала. Выявлена корреляция между увеличением содержания динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) в ткани почек и угнетением биоэнергетических процессов, что свидетельствует о существенной роли накопления оксида азота в патогенезе биоэнергетической недостаточности в этих органах. Максимальный уровень ДНКЖ отмечается через 24 ч после введения нитрата натрия и совпадает с максимальными нарушениями энергетического метаболизма. Полученные результаты позволяют предполагать важное значение коррекции выявленных нарушений для предупреждения и терапии токсической нефропатии при острой интоксикации нитратом натрия.

Вступ

Широкомасштабне використання солей азотної кислоти у промисловості і особливо у сільському господарстві нерідко зумовлює надходження вказаних сполук в організм людини та теплокровних тварин у дозах, які значно перевищують гранично допустимі [9]. За літературними даними найбільша активність у виведенні нітратів із організму припадає на нирки [16]. Разом із тим нирки зазнають сильного пошкодження від дії неорганічних нітросполук [2]. При гострих отруєннях нітратами спостерігаються випадки розвитку токсичного гломерулонефриту та гострої ниркової недостатності [5, 8]. При вказаній патології залишається нез'ясованою динаміка енергетичного обміну у нирках. Проте біоенергетичні процеси визначають функціональний стан цих органів [4]. Тому великий інтерес має вивчення при гострій інтоксикації нітратами змін процесів енергоутворення у нирках. Важливим моментом у зв'язку з цим є встановлення патогенетичної ролі у розвитку токсичної нефропатії продукту біотрансформації нітратів — оксиду азоту (NO) — сполуки, яка має, за даними досліджень останніх років, широкий спектр біологічної активності [20] і може накопичуватися у зв'язаній із залізом формі [1, 10].

Мета роботи — вивчення стану енергетичного метаболізму в нирках при гострій інтоксикації нітратом натрію.

Методика

Проведено три серії досліджень на 320 білих щурах лінії Вістар масою 180—250 г. У першій серії досліджували інтактних тварин (контроль), у другій — тварин у ранньому періоді інтоксикації (через 2, 6 і 24 год), у третій — тварин відновлювального періоду (через 3, 5, 7, 10 діб) після отруєння.

Моделювання гострої інтоксикації нітратом натрію здійснювали введенням вказаної сполуки у вигляді водного розчину в шлунок за допомогою спеціального зонду з розрахунку 9,6 г нітрату натрію на 1 кг маси тварини. Ця експериментально підібрана нами доза відповідає добовій ЛД₅₀. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом. Для вивчення вмісту макроергічних сполук готували екстракт коркового шару нирок. Концентрацію аденозинтрифосфатної кислоти (АТФ) визначали з використанням біоломінесцентного АТФ-реагенту «Іммолюм» (Росія) [11], вміст аденозиндифосфорної (АДФ) і аденозинмонофосфорної кислот (АМФ) визначали в одній пробі за допомогою сполучених реакцій [18], неорганічного фосфату (Ф_и) — за методом Кочетова [6]. Енергетичний потенціал розраховували за формулою:

$$\frac{АТФ + 1/2 АДФ}{АТФ + АДФ + АМФ}$$

Функціональний стан мітохондрій досліджували за методом Chance та Williams [15]. Середовище інкубації готували за вказівками Чумакова та Крупенікової [12]. З метою дослідження ступеня гемічної гіпоксії вивчали рівень метгемоглобіну ціангемоглобіновим методом [7]. Рівень накопичення у тканині нирок оксиду азоту визначали при оцінці спектрів електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) динітрозильних комплексів заліза (ДНКЗ, при факторі $g = 2,03$), які досліджували у зразках коркового шару, охолоджених до температури 77 °К [3].

