

**ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ 5-ОКСИ-6-МЕТИЛУРАЦИЛА С ЯНТАРНОЙ
КИСЛОТОЙ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ
ИНТОКСИКАЦИИ КАРБОФОСОМ**

Д.В. СРУБИЛИН*, Д.А. ЕНИКЕЕВ*, В.А. МЫШКИН**, Г.Р. АКБЕРДИНА*, А.М. ПОГОРЕЛОВ*

**Башкирский государственный медицинский университет, ул. Ленина, 3, Уфа, 450000, Россия,
e-mail: rectorat@bashgmu.ru*

***Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека Роспотребнадзора, ул. С. Кувykiна, 94,
Уфа, 450106, Россия, e-mail: fbun@uniimtech.ru*

Аннотация. Цель работы состояла в исследовании влияния низкоинтенсивного лазерного излучения и комплекса янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом, применяемых отдельно и комбинированно, на показатели перекисного окисления липидов, антиоксидантной системы, содержание ферментов окислительного метаболизма, выраженность цитолитического синдрома в печени крыс при хронической интоксикации карбофосом. Эксперименты проведены на крысах-самцах, у которых моделировали хроническую интоксикацию путем внутрижелудочного введения карбофоса в дозе 0,05 LD₅₀ в течение 60 суток. Использовали импульсное низкоинтенсивное лазерное излучение аппаратом АЛТ «Матрикс» на область проекции печени и хвостовой вены. Комплексное соединение ЯК с 5-окси-6-метилурацилом уменьшает образование супероксидного анион-радикала, обладает противогипоксической активностью. При хронической интоксикации карбофосом в печени крыс снижалось содержание сукцинатдегидрогеназы, НАДН-дегидрогеназы, АТФ-азы, а также активность супероксиддисмутазы, каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, содержание восстановленного глутатиона, накапливались диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид и основания Шиффа. Подавление биоэнергетических процессов, также как и снижение активности антиоксидантных ферментов в печени, предшествовало накоплению вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов, которые способствовали повреждению биологических мембран гепатоцитов и развитию синдрома цитолиза. Уровень уробилиназы в сыворотке крови к 60 суткам введения карбофоса увеличивался в 9,42 раз. Применение низкоинтенсивного лазерного излучения и комплексного соединения янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом при хронической интоксикации карбофосом оказывало гепатопротекторное действие, нормализуя нарушенное прооксидантно-антиоксидантное равновесие, улучшая окислительно-энергетический потенциал гепатоцитов и стабилизируя биологические мембраны. При применении комбинированной терапии, лечебный эффект отмечался раньше и в большей степени, чем их отдельное применение, что в целом способствовало поддержанию функциональной устойчивости гепатоцитов и повышало их адаптационные возможности при хронической интоксикации карбофосом.

Ключевые слова: карбофос, перекисное окисление липидов, лазерное излучение, янтарная кислота, крысы.

**EFFECTS OF COMPLEX COMPOUND OF 5-OXY-6-METHYLURACIL WITH SUCCINIC ACID
AND LOW INTENSIVE LASER RADIATION ON THE HEPATOCYTE FUNCTIONAL STATE IN
CHRONIC INTOXICATION WITH CARBOPHOSE**

D.V. SRUBILIN*, D.A. ENIKYEV*, V.A. MYSHKIN**, G.R. AKBERDINA*, A.M. POGORELOV*

**Bashkirian State Medical University, Lenin Str., 3, Ufa, 450000, Russia, e-mail: rectorat@bashgmu.ru*

***Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology, Stepan Kuvykin Str., 94, Ufa, 450106, Russia,
e-mail: fbun@uniimtech.ru*

Abstract. The research purpose was to study the influence of the low-intensive laser radiation (LILR) and succinic acid (SA) complex with 5-oxy-6-methyluracil, applied separately and combined, on indicators of lipid peroxidation, antioxidant system, the content of the enzymes of oxidative metabolism, marked cytologic syndrome in the liver of rats with chronic intoxication carbophose. The experiments were carried out on male rats, in which intoxication induced by intragastric administration of carbophose at a dose of 0,05 LD₅₀ during 60 days was held. Impulse low intensive laser radiation (LILR) was applied on the projected site of the liver and tail vein using the "Matrix" device. Complex compound of SA with 5-oxy-6-methyluracil reduces education superoxidic radical anion, possesses anti-hypoxemic activity. In chronic intoxication carbophose in rat's liver decreased content of succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, ATPase, and the activity of superoxide dismutase, cata-

lase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, restored glutathione content, accumulated deinic conjugates, malonic-dialdehyde and Schiff bases. Suppression bioenergetic processes, as well as lowering the activity of antioxidant enzymes in the liver, was preceded by the accumulation of secondary and final products of lipid peroxidation, which contributed to hepatocyte damage to biological membranes and development cytologic syndrome. Serum urokaninase to 60 days of administration of carbophose increased 9,42 times. Application of LILR and a succinic acid (SA) complex with 5-oxu-6-methyluracil in chronic intoxication carbophose has hepatoprotective effects, affecting impaired pro-oxidant-antioxidant balance, improving the oxidation-energy potential of hepatocytes and preserves the cellular membrane structure. The use of combination therapy has therapeutic effect. It was observed earlier and to a greater extent than their separate use that as a whole contributed to the maintenance of functional hepatocytes stability and increased their adaptive capacity in chronic intoxication carbophose.

