

Вплив гіпербаричної оксигенації на енергетичний метаболізм у печінці білих щурів при гострій інтоксикації нітратом натрію

Проведены исследования энергетического метаболизма в печени белых крыс, которым вводили нитрат натрия в дозе ЛД₅₀. Выявлена обратная корреляционная зависимость между содержанием «депо» оксида азота (NO) - динитрозильных комплексов железа в ткани печени и снижением в ней энергетического потенциала. Установлено, что гипербарическая оксигенация предотвращает глубокие нарушения энергетического метаболизма в печени при острой нитратной интоксикации и способствует повышению эффективности окислительного фосфорилирования. Сделано предположение, что положительный эффект ГБО при интоксикации нитратами связан с торможением восстановления нитрат-иона до более токсичных метаболитов (в частности NO).

Вступ

Широке застосування нітратів у сільському господарстві та промисловості нерідко призводить до гострих отруєнь. Найбільш чутливими до токсичної дії нітратів є діти [11]. У літературі описані випадки розвитку структурних і функціональних порушень функцій печінки при гострій інтоксикації солями азотної кислоти [2, 4]. Тому великий інтерес має вивчення можливості запобігання порушень метаболічних процесів, насамперед таких важливих для детоксикації, як біоенергетичні, при гострій інтоксикації нітратами за допомогою гіпербаричної оксигенації (ГБО), ефективність якої доведена при лікуванні отруєнь різного генезу [8].

Метою нашого дослідження було вивчення стану енергетичного метаболізму в печінці білих щурів у динаміці гострої інтоксикації нітратом натрію за умов гіпербаричної оксигенації.

Методика

Дослідження були проведені на 92 білих щурах лінії Вістар масою 160-250 г. У першій серії експериментів моделювали гостру інтоксикацію введенням тваринам нітрату натрію у дозі ЛД₅₀ (9,6 г/кг). У другій серії щурам вводили нітрат натрію з наступним застосуванням сеансів ГБО, які проводили в барокамері об'ємом 3 л протягом 1 год при надлишковому тиску кисню 2029 гПа через 30 хв після отруєння. Необхідні показники вивчали через 2 і 24 год після проведення дослідів. Контролем були інтактні тварини. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом.

Концент
використан
[13], вмі
(АМФ) ки
акцій [16]
[6]. Енер
Atkinson [

Функціо
та William
методико
методом
біотрансфор
спектрометр
динітрозил
g = 2,03

Результати

При вивчен
рез 2 год
та співвідн
тканині пе
41,2 %, А
Концентрац
інтактної с
до зниженн
свідчать пр
з одного б
АТФ, а
підтверджує
цесів окисл
зниженні п
3 за Чансо
рівні. Кон
Відзначаєть
люючого (у
трольовано
показників,
та фосфори
АДФ/О (на
значення м
ланцюга - і
Одержані р
гострій ін
мітохондрій
лювального
ворення ма

Концентрацію аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) визначали з використанням біоломінесцентного АТФ-реагенту «Іммолюм» (Росія) [13], вміст аденозиндифосфорної (АДФ) та аденозинмонофосфорної (АМФ) кислот вивчали в одній пробі за допомогою сполучених реакцій [16], неорганічного фосфату (Фн) - за рекомендаціями Кочетова [6]. Енергетичний потенціал (ЕП) розраховували за формулою Atkinson [14].

Функціональний стан мітохондрій досліджували за методом Chance та Williams [15]. Активність цитохромоксидази (ЦХО) визначали за методикою Straus [20]. Вміст метгемоглобіну вивчали геміглобіновим методом [7]. Накопичення у тканині печінки продукту біотрансформації нітратів - оксиду азоту (NO) вивчали методом ЕПР-спектрометрії за оцінкою спектрів його тканинного «депо» - динітрозильних комплексів заліза (ДНКЗ) при значенні показника $g = 2,03$ [3].