Отримані результати обчислювали статистично з використанням критерію t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Уже через 2 год після введення тваринам нітрату натрію в нирках розвиваються глибокі порушення енергетичного метаболізму (табл. 1), що вияв-

Таблиця 1. Зміна вмісту макроергічних сполук у нирках білих щурів при гострій інтоксикації нітратом натрію

Умова досліду	Концентрація макроергів, мкмоль/г				Енергетичний потенціал
	АТФ	АДФ	АМФ	Ф _и	
До введення нітрату натрію (контроль)	2,87± ±0,16	1,36± ±0,01	0,47± ±0,01	9,50± ±0,19	0,755± ±0,003
Після введення нітрату натрію через:					
2 год	1,52± ±0,18***	0,72± ±0,14***	1,06± ±0,01***	12,03± ±0,53***	0,569± ±0,019*
6 год	1,48± ±0,26***	0,55± ±0,15***	0,98± ±0,11***	14,15± ±0,36***	0,581± ±0,004***
1 доб	1,37± ±0,26***	0,49± ±0,14***	1,65± ±0,15***	13,65± ±0,47	0,457± ±0,009***
3 доб	1,82± ±0,17***	0,70± ±0,46	1,13± ±0,22**	11,38± ±0,53***	0,601± ±0,012***
5 дб	2,26± ±0,19*	1,10± ±0,17	0,82± ±0,11*	11,74± ±0,60***	0,673± ±0,004***
7 дб	2,33± ±0,16*	1,27± ±0,20	0,92± ±0,01***	11,37± ±0,65**	0,656± ±0,002***
10 дб	2,24± ±0,27	1,38± ±0,21	0,91± ±0,14	10,10± ±0,60*	0,647± ±0,004**

* Тут і в табл. 2 P<0,05; ** P<0,02; *** P<0,01.

ляється в істотному зниженні концентрації АТФ та енергетичного потенціалу (ЕП), і які через 6 год посилюються, а через 24 год після отруєння набувають максимального значення. В цей час концентрація АТФ зменшується на 52,3 %, сума аденіннуклеотидів — на 25,2 %, ЕП — на 39,5 %. Концентрація АМФ і F_H перевищує контрольні значення на 251,1 та 43,7 % відповідно.

Наведені факти про вміст і співвідношення макроергічних сполук у нирках білих щурів свідчать про те, що на ранніх етапах гострої інтоксикації нітратом натрію, з одного боку, відзначається підвищений розпад АТФ, а з іншого — має місце зниження її ресинтезу.

При вивченні процесів тканинного дихання (ТД) та окислювального фосфорилування (ОФ) полярографічним методом (табл. 2) виявлено роз-

Таблиця 2. Зміна показників дихання та окислювального фосфорилування у мітохондріях нирок білих щурів при гострій інтоксикації нітратом натрію

Умова досліду	Швидкість дихання, натом О/хв мг		Дихальний контроль	Коефіцієнт фосфорилування АДФ/О, пмоль АДФ/натом О
	фосфорилуючого	контрольованого		
До введення нітрату натрію (контроль)	74,9±0,3	38,0±0,9	1,97±0,01	1,74±0,07
Після введення нітрату натрію через:				
2 год	57,5±2,4***	34,4±1,8***	1,76±0,08*	1,39±0,12*
6 год	40,4±2,1***	28,1±1,0***	1,44±0,04***	1,48±0,14*
1 доб	37,8±3,6***	26,3±0,6***	1,44±0,05***	1,38±0,08***
5 дб	54,7±4,4**	29,8±1,6***	1,84±0,06*	1,48±0,07
10 дб	69,8±2,8	34,7±1,6	1,97±0,05	1,68±0,24

виток істотних порушень функціонального стану мітохондрій нирок. Так, уже через 2 год після отруєння спостерігається зниження швидкості фосфорилуючого (у метаболічному стані 3 за Чансом) і контрольованого (у метаболічному стані 4) дихання, а також дихального контролю (ДК) і коефіцієнту АДФ/О, що характеризують міру сполучення окислення та фосфорилування. Найбільш глибокі зміни ОФ у нирках розвиваються через 24 год після введення нітрату натрію. При цьому відзначається зменшення швидкості фосфорилуючого дихання на 49,5 %, ДК — на 26,9 %, а коефіцієнт АДФ/О — на 25,3 %. Таким чином, результати дослідження свідчать про те, що у патогенезі токсичної нефропатії при гострому отруєнні нітратом натрію важливу роль відіграє пошкодження мітохондрій, зокрема їх внутрішньої мембрани (про що, у певній мірі, свідчать одержані нами результати відносно зміни показників мітохондріального дихання), що призводить до втрати необхідного значення протонного потенціалу, внаслідок чого ОФ не супроводжується синтезом адекватної кількості АТФ.

