

А.А.Бабанин
А.Н.Захарова
Т.В.Семенова
Е.Н.Нестеров
В.Б.Калиберденко

Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского

Ключевые слова: эндотоксин, печень, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, пептиды средней массы.

Надійшла: 14.01.2009
Прийнята: 02.03.2009

УДК 616.36+616.89-008.44.13:541.515

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЭНДОТОКСИНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

Резюме. Одна из важных проблем современной медицины – повреждение печени токсическими веществами. Были изучены особенности морфологических изменений ткани печени и уровень биохимических маркеров окислительного стресса при эндотоксикозной интоксикации в эксперименте. Исследования выполнялись путем создания модели эндотоксикозного поражения печени у крыс. Опыты проводились на 40 нелинейных крысах, разделенных на 2 группы по 20 животных. Животным первой группы в течение 7 суток производили интраперитонеальные инъекции препарата эндотоксина кишечной палочки (фирмы «Sigma» USA K-235) из расчета 0,1 мг/кг массы тела. Животные второй группы служили контролем. Характер и степень повреждений печени изучался морфологически, включая электронную и световую микроскопию. Для изучения окислительного стресса были применены биохимические методы определения конъюгированных диенов и диенкетонов, спонтанной окислительной модификации белков. Были получены следующие результаты: 1) выраженность и глубина морфологических изменений в печени при эндотоксикозной интоксикации коррелировала с динамикой содержания продуктов окисления липидов (конъюгированные диены и диенкетоны, малоновый диальдегид) и белков. Отмечалась тенденция к более значительному росту окислительной модификации белков в сыворотке крови. Это подтверждает данные о первичном повреждении белков под действием свободных радикалов. 2) Под влиянием эндотоксина кишечной микрофлоры, развивались выраженные дисциркуляторные изменения, жировая и гидрорическая дистрофия гепатоцитов с признаками токсического повреждения их ядер, но вместе с тем сохранялась повышенная функциональная активность синусоидальных клеток. Эти изменения являлись следствием как прямого токсического действия эндотоксина, так и окислительного стресса, мощным индуктором которого является эндотоксин. Полученные результаты показывают, что эндотоксин является фактором, приводящим к ухудшению функциональных свойств печени.

Морфологія. – 2009. – Т. III, № 2. – С. 5-11.

© А.А.Бабанин, А.Н.Захарова, Т.В.Семенова, Е.Н.Нестеров, В.Б.Калиберденко, 2008

Babanin A.A., Zacharova A.N., Semyonova T.V., Nesterov E.N., Kaliberdenko V.B. Morphological characteristics of free radical processes in endotoxin damage of liver.

Summary. One of the most important problems of the modern medicine is the damage of liver due to alcoholic disease. Our studies showed some features of morphological changes of liver tissues and level of biochemical markers of oxidative stress, due to experimental endotoxin intoxication. Investigations were done with the aim of modeling the endotoxin damage to the liver of rats. Investigation was carried out on 40 nonlinear rats, divided into 2 groups with 20 rats in each group. The animals of the first group were given for 7 days with intraperitoneal injections of Escherichia coli endotoxin (Sigma USA DO-235), dosage 0,1 mg/kg of body weight. Animals of the second group were used as a control. Character and level of liver damage was studied with the help of morphological methods, including electron and light microscopy. In studying of oxidative stress biochemical methods were used to define conjugated diens and dienktones, spontaneous oxidative modifications of proteins. The following results were revealed: 1) level and depth of morphological changes under endotoxin intoxication correlated with dynamic of content of products of lipid (conjugated diens and dienktones, malonic aldehyde) and protein. The tendency was shown to more significant increase of oxidative modification of proteins in blood serum. It corroborated the data about primary damage of proteins under the effect of free radicals. 2) Under the influence of endotoxins of intestinal microflora, severe discirculatory changes, fat and hydroptic dystrophy of hepatocytes with symptoms of toxic damage of their nucleus were found, meanwhile increased functional activity of sinusoidal cells was observed. These changes happened due to direct effects of the endotoxin, and also as a result of oxidative stress. Powerful inductor of these changes was endotoxin. Obtained results showed, that endotoxin is the main factor, which leads to worsening of vital activity of the liver.

Key words: endotoxin, liver, oxidative modification of proteins, peroxidation of lipids, peptides of average mass.