Key words: carbophose, lipid peroxidation, laser radiation, succinic acid, rats.

Фосфорорганические соединения (ФОС), в том числе карбофос, являются одними из наиболее многочисленных классов пестицидов. Возрастающее накопление ФОС в различных объектах окружающей среды, в том числе в организме человека, ставят перед наукой необходимость изучения их влияния на здоровье людей. В больших дозах ФОС вызывают острые отравления, что проявляется поражением многочисленных органов и систем [5, 9, 19, 20]. В то же время в малых дозах ФОС влияют на метаболизм ксенобиотиков, оказывают эмбриотоксическое действие, а так же усиливают токсичность тяжелых металлов. Данный вид химической патологии при отсутствии явных клинических проявлений способен нанести существенный вред организму [7, 12]. С учетом вышеизложенного, исследования молекулярных механизмов при хронической интоксикации ФОС и карбофоса в частности, их роли в патогенезе интоксикации и разработка новых подходов к профилактике и лечению отравлений актуальны. Карбофос, легко проникая через кожу и биологические мембраны, накапливается в наиболее высоких концентрациях в печени, почках, легких, кишечнике и ЦНС. Различные превращения карбофоса в организме протекают по типу «летального синтеза», который осуществляется преимущественно в печени. Поэтому, особо важно исследовать влияние карбофоса, на функциональное состояние печени. В этой связи наибольшую опасность представляет пероральный путь поступления карбофоса, когда препарат быстро проникает в этот орган.

В настоящее время становится все более очевидным применение преформированных физических факторов, в том числе низкоинтенсивного лазерного излучения. В основе эффекта *низкоинтенсивного лазерного излучения* (НИЛИ) лежит комплексное неспецифическое действие на организм, когда местные изменения вызывают смену уровня функционирования биосистем за счет формирования защитно-адаптивной реакции [1-3, 11]. Многие аспекты, касающиеся механизмов действия лазерного излучения в инфракрасном спектре, на сегодняшний день остаются неясными. Поэтому мы сочли важным необходимость дальнейшей детализации эффектов действия лазерного излучения на некоторые звенья патогенеза при хронической интоксикации карбофосом для более обоснованного его применения. Патогенетический подход к терапии любого состояния, который изучает его молекулярные механизмы, является одним из наиболее перспективных в повышении эффективности лечения. Коррекция развивающихся нарушений при избыточной активации процессов свободно-радикального окисления и недостаточности антиоксидантной защиты с помощью препаратов, обладающих антиоксидантной и антигипоксической активностью, является наиболее универсальной. В этой связи заслуживает внимание новое соединение – комплекс *янтарной кислоты* (ЯК) с 5-гидрокси-6-метилурацилом, обладающее антигипоксической и антиоксидантной активностью, что было установлено нами ранее [15, 17-19]. Между тем в настоящее время остаются малоизученными некоторые патофизиологические вопросы функциональных расстройств печени при хронической интоксикации карбофосом в аспекте коррекции их препаратами, обладающими антиоксидантным и антигипоксическим действием с использованием сочетанного импульсного низкоинтенсивного лазерного излучения в инфракрасной и красной области спектра.

В связи с этим **целью нашего исследования** было изучение влияния отдельного и комбинированного применения низкоинтенсивного лазерного излучения и комплекса янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом на показатели перекисного окисления липидов, антиоксидантной системы, содержание ферментов окислительного метаболизма, выраженность цитолитического синдрома в печени крыс при хронической интоксикации карбофосом.

Материалы и методы исследования. Проведены эксперименты с использованием 66 белых половозрелых, неинбредных крыс-самцов массой 220-250 г. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.83 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.03 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных».