Для вивчення механізму порушення сполучення ТД і ОФ у середовище інкубації мітохондрій вносили бичачий сироватковий альбумін (БСА). Це має можливість одержати орієнтувальне уявлення про вміст у мітохондріях вільних жирних кислот (ВЖК), які, як відомо, здатні накопичуватися при гіпоксичних станах різного походження [12], роз'єднувати ТД і ОФ та гальмувати АТФ/АДФ-антипорт, що заважає фосфорилуванню АДФ [19]. Під час дослідження виявлено відмінності у механізмі роз'єднання ТД і ОФ

у нирках у динаміці гострої інтоксикації нітратом натрію. Так, нами було визначено, що в перші години отруєння провідне значення у порушенні сполучення ТД і ОФ має надмірне накопичення ВЖК, що відбивається (рис. 1) у значному прирості (майже до нормальної величини) коефіцієнта АДФ/О після додавання у середовище інкубації БСА, який зв'язує ВЖК. Наприкінці 1-ї доби гострої інтоксикації приріст коефіцієнта АДФ/О дуже незначний, що підкреслює значення у роз'єднанні ТД і ОФ окрім ВЖК й інших факторів. До останніх правомірно віднести оксид азоту. Це

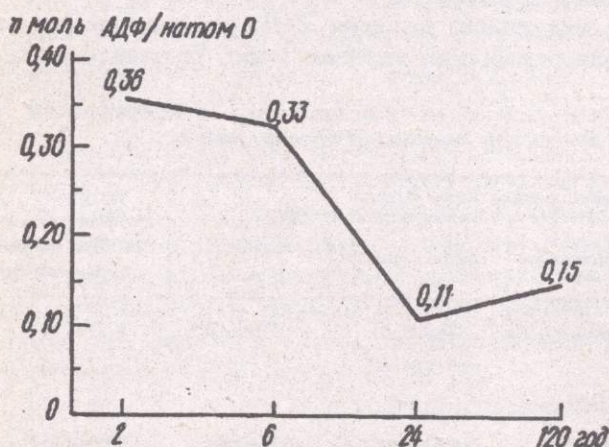


Рис. 1. Динаміка приросту коефіцієнту АДФ/О у мітохондріях нирок при гострій інтоксикації нітратом натрію після додавання у середовище інкубації бичачого сироваткового альбуміну (п моль АДФ/натом О).

підтверджується тим, що через 24 год після введення тваринам нітрату натрію у нирках спостерігається найбільший рівень ДНКЗ (перевищує норму на 251,6 %), які є своєрідним «депо оксиду азоту» [3, 20]. При цьому накопичення ДНКЗ знаходиться у високій зворотній кореляційній залежності зі зміною коефіцієнту АДФ/О ($r = -0,91$). Відомо, що оксид азоту, який утворюється внаслідок відновлення нітритів при екзогенному введенні останніх, викликає роз'єднання процесів окислення та фосфорилування у печінці білих щурів [10]. Таким чином, можна зробити висновок, що наприкінці 1-ї доби гострої інтоксикації нітратом натрію порушення сполучення ТД і ОФ переважно пов'язане з роз'єднуючою дією оксиду азоту, який утворюється внаслідок відновлення нітрат- та нітрит-іонів.