Введение

В физиологических условиях эндотоксин (ЭТ), выделяющийся при самообновлении пула кишечной палочки, является облигатным стимулом для формирования иммунной системы и гомеостаза организма. Он постоянно всасывается из кишечника и поступает в печень. В норме ЭТ, содержащийся в портальной крови, подвергается детоксикации в гепатоцитах (Пермяков Н.К. и соавт., 1989).

Нарушение барьерной функции кишечной стенки и механизмов нейтрализации эндотоксина приводит к системной эндотоксинемию кишечного происхождения. Ее развитию способствуют: стресс, интоксикация, снижение неспецифической резистентности организма, а также повреждение слизистой оболочки кишечника, дисбактериозы, воспалительные заболевания и интоксикации, при которых увеличивается в организме общее количество грамотрицательных бактерий, особенно в тонком кишечнике, где слизистая более ранима и проницаема для эндотоксина (Сынкova Н.В. и соавт., 1995).

Преодолевая физиологический барьер, эндотоксин вступает во взаимодействие с клетками макрофагально-моноцитарной системы, тем самым активируя их и индуцируя выделение цитокинов, ведущее место из которых принадлежит фактору некроза опухоли (ФНО), интерлейкину-1, интерлейкину-6, интерлейкину-10 (Fearnс C., Loskutoff D.J., 1997; Hill D.B. et al., 2002).

Взаимодействуя с различными клетками макроорганизма, цитокины усиливают фагоцитоз, вызывают дегрануляцию базофилов и макрофагов, что сопровождается оксидантным стрессом, увеличением выработки супероксидных радикалов, гидролаз (Jaeschke H., 2000; Hargis H.W. et al., 2002) и вызывает глубокие дистрофически-деструктивные изменения на тканевом и клеточном уровнях.

Целью исследования является оценка характера и тяжести повреждений гепатоцитов, степени проявления оксидантного стресса при воздействии эндотоксина. Установление особенностей морфологических изменений печени и уровня биохимических маркеров окислительного стресса при эндотоксиновой интоксикации в эксперименте.

Материалы и методы

В работе рассмотрена модель эндотоксинового поражения печени у крыс. Характер и степень повреждений печени изучался морфологически, включая электронную и световую микроскопию. Опыты проводили на 40 нелинейных крысах, разделенных на 2 группы по 20 животных. Животным 1-ой группы производили в течение 7-ми дней интраперитонеальные инъекции препарата ЭТ кишечной палочки (фирмы «Sigma» USA K-235) из расчета 0,1 мг/кг массы тела. Животные 2-ой группы служили контро-

лем. Ткань печени для морфологического исследования забирали в течение 10-20 минут после забоя животных декапитацией. Для изучения оксидантного стресса были использованы биохимические методы определения конъюгированных диенов и диенкетонов, как первичных продуктов перекисного окисления липидов, по методике И.Д.Стальной в модификации К.С.Казакова и Л.Л.Сидоровой (Стальная И.Д., 1977; Убайдуллаев А.М. и соавт., 1994).

Содержание малонового диальдегида (МДА), как вторичного продукта перекисного окисления липидов, определяли при помощи диагностических наборов ТБК–Агат.

Изучение спонтанной окислительной модификации белков по методу А.А.Левина в модификации Е.Е.Дубининой (Дубинина Е.Е., и др., 1995).

Молекулы средней массы определяли по методу Н.И.Габриэляна в модификации Д.Л.Брасюк (Габриэлян Н.И., Липатова В.И., 1984).

Результаты и их обсуждение

При внутрибрюшинном введении эндотоксина значительная его часть, по-видимому, затрачивается на активацию перитонеальных макрофагов, поскольку для этого требуется в 10-20 раз меньше ЭТ, чем для активации звездчатых ретикулоэндотелиоцитов. Тем не менее, даже при данных условиях опыта определенная часть ЭТ поступала в портальный кровоток и вызывала активацию звездчатых макрофагов (клеток Купфера).

На фоне резкого полнокровия с явлениями стаза и сладжа эритроцитов отмечалось разрыхление цитозоля гепатоцитов, что сопровождалось снижением четкости клеточной мембраны, что свидетельствовало об интрацеллюлярном отеке (рис. 1).