Животные были разделены на 5 группы: 1-я – контрольная, у крыс 2, 3, 4 и 5 групп моделировали интоксикацию карбофосом. Хроническая интоксикация карбофосом достигалась ежедневным энтеральным введением токсиканта в дозе 25 мг/кг (0,05 LD_{50}) в течение 60 суток. Животные третьей группы до-

полнительно получали курс сочетанного воздействия импульсного НИЛИ с длиной волны 0,63 и 0,89 мкм. Использовался аппарат АЛТ «Матрикс» с зеркальной насадкой для воздействия в области печени контактной методикой (0,89 мкм, импульсная мощность 7 Вт, частота 80 Гц, доза 0,01 Дж/см²) и акупунктурной насадкой для надвенозного облучения крови в области хвостовой вены (0,63 мкм, импульсная мощность 5 Вт, частота 80 Гц, доза 0,012 Дж/см²). Курс лазеротерапии начинали с 3-й недели и продолжали 12 дней. В четвертой группе дополнительно для фармакологической коррекции применяли комплексное соединение янтарной кислоты с 5-окси-6-метиурацилом, синтезированное по методике, разработанное в Институте органической химии УНЦ РАН д.х.н. В.П. Кривоноговым. Препарат вводили перорально в течение 12 суток в дозе 50 мг/кг, начиная с 15 дня эксперимента. В пятой экспериментальной группе животные получали комбинированную терапию, включающую лазерное излучение и исследуемое соединение. За 12 часов до умерщвления животных лишали пищи. Выводили животных из опыта путем декапитации. Для обезболивания использовали эфир для наркоза. Объектом исследования служила печень и сыворотка крови. Эксперименты выполнялись в зимний период времени. Забор биологического материала производился в утренние часы. Тестирование осуществляли на 7, 15, 30 и 60 сутки.

Состояние *перекисного окисления липидов* (ПОЛ) оценивали по концентрации диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и оснований Шиффа. Содержание *диеновых конъюгатов* (ДК) определяли методом прямой спектрофотометрии. Принцип метода заключается в выделении нативных жирных кислот путем экстракции смесью равных объемов гептана и изопропанола с последующим измерением оптической плотности проб гептановой фазы липидного экстракта. Поглощение при длине волны 232 нм отражает содержание диеновых конъюгатов [4]. Для определения *малонового диальдегида* (МДА) использовали метод *M. Mihara* (1980), заключающийся в образовании окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов с тиобарбитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). Продукты ПОЛ – межмолекулярные «сшивки» типа *основания Шиффа* (ОШ) в аминокислотах определяли спектрофлуориметрически [18].

Одновременно с процессами ПОЛ регистрировали активность ферментов антиоксидантной защиты: каталазы [8], супероксиддисмутазы [16]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы оценивали спектрофотометрически по восстановлению НАДФ при 340 нм [17]. Определяли содержание восстановленного глутатиона, учитывая его способность реагировать с избытком аллоксана с образованием соединения, имеющего максимум поглощения при длине волны 305 нм [13]. Степень повреждения печени оценивали по активности специфического фермента – сывороточной уроганиназы, которая встречается только в печени позвоночных и в норме, как в крови, так и в других органах не обнаруживается [10]. Для оценки метаболических процессов в печени исследовали содержание ферментов окислительного метаболизма: *сукцинатдегидрогеназы* (СДГ), *НАДН-дегидрогеназы* (НАДН-ДГ), АТФ-азы методами количественной гистохимии [6].

Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. После проверки нормальности распределения изучаемых параметров в сравниваемых группах тестом Шапиро-Уилка определяли средние величины (*M*), ошибку средних величин (*m*) при соответствии распределения признака закону нормального с расчетом сравнения групп показателей по критерию Стьюдента (*t*). Минимальный уровень статистической значимости различий верифицировали при $p < 0,05$. Математическую обработку выполняли на компьютере с применением стандартных пакетов программы *Statistica 6.0 (StatSoft)* и программного обеспечения *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение. Как следует из данных табл.1, при многократном введении карбофоса происходит накопление продуктов ПОЛ в ткани печени. Содержание диеновых конъюгатов гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, являющихся первичными молекулярными продуктами ПОЛ, у крыс первой группы постепенно возрастает, максимально увеличиваясь в 1,92 раза ($p < 0,001$) к 30 суткам введения карбофоса и несколько снижается относительно 30 суток на 60 сутки эксперимента. Максимальное накопление МДА наблюдается на 30 и 60 сутки эксперимента, увеличиваясь в 1,69 ($p < 0,001$) и 1,79 ($p < 0,001$) раза соответственно. Обращает внимание, что высокому содержанию МДА на 60 сутки соответствуют относительно сниженные показатели ДК, что находит свое отражение в коэффициенте МДА/ДК, равному $173,4 \pm 9,5$ ($p < 0,05$), по которому в определенной степени можно судить об общей направленности и интенсивности процессов свободно-радикального окисления и характеризовать функциональное состояние антиоксидантной системы. Данный показатель свидетельствует об интенсивном переходе первичных во вторичные и конечные продукты ПОЛ. Конечные продукты ПОЛ – основания Шиффа увеличивались в печени крыс лишь на 30-е и 60-е сутки опыта в 1,55 ($p < 0,001$) и 1,64 ($p < 0,001$) раза соответственно, оставаясь на 7-е и 15-е сутки в пределах показателей интактных животных. Увеличение количества первичных и вторичных продуктов ПОЛ в этом органе не совпадало.