Встановлений в останні роки інгібуючий ефект NO на біоенергетичні процеси, який пов'язують з порушенням структури залізовмісних ферментів (аконітази, НАД-убіхінонредуктази, цитохромів, каталази) [14, 17] дозволяє припустити, що відповідальним за розвиток тяжкого гіпоергозу за умов гострої інтоксикації нітратами є оксид азоту. Це підтверджується тим фактом, що збільшення рівня ДНКЗ у динаміці гострого отруєння негативно корелює з концентрацією АТФ і показниками ефективності ОФ у тканині нирок. Таким чином, у патогенезі біоенергетичної недостатності в нирках при даній патології важливе значення має розвиток не лише гемічної (рівень метгемоглобіну через 2 год становить $38,9 \% \pm 4,8 \%$, через 6 і 24 год — $62,7 \pm 5,6$ та $55,6 \% \pm 5,3 \%$ і відповідає тяжкій формі метгемоглобінемії), але й первинної тканинної гіпоксії [1].

Протягом перших 10 діб відновлювального періоду гострої інтоксикації нітратом натрію тварини, які залишалися живими, знаходилися все ж таки у важкому стані, хоча деяка позитивна динаміка у концентрації метгемоглобіну в крові, ДНКЗ у нирках щурів (рис. 2) та загальному стані тварин

спостерігалася. Це узгоджується з одержаними результатами. Так, вміст АТФ і Φ_n протягом 7 діб після введення нітрату натрію вірогідно відрізнявся від контрольних значень. Концентрація АТФ через 3 доб була зменшена на 36,6 %, через 7 діб — на 18,8 %, вміст Φ_n перевищував норму відповідно на 19,8 та 19,7 %. При цьому очевидно, що вже через 5 діб концентрація АТФ збільшується порівняно з значенням через 24 год на 65,0 %, ЕП — на 47,3 %, а вміст АМФ та Φ_n зменшується на 50,0 і 14,0 %. Це показує, що протягом відновлювального періоду поряд з використанням значної кількості макроергів для потреб репаративної регенерації тканин, відзначається поліпшення процесів ресинтезу АТФ. Проте, незважаючи на це, протягом перших 10 діб відновлювального періоду показники енергетичного обміну не досягають значень контрольної групи. Так, і через 10 діб ЕП на 14,3 % нижче від норми. За 5-ту добу залишаються значно зниженими швидкість фосфорилуючого дихання, ДК і коефіцієнт АДФ/О.

Таким чином, гостра інток-

сикація нітратом натрію супроводжується істотними змінами енергетичного метаболізму в нирках, які виявляються у пригніченні та роз'єднанні окислення та фосфорилування, зниженні енергетичного потенціалу. Вказані зміни пов'язані значною мірою, поряд з розвитком гемічної гіпоксії, також із накопиченням у тканині нирок комплексів оксиду азоту із залізо-вмісними білками, що беруть участь у біоенергетичних процесах. Це дозволяє припустити важливе значення корекції названих порушень у попередженні та терапії токсичної нефропатії при гострій інтоксикації нітратами.

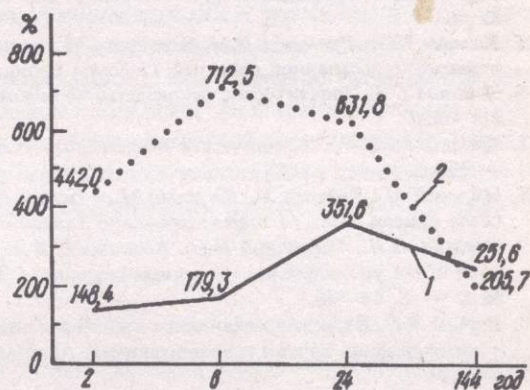


Рис. 2. Зміни вмісту динітрозильних комплексів заліза (1) у нирках та метгемоглобіну (2) у крові білих шурів у динаміці гострої інтоксикації (% відносно вихідних значень) нітратом натрію.

V.A.Koostenko

CHANGES OF ENERGETIC METABOLISM IN THE WHITE RATS KIDNEYS IN DYNAMICS OF ACUTE INTOXICATION BY SODIUM NITRATE

Experimental study of white rats has shown that the intragastral introduction of sodium nitrate at a rate of 9.6 g/kg of their mass is followed by the development of considerable disturbances of energy metabolism in kidneys. It was shown that the depression and separation of oxidation and phosphorylation, decrease energetic potential in the kidney tissues. The results obtained permit supposing the significant role of nitric oxide in kidneys as a factor resulting in bioenergetic disturbances. Maximum maintenance of Fe-NO complexes was marked 24 hours after the introduction of sodium nitrate and it corresponded to maximum disturbances of energy metabolism.