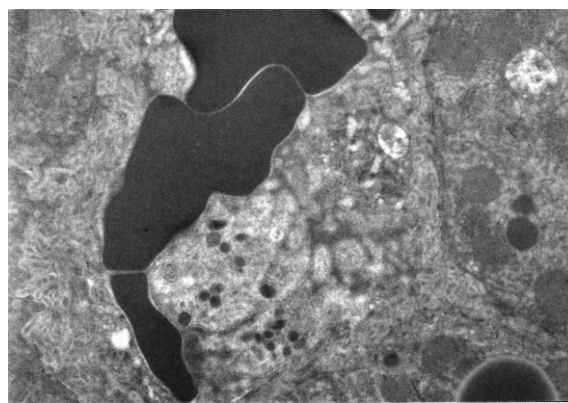


Рис. 1. Полнокровие синусоидов с явлениями сладжа эритроцитов; жировые вакуоли в цитоплазме. Серия 4. $\times 4000$.

В некоторых синусоидах содержались единичные полиморфноядерные лейкоциты и, иногда, – мелкие хромотофильные частицы с четки-

ми контурами, напоминающие апоптотные тельца. Во многих гепатоцитах ядра сохраняли лишь бледно окрашенные фрагменты оболочки и превращались в свободно лежащие глыбки хроматина (Бабанин А.А. и соавт., 2003).

В некоторых случаях у данной группы удалось обнаружить в стенках синусоидов отдельные клетки – макрофаги с цитологическими признаками активации: многочисленными цитоплазматическими отростками и мелкими перинуклеарными вакуолями (рис. 2).

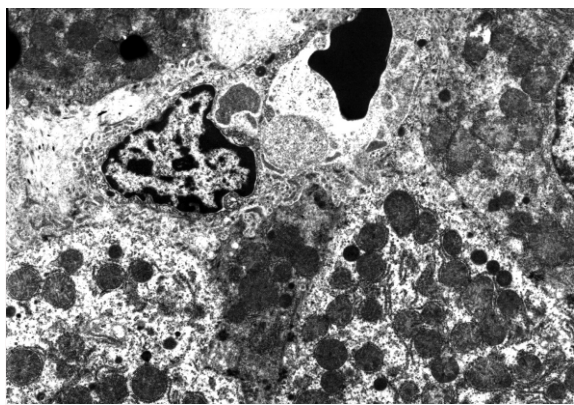


Рис. 2. Макрофаг с признаками фагоцитарной активности. Серия 4. $\times 2000$.

Ультраструктурное исследование печени выявило существенные изменения в клетках печени дистрофического, а иногда и деструктивного характера. Ядерный хроматин был как в конденсированной, так и в неконденсированной форме, наружная оболочка ядра местами была лизирована. Митохондрии гепатоцитов набухли, содержали электронно-прозрачный матрикс. Кристы были частично разрушены. Их количество в митохондриях существенно снижалось (рис.3). Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулаума были расширены и представляли собой разной формы и размеров электронно-прозрачные вакуоли. На мембранах гранулярной эндоплазматической сети локализовались рибосомы, количество которых было значительно меньше, чем в группе интактных крыс.

В цитоплазме значительно снижалось количество гранул гликогена, рибосом и полисом. Желчные капилляры и пространства Диссе были расширены, микроворсинки были укороченными, отёчными и частично разрушенными. Отдельные гепатоциты имели гиалоплазму высокой электронной плотности с плотноупакованными органеллами.

Эндотелиоциты имели дистрофические и деструктивные изменения органелл. Перинуклеарные пространства были значительно расширены. Ядра эндотелиоцитов имели глубокие инвагинации ядерной мембраны. В отдельных клетках выявлялся лизис цитоплазматической мем-

браны, который сопровождался выходом в просвет капилляра органелл и внутриклеточных включений. В митохондриях встречались очаги деструкции мембран и крист.

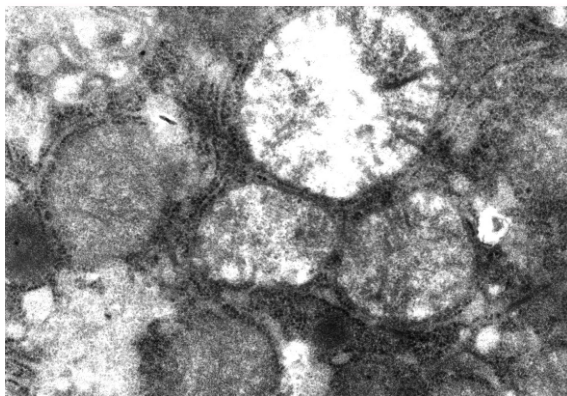


Рис. 3. Митохондрии с электронно-прозрачным матриксом и очагами деструкции крист. Серия 4. $\times 8000$.