Таблица 1

Влияние НИЛИ, комплекса ЯК с 5-окси-6-метилурацилом и их комбинированного применения на показатели перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты в печени крыс при хронической интоксикации карбофосом ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Группы животных (n=6 в группе)	Значение показателей на этапах исследования			
		7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки
ДК, ($\lambda=232$) усл.ед. на 1 гр. ткани	1-я группа	1,9±0,12	1,9±0,12	1,9±0,12	1,9±0,12
	2-я группа	2,17±0,11	2,41±0,16*	3,65±0,14**	2,93±0,16**
	3-я группа			3,05±0,18**^	2,30±0,13^
	4-я группа			2,90±0,14**^	2,38±0,14*^
	5-я группа			2,30±0,19^^	2,46±0,14*^
МДА, мкмоль на 1 гр. ткани	1-я группа	281,0±14,4	281,0±14,4	281,0±14,4	281,0±14,4
	2-я группа	301,0±12,28	327,2±8,45*	475,3±15,9**	502,0±12,0**
	3-я группа			366,0±14,5**^^	424,2±7,4**^^
	4-я группа			340,0±17,0**^^	368,0±13,9*^^
	5-я группа			315±13,0^^	337,2±9,2*^^
Шиффовы основания, усл.ед на мг липида	1-я группа	0,33±0,012	0,33±0,012	0,33±0,012	0,33±0,012
	2-я группа	0,34±0,02	0,36±0,02*	0,51±0,025**	0,54±0,015**
	3-я группа			0,43±0,032*	0,48±0,022**^
	4-я группа			0,42±0,019*^	0,46±0,018**^
	5-я группа			0,36±0,022^	0,41±0,018*^^
СОД, усл.ед. на 1 мг белка	1-я группа	41,1±1,6	41,1±1,6	41,1±1,6	41,1±1,6
	2-я группа	37,9±1,62*	32,1±1,24*	33,3±1,35*	27,1±2,24**
	3-я группа			39,5±2,07^	31,5±1,2**
	4-я группа			38,2±1,42^	36,3±1,39*^
	5-я группа			41,2±1,95^	38,6±1,09^^
Каталаза, мМоль в мин на 1 мг.белка	1-я группа	214,4±6,83	214,4±6,83	214,4±6,83	214,4±6,83
	2-я группа	197,48±6,83	148,45±6,36**	137,45±7,89**	118,25±6,36**
	3-я группа			165,4±7,07*^	144,7±9,56*^
	4-я группа			193,4±6,01*^^	171,5±4,7*^^
	5-я группа			201,63±7,1^^	189,4±10,08^^
Г6ФДГ, нМольв мин на мг белка	1-я группа	55,25±2,48	55,25±2,48	55,25±2,48	55,25±2,48
	2-я группа	51,47±1,54	40,43±3,82*	36,28±2,72**	30,07±2,36**
	3-я группа			44,37±2,14*^	38,40±2,98*
	4-я группа			46,3±2,84*^	37,47±2,32**^
	5-я группа			48,2±1,89*^	46,4±3,27*^
Восстановленный глутатион, мг %	1-я группа	149±4,45	149±4,45	149±4,45	149±4,45
	2-я группа	137±6,23	128±4,9*	115±5,8**	97±6,06**
	3-я группа			125±3,59*	106±4,3**
	4-я группа			122±4,57*	101±3,24**
	5-я группа			141±5,07^	136±5,42^
Коэффициент МДА/ДК	1-я группа	148,7±4,52	148,7±4,52	148,7±4,52	148,7±4,52
	2-я группа	140,2±6,7	139,3±10,9	131,9±9,3	173,4±9,5*
	3-я группа			135,4±6,4	187,7±12,1*
	4-я группа			126,3±5,1*	155,5±4,58
	5-я группа			140,4±6,9	143,25±5,1^

Примечание: * – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными; ** – различие достоверно ($p < 0,001$) по сравнению с интактными животными; ^ – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению со 2-й группой на определенные сутки эксперимента; ^^ – различие достоверно ($p < 0,001$) по сравнению со 2-й группой на определенные сутки эксперимента

Защита против реакционных радикальных метаболитов в клетке обеспечивается антиоксидантными ферментами, которые сводят к минимуму концентрацию супероксидного радикала, перекиси водорода и резко уменьшают образование наиболее токсичного радикала OH . Полнота антиоксидантной защиты обеспечивается совместным действием *супероксиддисмутазы* (СОД) и каталазы, так как при дисмутации супероксидного радикала образуется биологически активный интермедиант кислорода – перекись