Результати та їх обговорення

При вивченні стану енергетичного метаболізму слід відмітити, що через 2 год після отруєння нітратом натрію відзначаються зміни вмісту та співвідношення аденілових нуклеотидів і неорганічного фосфату у тканині печінки (табл. 1). Так, концентрація АТФ зменшується на 41,2 %, АДФ - на 40,6 %, сума аденіннуклеотидів - на 14,0 %. Концентрація АМФ і Фн перевищує значення цих показників інтактної серії на 49,0 і 46,5 % відповідно. Вказані зміни призводять до зниження енергетичного потенціалу на 31,7 %. Наведені результати свідчать про те, що вже у перші години гострої нітратної інтоксикації з одного боку відзначається підвищений розпад макроергів, зокрема АТФ, а з іншого - знижується їхній ресинтез. Останнє підтверджується тим, що в той же час відзначається порушення процесів окислювального фосфорилування (табл. 2), яке проявляється у зниженні швидкості фосфорилуючого дихання (у метаболічному стані 3 за Чансом). Через 24 год указані зміни утримуються на тому ж рівні. Концентрація Фн залишається підвищеною на 49,4 %. Відзначається зниження швидкості ендogenous (на 42,7 %), фосфорилуючого (у метаболічному стані 3 за Чансом - на 51,2 %) та контрольованого (у метаболічному стані 4 - на 37,3 %) дихання, а також показників, які характеризують ступінь сполучення процесів окислення та фосфорилування - дихального контролю (ДК - 21,2 %) і коефіцієнту АДФ/О (на 21,6 %). У розвитку біоенергетичної недостатності важливе значення має зниження активності термінального ферменту дихального ланцюга - цитохромоксидази (через 24 год після отруєння - на 60,0 %). Одержані результати дозволяють зробити висновок про порушення при гострій інтоксикації нітратом натрію функціонального стану мітохондрій печінки, що призводить до зниження ефективності окислювального фосфорилування і, як наслідок цього, до зменшення утворення макроергічних сполук.

Таблиця 1. Вміст аденілових нуклеотидів і неорганічного фосфату в печінці білих щурів при гострій інтоксикації нітратом натрію та при застосуванні гіпербаричної оксигенації (ГБО)

Показник	Інтактні тварини	Після введення нітрату натрію		Застосування ГБО після введення нітрату натрію	
		через 2 год	через 24 год	через 2 год	через 24 год
Концентрація, мкмоль/г					
АТФ	2,45±0,12	1,44±0,16 P<0,001	1,42±0,18 P<0,001	1,92±0,15 P>0,02 P'<0,02	1,98±0,23 P>0,05 P'>0,05
АДФ	1,06±0,05	0,63±0,07 P<0,01	0,61±0,08 P<0,001	0,86±0,05 P<0,02 P'<0,05	0,92±0,11 P>0,05 P'<0,05
АМФ	0,49±0,16	2,22±0,09 P<0,01	2,21±0,20 P<0,02	1,73±0,12 P>0,05 P'<0,01	1,50±0,16 P>0,05 P'<0,02
Неорганічного фосфату	19,63±2,11	28,76±1,17 P<0,01	29,32±2,65 P<0,02	22,51±1,56 P>0,05 P'<0,01	18,42±1,97 P>0,05 P'<0,01
Енергетичний потенціал	0,60±0,02	0,41±0,02 P<0,001	0,37±0,03 P<0,001	0,52±0,02 P<0,02 P'<0,01	0,55±0,03 P>0,05 P'<0,01

Примітка. P - вірогідність різниці порівняно з контролем; P' - при порівнянні результатів дослідів з застосуванням ГБО з результатами відповідної серії без застосування ГБО.

Виявлено збільшення у тканині печінки вмісту своєрідного депо «оксиду азота» - ДНКЗ, рівень яких підвищується за 24 год після введення нітрату натрію 3,5 разів. Відомо, що NO здатний пригнічувати проліферативні біоенергетичні та біосинтетичні процеси, що пов'язують з порушенням структури та функції ферментів, які мають у складі активних центрів іони заліза чи міді, зокрема, аконітази, НАД-убіхінонредуктази, цитохромів тощо [10, 18]. Указана властивість NO зумовлює його цитотоксичний ефект, здатність викликати апоптоз і некроз тканин [19]. Вплив оксиду азоту на розвиток біоенергетичної недостатності у клітинах печінки при гострій інтоксикації нітратом натрію підтверджується тим, що збільшення вмісту ДНКЗ знаходиться у достовірній зворотній кореляційній залежності зі значенням енергетичного потенціалу ($r = -0,77$). Окрім цього, доведена роль NO у роз'єднанні окислення та фосфорилування в печінці та нирках білих

Таблиця
печінки білих
гіпербаричної

Показник

Швидкість дихання, ммоль O₂/хв·г

ендогенний

фосфорилуючого (V_{max})

контрольного (V_{max})

Дихальний контроль

Коефіцієнт АДФ/О₂, ммоль АДФ/натом

Активність цитохрому од.акт.