Активность звездчатых макрофагоцитов была повышена (рис. 4). Мембраны гранулярной эндоплазматической сети расширены. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи гипертрофирован. Ядра звездчатых ретикулоэндотелиоцитов сохраняли типичную локализацию в цитоплазме, хроматин находился преимущественно в конденсированном состоянии. Цитоплазматическая мембрана, обращенная в пространство Диссе, образовывала многочисленные ворсинки. Часть звездчатых макрофагоцитов содержала большое количество фагоцитированного материала, деструктивно измененные митохондрии.

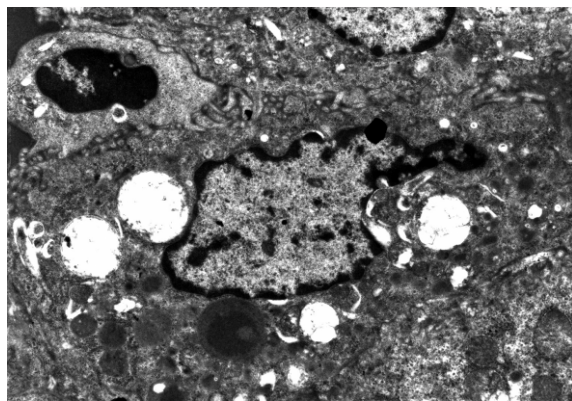


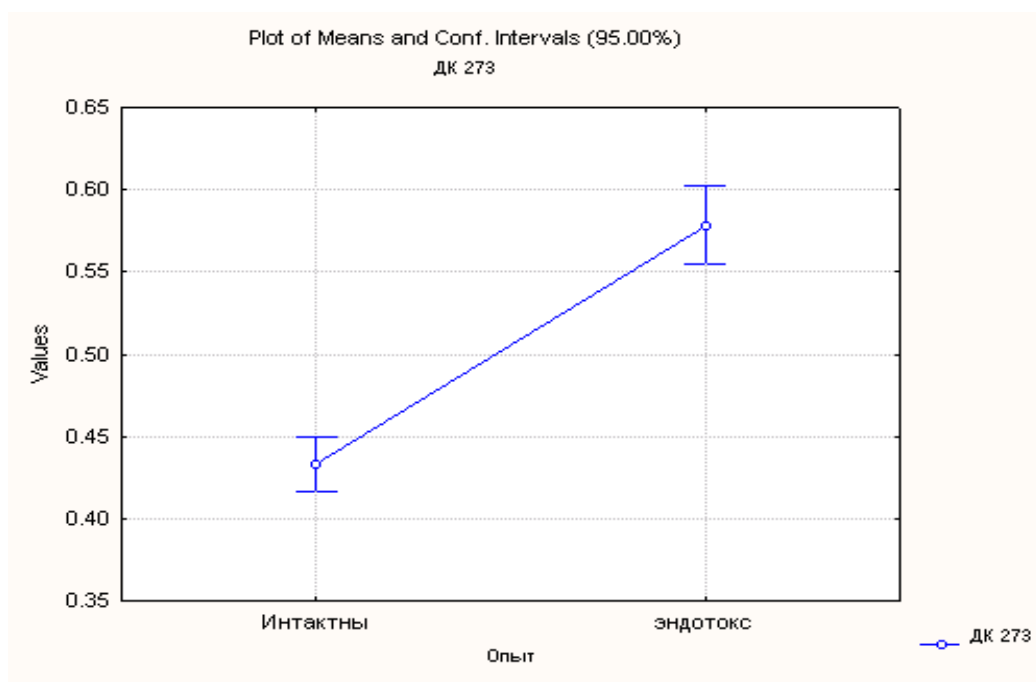
Рис. 4. Звездчатый ретикулоэндотелиоцит с признаками фагоцитарной активности. Серия 4. $\times 2500$.