водорода. Накопление продуктов ПОЛ при хронической интоксикации карбофосом сопровождается снижением активности ферментов антиоксидантной защиты. Максимальное снижение ферментативной активности в печени наблюдалось на 60-е сутки и достигало у каталазы 44,8 % ($p<0,001$); СОД – 34,1% ($p<0,001$) соответственно. Торможение активности СОД во многом зависит от избытка перекиси водорода, накапливающейся к 60 суткам, вследствие сохраняющегося дефекта каталазы и снижения активности глутатионового звена антиоксидантной защиты. В эти же сроки снижалась активность *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* (Г6ФДГ) на 45,6% ($p<0,001$) и содержание восстановленного глутатиона на 34,9% ($p<0,001$). Глутатион участвует как в индуцированной глутатионпероксидазной реакции, так и в поддержании восстановленного состояния сульфгидрильных групп белковых молекул, редокс-статуса аскорбата и клетки в целом. Соотношение окисленных и восстановленных форм глутатионовой системы зависит от скорости реакции пентозного цикла, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ. Выявленные изменения со стороны глутатиопосредованной детоксикации значительно снижает резистентность гепатоцитов к цитоповреждающему действию продуктов ПОЛ, свободных радикалов.

Результаты количественной гистохимической оценки метаболических процессов в печени представлены в табл. 2. По активности ферментов СДГ и НАДН-ДГ судили о влиянии многократного введения крысам карбофоса на энергообеспечение клеток. АТФ-аза является типичным трансмембранным ферментом, снижение активности которого, при действии карбофоса, может свидетельствовать о состоянии плазматических мембран гепатоцитов, в частности, о развивающейся дезорганизации структуры с нарушением функции мембраносвязанных белков. Установлено снижение активности СДГ и НАДН-ДГ у крыс получавших карбофос уже к 7-м суткам опыта, которое сохранялось на 30-е сутки и значительно снижалось на 60 сутки. Эти данные свидетельствуют о повреждении митохондрий и развитии гипозергоза гепатоцитов. Следовательно, поражение митохондрий развивалось уже к концу первой недели и сохранялось до 60-х суток эксперимента. Пониженная активность в эти сроки АТФ-азы у крыс, которым вводили карбофос, указывает так же и на повреждение плазматических мембран гепатоцитов.

Таблица 2

Влияние НИЛИ, комплекса ЯК с 5-окси-6-метилурацилом и их комбинированного применения на гистоэнзиматические показатели в печени и активность уроканиназы в сыворотке крови у крыс при хронической интоксикации карбофосом ($M\pm m$)

Исследуемый показатель	Группы животных ($n=6$ в группе)	Значение показателей на этапах исследования			
		7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки
СДГ, усл.ед	1-я группа	8,2±0,09	8,2±0,09	8,2±0,09	8,2±0,09
	2-я группа	7,38±0,15*	7,2±0,24*	7,13±0,17*	6,23±0,15*
	3-я группа			7,79±0,11*^	7,63±0,16*^
	4-я группа			7,38±0,14*	7,13±0,13*^
	5-я группа			8,2±0,12^	7,6±0,09*^
НАДН-ДГ, усл. ед	1-я группа	9,1±0,05	9,1±0,05	9,1±0,05	9,1±0,05
	2-я группа	8,02±0,06*	8,0±0,09*	7,9±0,12*	7,39±0,08*
	3-я группа			8,83±0,10^	8,2±0,14*^
	4-я группа			8,0±0,13*	7,2±0,13*
	5-я группа			9,05±0,08^	8,6±0,10*^
АТФ-аза, усл.ед	1-я группа	7,49±0,11	7,49±0,11	7,49±0,11	7,49±0,11
	2-я группа	6,03±0,09*	5,82±0,10*	5,6±0,12*	4,92±0,15*
	3-я группа			6,34±0,13*^	5,55±0,08*^
	4-я группа			6,49±0,14*^	5,57±0,11*^
	5-я группа			6,94±0,07*^	6,6±0,12*^
Уроканиназа, нмоль/с×л	1-я группа	0,69±0,05	0,69±0,05	0,69±0,05	0,69±0,05
	2-я группа	0,9±0,04*	1,4±0,06*	4,1±0,31*	6,5±0,26*
	3-я группа			3,2±0,25*^	3,8±0,32*^
	4-я группа			2,9±0,21*^	3,3±0,24*^
	5-я группа			1,5±0,24*^	2,1±0,32*^

Примечание: * – различие достоверно ($p<0,05$) по сравнению с интактными животными;
 ^ – различие достоверно ($p<0,05$) по сравнению со 2-й группой на определенные сутки эксперимента