Medical Stomatological Institute,
Ministry of Public Health of Ukraine, Poltava

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ажила Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. Экологические и медико-биологические проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами // Физиология человека. — 1990. — 16, № 3. — С. 131—149.
2. Айвазян Л.К. Морфологические исследования в токсиколого-гигиенической оценке нитратов // Гигиена и санитария. — 1986. — № 11. — С. 72—73.
3. Варич В.Я., Ванин А.Ф., Овсянникова Л.М. Обнаружение эндогенной окиси азота в печени мышей методом электронного парамагнитного резонанса // Биофизика. — 1987. — 32, Вып. 6. — С. 1062—1063.
4. Гоженко А.И. Энергетическое обеспечение основных почечных функций и процессов в норме и при повреждении почек. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Черновцы, 1986. — С. 40.
5. Калиога В.П., Яременко З.М. К вопросу об изменениях сердечно-сосудистой системы при отравлении аммиачной селитрой // Клини. медицина. — 1966. — № 11. — С. 49—50.
6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Вышш. школа, 1980. — С. 215—216.
7. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. — Л.: Медицина, 1968. — 326 с.
8. Милов П.М., Туйчиев Б., Юнусова М.А. Острое отравление нитратным азотом (селитрой) после приема дынь // Здравоохранение Таджикистана. — 1984. — № 3. — С. 69—71.
9. Опополь Н.И., Ольшевский П.И., Компаниец В.А. и др. Случай острого отравления нитратами после употребления тепличных огурцов // Здравоохранение (Кишинев). — 1989. — № 5. — С. 44—46.
10. Реутов В.П. Изучение механизмов восстановления нитритных ионов в окись азота в крови и митохондриях печени млекопитающих. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1988. — С. 26.
11. Толстых П.И., Титов А.И., Романова Н.А., Угарова Н.Н., Бровка Л.Ю. Определение концентрации АТФ в экстракте // Экспресс-метод определения микробной обсеменности при лечении гнойных инфекций: Метод. рекомендации. — М., 1991. — 9 с.
12. Чумаков В.Н., Крупеникова Л.И. Изменения и фармакологическая коррекция окислительного фосфорилирования при региональной ишемии почек // Вопр. мед. хим. — 1986. — № 4. — С. 86—90.
13. Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers // Biochemistry. — 1968. — 7, № 11. — P. 4030—4034.
14. Bergmann L., Kroncke K.-D., Suschek C., Kolb H., Kolb-Bachofern V. Cytotoxic action of IL-1b against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by N-monomethyl-L-arginine // FEBS Lett. — 1992. — 299, № 1. — P. 103—106.
15. Chance B., Williams G.R. The respiratory chain and oxydative phosphorylation // Adv. Enzymol. — 1956. — 17. — P. 65—134.
16. Ellen G., Schuller P.L., Bruijns E. et al. Volatile N-nitrosamines, nitrate, and nitrite in urine and saliva of healthy volunteers after administration of large amounts of nitrate // N-nitroso Compounds: Occurrence and Biological Effects. — IARS Sci. Publ, 1982. — 41. — P. 365—378.
17. Hibbs J.B., Taintor R.R., Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite // Science. — 1987. — 235, № 4. — P. 437—440.
18. Jaworek D., Gruber W., Bermeyer H.V. Adenosin-5'-diphosphat und adenosin-5'-monophosphat // Methoden der enzymatischen analyse. 3 ed. — Weinheim: Verlag — Chemie, 1974. — V. II. — S. 2147—2151.
19. Klug G.A., Krause J., Ostlund A.-K., Knoll G., Brdiczka D. Alterations in liver mitochondrial function as a result of fasting and exhaustive exercise // Biochim. et biophys. acta. — 1984. — 764. — P. 272—282.
20. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology // Pharm. Reviews. — 1991. — 43, 2. — P. 109—142.

Полтав. мед. стомат. ін-т
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 28.11.94