Таким образом, поражение печени эндотоксином приводило к тяжелому повреждению печени, что проявлялось в виде гидropической дистрофии, альтеративных изменений ядер, повреждений эндоплазматической сети и митохон-

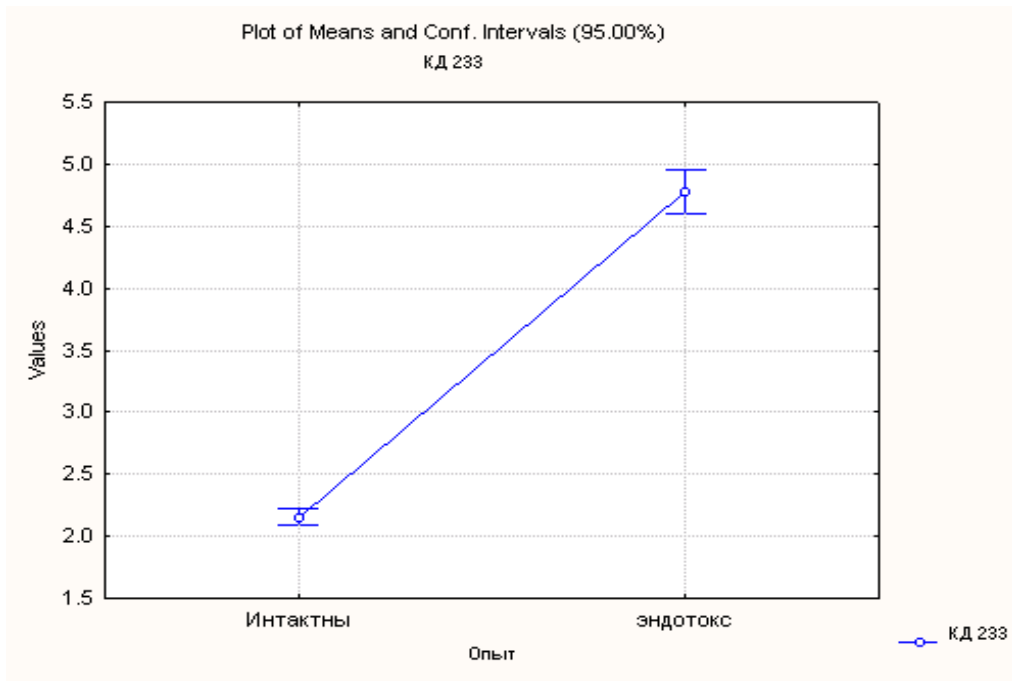
дрий.

Результаты проведенных биохимических исследований в экспериментах по моделированию поражения печени посредством эндотоксина

свидетельствовали о повышении уровня первичных продуктов липопероксидации (конъюгированных диенов и диенкетонов) (рис. 5а, б).



А



Б

Рис. 5. Содержание диенкетонов (а) и конъюгированных диенов (б) в сыворотке крови при поражении печени эндотоксином.

Под влиянием эндотоксина, содержание конъюгированных диенов и диенкетонов повышалось во второй группе по сравнению с интакт-

ными животными в 2,22 и 1,35 раза, соответственно. Уровень малонового диальдегида в сыворотке крови увеличивался в 1,25 раза по сравне-

нию с контрольной группой (рис.6).