Развивающийся окислительный стресс является одним из основных механизмов повреждения печени, что подтверждается ростом активности ее органоспецифического фермента – *уроканиназы*, с помощью которого можно обнаружить и выявить степень поражения печени. В норме, как в крови, так и в

других тканях, этот фермент практически не обнаруживается и увеличение активности *урокиназы* в 2,03 раза ($p < 0,05$) у крыс 2 группы начиная с 15 суток эксперимента, является ранним проявлением патологического процесса в печени. На 60 сутки хронической интоксикации карбофосом активность фермента увеличивается в 9,42 раза ($p < 0,05$), что свидетельствует о развитии выраженного синдрома цитолиза. Являясь органом с высокой энергетической потребностью и интенсивным окислительным метаболизмом, печень в условиях окислительного стресса подвержена значительным нарушениям [14].

Сопоставление уровня активности антиоксидантных ферментов с динамикой усиления процесса ПОЛ в печени, а также с показателями, характеризующими состояние мембран и метаболизма (биоэнергетики) при хронической интоксикации крыс карбофосом выявило их временную последовательность и характер повреждений. На 15-е, 30-е сутки установлено падение активности СОД, каталазы в печени. Отставание повышения содержания МДА и оснований Шиффа от времени снижения активности СОД и каталазы в этом органе, свидетельствует о вероятной вторичности ПОЛ. Практически одновременно с ослаблением антиоксидантной защиты, начиная с 7 суток, в ткани печени снижается активность СДГ, НАДН-ДГ и АТФ-азы. Анализ соотношения прооксидантов и антиоксидантов позволил заключить, что эндогенные антиоксидантные системы в печени угнетены к 3-й неделе и не способны скомпенсировать активацию свободно-радикального окисления. Поэтому вполне обоснованно в комплексную патогенетическую терапию включать препараты ограничивающие активацию оксидативного стресса и оказывающие корригирующее влияние на метаболические процессы. В этой связи с целью коррекции метаболических нарушений использовали комплексное соединение ЯК с 5-гидрокси-6-метилурацилом, которое обладает антиоксидантной и антигипоксической активностью, выявленной нами ранее [15].

Данное соединение, примененное в 3-й экспериментальной группе, ограничивало развитие окислительного стресса. В частности отмечалось статистически значимое уменьшение содержание продуктов ПОЛ в ткани печени в сравнении с животными 2 группы, повышалась активность каталазы, нормализовалась активность СОД. Однако на 60 сутки хронической интоксикации карбофосом на фоне снижения первичных продуктов ПОЛ соотношения МДА/ДК достоверно выше контроля, что свидетельствует об интенсивном переходе первичных продуктов ПОЛ в промежуточные. Комплексное соединение ЯК с 5-гидрокси-6-метилурацилом восстанавливало активность СДГ и НАДН-ДГ на 30-е сутки и сохраняло их активность на 60-е сутки эксперимента. Защитно-восстановительное действие исследуемого соединения на АТФ-азную активность четко проявилось на 30-е сутки опыта, что свидетельствует о мембрано стабилизирующем эффекте. Анализ применения данного соединения при хронической интоксикации карбофосом установил его нормализующее действие на биоэнергетические процессы в гепатоцитах, однако коррекция окислительного стресса была не полной, а также активность урокиназы на 60 сутки превышала контрольные показатели в 3,8 раза ($p < 0,05$).

Применение низкоинтенсивного лазерного излучения (надвентным доступом и на область проекции печени) у крыс 4-й экспериментальной группы при хронической интоксикации карбофосом благоприятно влияет на метаболизм и состояние антиоксидантной системы. На 30-е сутки эксперимента содержание продуктов ПОЛ снижалось, а активность СОД и каталазы приближались к показателям контрольных животных. Снижение величины соотношения МДА/ДК в 1,18 раза ($p < 0,05$), свидетельствует об адаптивном повышении функциональной мощности антиоксидантной системы, обуславливающей меньшую интенсивность превращения первичных в более токсичные промежуточные и конечные продукты ПОЛ. Влияние лазерного излучения на ферментативную активность подтверждают данные литературы о возможных механизмах НИЛИ активировать СОД, ингибированную в условиях кислых pH за счет фотоиндуцированного депротонирования и последующего восстановления структурной целостности активного центра фермента. Важную роль в абсорбции излучения играет гемсодержащий фермент каталаза, где происходит структурная перестройка, ведущая к активации фермента [3]. Важно отметить сохранение положительной динамики данных показателей и на 60 сутки хронической интоксикации карбофосом. Недостаточно выраженный эффект НИЛИ в данных условиях эксперимента выражается в сохраняющемся дефиците восстановленного глутатиона, повышенной активности урокиназы и недостаточной коррекции СДГ и НАДН-ДГ, что свидетельствует о неполной нормализации баланса про- и антиокислительной активности и энергообеспечения клеток, связанных, по-видимому, с отсутствием запаса эндогенных антиоксидантов.