щурів [1, при гострому розвитку вторинної гіпоксії [1, через 2 год ± 3,6 %), NO на мочі очікувати, спонукати редження дослідження

Таблиця 2. Процеси дихання та окислювальне фосфорилування у мітохондріях печінки білих щурів при гострій інтоксикації нітратом натрію та за умов застосування гіпербаричної оксигенації (ГБО)

Показник	Інтактні тварини	Після введення нітрату натрію		Застосування ГБО після введення нітрату натрію	
		через 2 год	через 24 год	через 2 год	через 24 год
Швидкість дихання, нмоль O ₂ /хв·г					
ендогенного	770±66	671±50	441±41	723±52	622±48
		P>0,05	P<0,01	P>0,05	P>0,05
				P'>0,05	P'<0,02
фосфорилуючого (V ₃)	3521±213	2881±185	1717±134	3027±182	2141±141
		P<0,05	P<0,001	P>0,05	P<0,001
				P'>0,05	P'<0,05
контрольованого (V ₄)	1286±87	1078±81	803±81	1120±68	935±71
		P>0,05	P<0,01	P>0,05	P<0,01
				P'>0,05	P'>0,05
Дихальний контроль	2,75±0,07	2,69±0,06	2,17±0,07	2,71±0,08	2,31±0,08
		P>0,05	P<0,001	P>0,05	P<0,01
				P'>0,05	P'>0,05
Коефіцієнт АДФ/О, нмоль АДФ/натом О	2,27±0,06	2,26±0,06	1,78±0,06	2,27±0,07	2,05±0,08
		P>0,05	P<0,001	P>0,05	P<0,05
				P'>0,05	P'<0,02
Активність цитохромоксидази, од. акт.	16,64±1,35	13,64±1,07	6,65±0,88	13,94±1,09	9,47±0,92
		P>0,05	P<0,01	P>0,05	P<0,001
				P'>0,05	P'<0,05

щурів [1, 5]. Таким чином, у патогенезі біоенергетичної недостатності при гострому отруєнні нітратом натрію важливе значення мають розвиток вторинної тканинної гіпоксії, яка є наслідком тяжкої гемічної гіпоксії [12] (за нашими результатами вміст метгемоглобіну становить через 2 год після отруєння - 26,9 % ± 3,3 %, через 24 год - 37,8 % ± 3,6 %), і первинної тканинної гіпоксії, яку можна пов'язати з дією NO на мітохондрії [1, 5]. Виходячи з наведеного вище можна очікувати, що порушення енергетичного метаболізму в печінці може спонукати її функціональні розлади [2]. У зв'язку з цим, для попередження та терапії токсичних пошкоджень печінки нами був досліджений метод ГБО.

Через 2 год після введення тваринам нітрату натрію з наступним застосуванням ГБО відзначається збільшення вмісту у тканині печінки АТФ та ЕП (див. табл. 1) порівняно з результатами другої серії на 33,3 та 26,8 % відповідно. Через 2 та 24 год знижується концентрація Φ_n (на 21,7 і 37,2 %), що вказує на покращення процесу ресинтезу АТФ. При аналізі полярограм (див. табл. 2) через 24 год після отруєння та застосування сеансу ГБО спостерігається прискорення швидкості ендogenous (на 41,0 %) та фосфорилуючого (на 24,7 %) дихання. ГБО попереджує зниження коефіцієнта ефективності фосфорилування АДФ/О (на 15,2 %). Через 24 год після отруєння в печінці білих щурів, які одержували ГБО, спостерігається підвищення активності ЦХО (див. табл. 2). Вказані зміни, певною мірою, можна пов'язати з пригніченням швидкості відновлення нітрат-іонів до більш токсичних сполук (нітрит-іонів, оксиду азота) [5], що підтверджується зменшенням у печінці вмісту ДНКЗ у щурів, яким призначався сеанс ГБО (через 24 год - на 24,4 % порівняно з результатами другої серії). Відомо, що кисень здатний окислювати NO та нітрит-іон до нітрату [9], а також пригнічувати нітритредуктазну активність гемоглобіну [1]. На відміну від нітриту нітрат має властивість виводитися з сечею [17], що може після сеансу ГБО призводити до збільшення екскреції значної кількості нітрату та запобігати його біотрансформацію до більш активних сполук.

Таким чином, проведене дослідження дозволяє зробити висновок, що застосування ГБО при гострій інтоксикації нітратом натрію обмежує глибокі порушення енергетичного метаболізму в печінці білих щурів та позитивно впливає на показники тканинного дихання та окислювального фосфорилування, що, очевидно, зумовлює наслідки отруєння та відбивається на підвищенні рівня виживання лабораторних тварин.

L.J. Glebova

INFLUENCE OF HYPERBARIC OXYGENATION ON ENERGY METABOLISM IN LIVER UNDER ACUTE INTOXICATION OF SODIUM NITRATE

The experimental study carried out on white rats, which was introduced of sodium nitrate at a dose of 9,6 g/kg of their mass. It is followed by the development of considerable disturbances of energy metabolism in liver. It has been shown the depression and the uncoupling of oxidation and phosphorylation, decrease of energy quotient in hepatic tissues. The results obtained permit supposing the significant role of nitric oxide (NO) in liver as a factor resulting in decrease of energy potential. The research has stated that the use of hyperbaric oxygenation (HBO) prevents difficult disturbances of energy metabolism in liver of white rats. The results permit supposing that the effect HBO is connected with the decrease of the speed of reduction of nitrate-ions to more toxic products of their biotransformation.