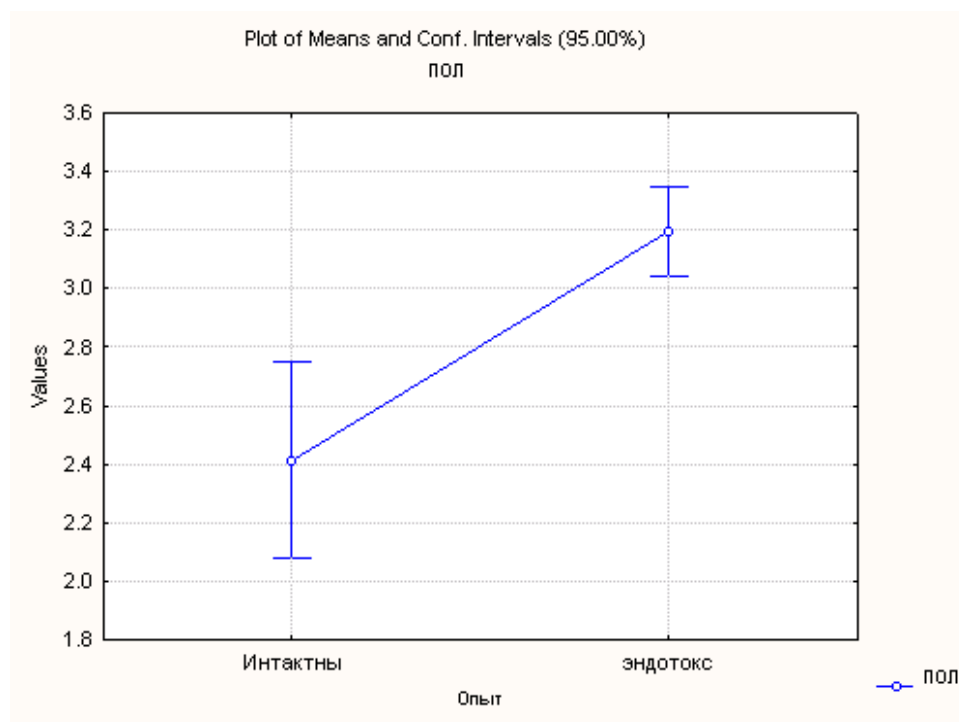


Рис. 6. Показатели накопления МДА в сыворотке крови крыс при поражении печени эндотоксином.

Интенсивно подвергались окислительной модификации не только липиды, но и белки. Установлено, что содержание карбонильных продуктов, образующихся при окислительной модификации белков под влиянием эндотоксина,

превышало в 4,55 соответствующий показатель в контрольной группе (рис. 7).

Показатели содержания пептидов средней массы во второй группе превышали норму в 1,69 раза (рис. 8).

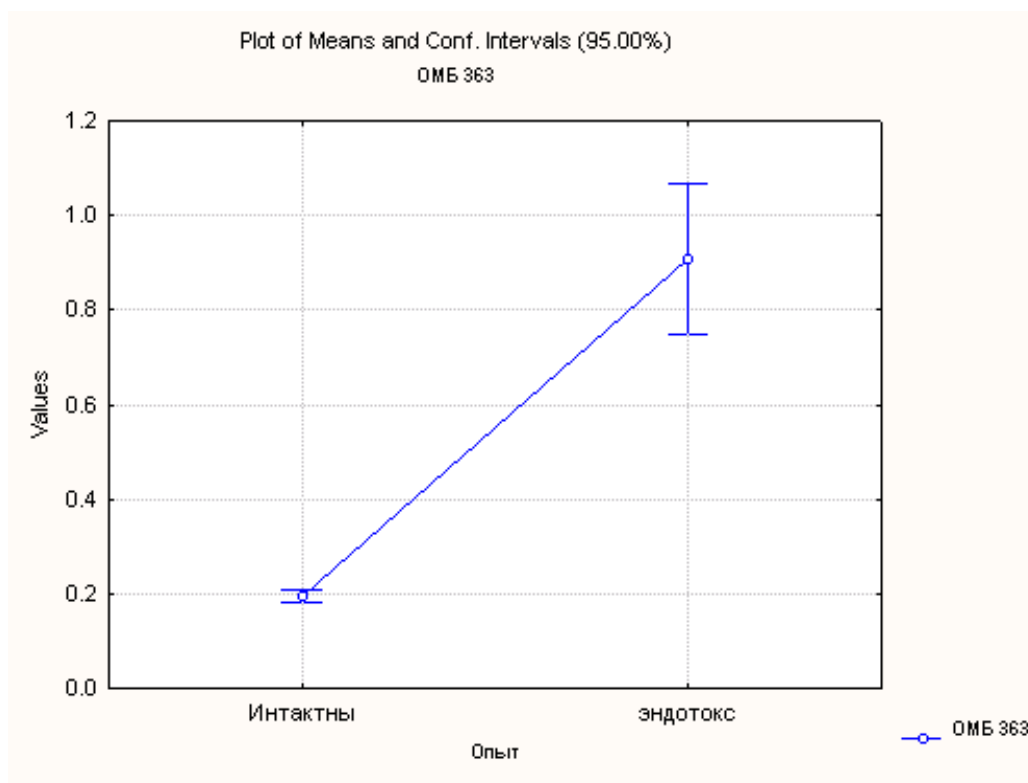


Рис. 7. Изменение уровня карбонильных соединений (ОМБ) при поражении печени эндотоксином.