При применении комбинированной терапии у животных 5-й группы отмечается наиболее мощный лечебный эффект. Снижение содержания продуктов ПОЛ в печени, повышение активности СОД, каталазы, ГбФДГ, а также содержания восстановленного глутатиона, нормализация соотношения МДА/ДК, выраженное снижение активности урокиназы, как на 30, так и на 60 сутки эксперимента свидетельствуют о коррекции окислительного стресса и синдрома цитолиза. Кроме того, совместное применение НИЛИ и комплексного соединения ЯК с 5-гидрокси-6-метилурацилом, нормализуя содержание СДГ, НАДН-ДГ, АТФазы, корректируют метаболические нарушения в печени при хронической интоксикации карбофосом. Положительная динамика содержания ферментов окислительного метаболизма сохраняется в течение всего времени введения карбофоса.

Выводы:

1. В патогенезе токсического действия карбофоса на печень важную роль играют перекисное окисление липидов и нарушение биоэнергетических процессов. В условиях хронической интоксикации, подавление биоэнергетических процессов, также как и снижение активности антиоксидантных ферментов в печени, предшествуют накоплению вторичных и конечных продуктов ПОЛ, которые являются одним из основных механизмов повреждения биологических мембран гепатоцитов.

2. Применение НИЛИ и комплексного соединения ЯК с 5-окси-6-метилурацилом при хронической интоксикации карбофосом оказывает гепатопротекторное действие, нормализуя нарушенное прооксидантно-антиоксидантное равновесие, улучшая окислительно-энергетический потенциал гепатоцитов и стабилизируя биологические мембраны. При применении комбинированной терапии, лечебный эффект отмечается раньше и в большей степени, чем их раздельное применение, что в целом способствует поддержанию функциональной устойчивости гепатоцитов и повышает их адаптационные возможности при хронической интоксикации карбофосом.

3. Положительная динамика данных показателей сохраняется в течение всего времени введения карбофоса.

Литература

1. Алешина М.Ф., Васильев Л.В., Гончарова И.А., Никитин В.А. Низкоинтенсивное лазерное излучение в терапии социально значимых заболеваний внутренних органов // Вестник новых медицинских технологий. 2010. Т.17, №2. С. 90–91.
2. Бурдуин Н.М., Кехоева А.Ю. Влияние лазерного излучения на микроциркуляцию, агрегацию тромбоцитов и эритроцитов крови больных ишемической болезнью сердца с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа // Вестник новых медицинских технологий. 2010. Т.17, №3. С. 29–30.
3. Владимиров Ю.А. Три гипотезы о механизме действия лазерного излучения на клетки и организм человека. В сб. Эфферентная медицина. М.: ИБМХ РАМН, 1994. С. 51–67.
4. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы медицинской химии. 1989. № 1. С. 127–130.
5. Воронко Е.А. Острые отравления фосфоорганическими веществами // Медицина. 2004. № 4. С. 26–29.
6. Журавлева Т.Б., Прочуханов Р.А. Введение в количественную гистохимию ферментов. М.: Медицина, 1978. 248 с.
7. Карабалин С.К. Клинико–морфологическая характеристика и дифференциальная диагностика профессиональных поражений печени у рабочих фосфорного производства // Медицина труда и промышленная экология. 2005. № 4. С. 15–21.
8. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–18.
9. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления: Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. М.: Медицина, 2000. 434 с.
10. Мардашев С.Р., Буробин В.А. Обнаружение уроганиназы в крови при отравлении четыреххлористым углеродом // Вопросы медицинской химии. 1963. Т. 9, Вып.1. С. 93–94.
11. Москвин С.В. Эффективность лазерной терапии. М., 2014. 896 с.
12. Протасова Г.А., Попов В.Б., Шабашева Л.В. Радилов А.С. Оценка влияния водных экстрактов битумно-солевых масс, содержащих продукты детоксикации зарина, зомана и Vx на развитие до- и постимплантационных зародышей мыши и крысы. Мат. Российской науч. конф. «Медицинские аспекты радиационной и химической безопасности». СПб., 2001. С. 286–287.
13. Путилина Е.Ф. Определение восстановленного глутатиона в тканях. В сб.: Методы биохимических исследований. Л.: Медицина, 1982. С. 183–186.
14. Рууге Э.К. Митохондриальные болезни: современные концепции. В сб.: Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека. Смоленск, 2005. С. 150–151.
15. Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А. Антирадикальная и антиоксидантная активность комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой и его эффективность при гипоксических состояниях // Фундаментальные исследования. 2011. №6. С. 166–170.
16. Чевари С., Чаба Н., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. №11. С. 678–680.
17. Хадарцев А.А., Зилов В.Г., Еськов В.М., Винокуров Б.Л., Морозов В.Н., Кидалов В.Н., Филатова О.Е., Гонтарев С.Н., Хадарцева К.А., Цогоев А.С., Наумова Э.М., Крюкова С.В., Митрофанов И.В., Валентинов Б.Г., Седова О.А. Восстановительная медицина: Монография / Под ред. Хадарцева А.А.,

Гонтарева С.Н., Еськова В.М.. Тула: Изд-во ТулГУ – Белгород: ЗАО «Белгородская областная типография», 2010. Т. 1. 298 с.