Medical Stomatological Academy,
Ministry of Public Health of the Ukraine, Poltava

СПИСОК ЛІТ

1. Ажина Я.А. Мы загрязнены. - 1990. - 16.
2. Биленко Л. - 1989. - 36.
3. Варич В.Я. Ни мышей. Вып. 6. - 4.
4. Волкова Н. Трия // Тр.
5. Костенко. нитратом н. Київ, 1996.
6. Кочетов Л. - С. 215-2.
7. Кушаковск. - 326 с.
8. Лужников. сиегация. - 1983.
9. Маленченк. в крови об. С. 674-675.
10. Маркосян. Биохимия.
11. Раманауск. нитратами.
12. Середенко. ния. - В. М.М.Серед.
13. Толстых Л. тракте. - 1. гнойных и.
14. Atkinson D. with feedba.
15. Chance B., - 1955. - 2.
16. Jaworek D., - In.: Methc. - S. 2147-2.
17. Leaf C.D. N. Carcinogene.
18. Moncada. pharmacolog.
19. Nicotera P. of apoptosis.
20. Straus W. C. 207, № 2.

Укр. мед. стом.
М-ва охорони.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ажина 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. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. - М.: Медицина, 1989. - 368 с.
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. Волкова Н.В. Изменения функционального состояния печени при воздействии нитрита натрия // Труды Ленинград. гос. сан.-гиг. ин-та. - 1973. - 103. - С. 84-87.
5. Костенко В.О. Зміни енергетичного метаболізму і функцій нирок при гострій інтоксикації нітратом натрію в умовах гіпербаричної оксигенації: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Київ, 1996. - 21 с.
6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высш. школа, 1980. - С. 215-216.
7. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. - Л.: Медицина, 1968. - 326 с.
8. Лужников Е.А., Лукин-Бутенко Г.А., Исаков Ю.В., Макаренко О.Н. Гипербарическая оксигенация при лечении острых экзогенных отравлений // Анестезиология и реаниматология. - 1983. - № 2. - С. 41-45.
9. Маленченко А.Ф., Асафова Л.П., Кучук В.С., Жигунова Л.Н. Динамика нитритного обмена в крови облученных крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1987. - № 12. - С. 674-675.
10. Маркосян К.А., Пайтян Н.А., Налбандян Р.М. Влияние нитрита на цитохромоксидазу // Биохимия. - 1981. - 46, Вып. 9. - С. 1615-1621.
11. Раманаускайте М.Б., Пташекас Р.С., Красильчиков Д.Г. Особенности отравления детей нитратами // Педиатрия. - 1990. - № 4. - С. 62-65.
12. Середенко М.М., Миняйленко Т.Д., Пожаров В.П. и др. Развитие гипоксического состояния. - В кн.: Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии / Под ред. М.М.Середенко. - К.: Наук. думка, 1987. - С. 5-18.
13. Толстых П.И., Титов А.И., Романова Н.А. и др. Определение концентрации АТФ в экстракте. - В кн.: Экспресс-метод определения микробной обсемененности при лечении гнойных инфекций: Методические рекомендации. - М., 1991. - С. 9.
14. 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.
15. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxydative phosphorylation // J. Biol. Chem. - 1955. - 217, № 2. - P. 409-428.
16. Jaworek D., Gruber W., Bermeyer H.V. Adenosin-5'-diphosphat und adenosin-5'-monophosphat. - In.: Methoden der enzymatischen analyse. 3 ed. - V. II. - Weinheim: Verlag - Chemie, 1974. - S. 2147-2151.
17. Leaf C.D. Nitrate biosynthesis in rats, ferrets and humans. Precursor studies with L-arginine // Carcinogenesis. - 1990. - 11, № 5. - P. 855-858.
18. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology // Pharm. Reviews. - 1991. - 43, № 2. - P. 109-142.
19. Nicotera P., Bonfoco E., Brune B. Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: Involvement of apoptosis // Adv. Neuroimmunol. - 1995. - 5, № 4. - P. 411-420.
20. Straus W. Colorimetric microdetermination of cytochrome c oxidase // J. Biol. Chem. - 1954. - 207, № 2. - P. 733-743.

Укр. мед. стомат. академія
М-ва охорони здоров'я України, Полтава

Матеріал надійшов
до редакції 15.04.97