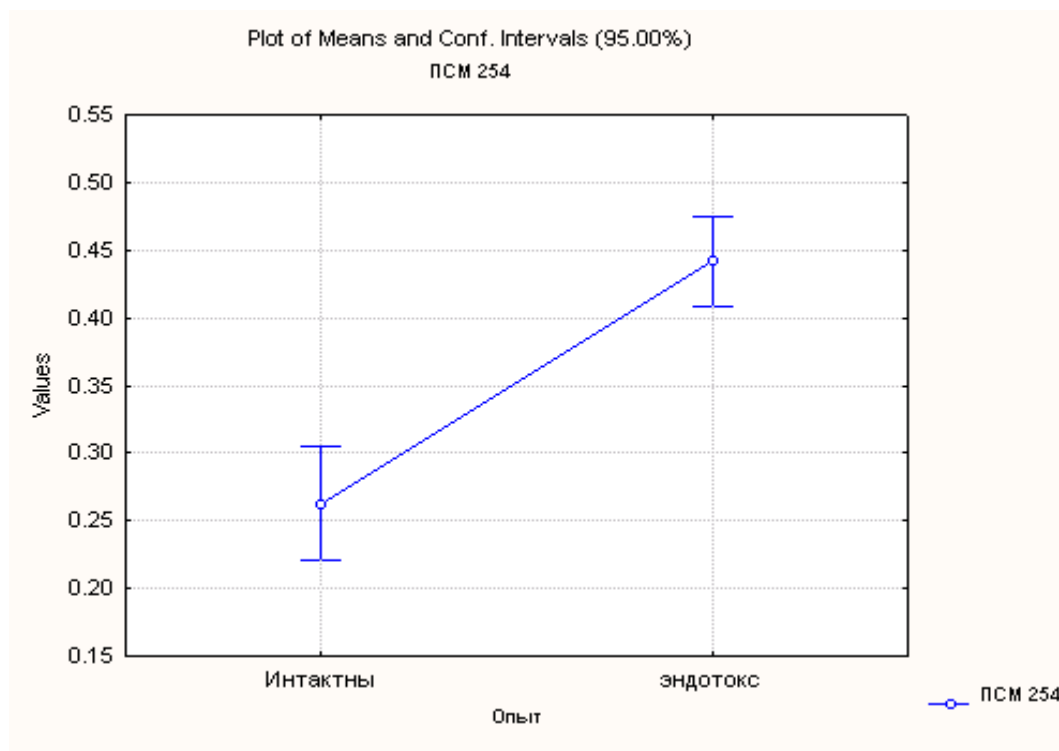


Рис. 8. Динамика изменения содержания пептидов средней массы (PCM) при поражении печени эндотоксином.

Выводы

1. Выраженность и глубина морфологических изменений в печени при эндотоксиновой интоксикации коррелировала с динамикой содержания продуктов окисления липидов (конъюгированные диены и диенкетоны, малоновый диальдегид) и белков. Отмечалась тенденция к более значительному возрастанию окислительной модификации белков в сыворотке крови. Это подтверждает данные о первичном повреждении белков под действием свободных радикалов.

2. При воздействии эндотоксина кишечной микрофлоры определялись выраженные дисциркуляторные изменения, жировая и гидропическая

дистрофия гепатоцитов с признаками токсического повреждения их ядер, но вместе с тем сохранялась повышенная гиперпластическая активность синусоидальных клеток, связанная с влиянием эндотоксина. Эти изменения связаны как с прямым токсическим действием эндотоксина, так и с последствиями окислительного стресса, мощным индуктором которого и является эндотоксин.

Перспективы дальнейших исследований

Весьма актуальной и перспективной задачей является поиск методов антиоксидантной коррекции при эндотоксиновом поражении печени.

Литературные источники

Аруин А. И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения / А. И. Аруин // *Клин. медицина*. – 2000. – № 1. – С. 5–10.

Бабанин А. А. Морфология поражения печени, вызванных алкоголем и эндотоксином кишечной микрофлоры в эксперименте / А. А. Бабанин, Е. Н. Нестеров, А. Н. Захарова // *Таврический медико-биологический вестник*. – 2003. – Т. 6, № 1. – С. 152–154.

Габриэлян Н. И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей / Н. И.

Габриэлян, В. И. Липатова // *Лаб. дело*. – 1984. – № 3. – С. 138–140.

Лабораторный контроль генетических особенностей воспаления и эффективности лечения при хроническом бронхите / А. М. Убайдуллаев, К. С. Казаков, Д. М. Мукимов [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1994. – № 3. – С. 24–28.

Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // *Вопр. мед. химии*. – 1995. – № 1. – С. 24–

26.

Пермяков Н. К. Эндотоксин кишечной микрофлоры и его роль в патологии печени / Н. К. Пермяков, М. Ю. Яковлев, В. Н. Галанкин // Архив патологии. – 1989. – Вып. 5. – С. 3–12.

Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И. Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 62–64.

Сынкова Н. В. Ультраструктурные изменения стенки тонкой кишки собаки при введении эндотоксина / Н. В. Сынкова, Л. М. Лихачева, Т. И. Гармаш // Тезисы докладов научно-практической конференции. – Ижевск. – 1995. – С. 176–177.

A role for interleukin-10 in alcohol-induced liver sensitization to bacterial lipopolysaccharide / D. B. Hill, N. B. D'Souza, E. Y. Lee [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2002. – № 26. – P. 74–82.

Fearns C. Role of tumor necrosis factor alpha in

induction of murine CD14 gene expression by lipopolysaccharide / C. Fearns, D.J. Loskutoff // Infect. Immun. – 1997. – Vol. 65. – P. 4822–4831.

Harris H. W. Hepatic endosomal trafficking of lipoprotein-bound endotoxin in rats / H. W. Harris, S. E. Brady, J. H. Rapp // J. Surg. Res. – 2002. – Vol. 106. – P. 188–195.

Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury / H. Jaeschke // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2000. – № 15. – P. 718–724.

Mihara M. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl4 intoxication, and vitamin E deficiency / M. Mihara, M. Uchiyama, K. Fukuzawa // Biochem. Med. – 1980. – Vol. 23. – P. 302–311.

Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin / H. Kono, H. Fujii, M. Asakawa [et al.] // Ann. Surg. – 2003. – Vol. 237, № 2. – P. 246–255.

Бабанін А.А., Захарова А.М., Семенова Т.В., Нестеров Є.Н., Каліберденко В.Б. Морфологічна оцінка вільнорадикальних процесів при ендотоксиновому ураженні печінки.

Резюме. Одна з важливих проблем сучасної медицини – ушкодження печінки при алкогольній хворобі. Було вивчено особливості морфологічних змін тканин печінки та рівень біохімічних маркерів окислювального стресу при ендотоксиновій інтоксикації в експерименті. Дослідження виконувалось шляхом створення моделі ендотоксинового ураження печінки у щурів. Досліди проводились на 40 нелінійних щурах, розділених на 2 групи по 20 тварин. Тваринам першої групи протягом 7-ми днів робили інтраперитонеальні ін'єкції препарату ендотоксину кишкової палички (фірми «Sigma» USA ДО-235) у розрахунку 0,1 мг/кг маси тіла. Тварини другої групи були контролем. Характер і ступінь ушкоджень печінки вивчався морфологічно, включаючи електронну та світлову мікроскопію. Для вивчення окисдантного стресу були застосовані біохімічні методи визначення кон'югованих дієнів і дієнкетонів, спонтанної окисної модифікації білків. Були отримані наступні результати: 1) виразність і глибина морфологічних змін у печінці при ендотоксиновій інтоксикації корелювала з динамікою вмісту продуктів окислення ліпідів (кон'юговані дієни та дієнкетони, малоновий діальдегід) і білків. Відзначалася тенденція до більш значного зростання окисної модифікації білків у сироватці крові. Це підтверджує дані про первинне ушкодження білків під дією вільних радикалів. 2) При впливі ендотоксину кишкової мікрофлори визначалися виражені дисциркуляторні зміни, жирова та гідропічна дистрофія гепатоцитів з ознаками токсичного ушкодження їхніх ядер, але разом з тим зберігалася підвищена функціональна активність синусоїдальних клітин. Ці зміни пов'язані як із прямою токсичною дією ендотоксину, так і з наслідками окисного стресу, потужним індуктором якого і є ендотоксин. Отриманні результати показують, що ендотоксин є чинником, що призводить до погіршення функціональних властивостей печінки.

Ключові слова: ендотоксин, печінка, окислювальна модифікація білків, перекісне окислювання ліпідів, пептиди середньої маси.