18. Хадарцев А.А., Рязанова Е.А. Системные эффекты лазерофореза гиалуроновой и янтарной кислот в сочетании с электромиостимуляцией в дерматокосметологии // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2006. Т. 5, № 4. С. 912–915.

19. Хадарцев А.А., Рязанова Е.А. Лазерофорез гиалуроновой и янтарной кислот в сочетании с электромиостимуляцией в практике дерматолога и косметолога // Вестник новых медицинских технологий. 2006. № 4. С. 79–80.

20. Glock, G., McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver // Biochem. 1953. Vol. 55, № 3. P. 400–408.

21. Fletcher B.L., Dillard C.J., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues // Analyt. Biochem. 1973. Vol. 2. P. 1–9.

22. Sharp D. Long-term effects of sarin // Lancet. 2006. Vol. 14, № 367. P. 95–97.

23. Shin T.M., Kan R.K., McDonough J.H. In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents // Chem. Biol. Interact. 2005. Vol. 157–158. P. 293–303.

References

1. Aleshina MF, Vasil'ev LV, Goncharova IA, Nikitin VA. Nizkointensivnoe lazernoe izluchenie v terapii sotsial'no znachimykh zabolevaniy vnutrennikh organov [Low-intensity laser radiation in the treatment of socially significant diseases of internal organs]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2010;17(2):90-1. Russian.

2. Burduin NM, Kekhoeva AY. Vliyanie lazernogo izlucheniya na mikrotsirkulyatsiyu, agregatsiyu trombocitov i eritrotsitov krovi bol'nykh ishemicheskoy bolezn'yu serdtsa s soputstvuyushchim sakharnym diabetom 2 tipa [Effect of laser radiation on the microcirculation, the aggregation of platelets and red blood cells in patients with ischemic heart disease with concomitant type 2 diabetes]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2010;17(3):29-30. Russian.

3. Vladimirov YA. Tri gipotezy o mekhanizme deystviya lazernogo izlucheniya na kletki i organizm cheloveka [Three hypotheses about the mechanism of action of laser radiation on cells and the human body]. V sb. Efferentnaya meditsina. Moscow: IBMKh RAMN; 1994. Russian.

4. Volchegorskiy IA, Nalimov AG, Yarovinskiy BG, Lifshits RI. Sopostavlenie razlichnykh podkhodov k opredeleniyu produktov perekisnogo okisleniya lipidov v heptan-izopropanol'nykh ekstraktakh krovi [A comparison of different approaches to the definition of lipid peroxidation in heptane-isopropanol extracts blood products]. Voprosy meditsinskoy khimii. 1989;1:127-30. Russian.

5. Voronko EA. Ostrye otravleniya fosfoorganicheskimi veshchestvami [Acute poisoning by organophosphorus compounds]. Meditsina. 2004;4:26-9. Russian.

6. Zhuravleva TB, Prochukhanov RA. Vvedenie v kolichestvennyuyu gistokhimiyyu fermentov [Introduction to quantitative enzyme cytochemistry]. Moscow: Meditsina; 1978. Russian.

7. Karabalin SK. Kliniko–morfologicheskaya kharakteristika i differentsial'naya diagnostika professional'nykh porazheniy pecheni u rabochikh fosfornogo proizvodstva [Clinical and morphological characteristics and differential diagnosis of liver lesions in professionally working phosphorus production]. Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya. 2005;4:15-21. Russian.

8. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy [The method for determining the activity of catalase]. Laboratornoe delo. 1988;1:16-8. Russian.

9. Luzhnikov EA, Kostomarov LG. Ostrye otravleniya: Rukovodstvo dlya vrachey [Acute poisoning: A Guide for Physicians]. 2-e izd., pererab i dop. Moscow: Meditsina; 2000. Russian.

10. Mardashev SR, Burobin VA. Obnaruzhenie urokaninazy v krovi pri otravlenii chetyrekhkhlorigim uglerodom [Detection of blood urokaninase for poisoning by carbon tetrachloride]. Voprosy meditsinskoy khimii. 1963;9(1):93-4. Russian.

11. Moskvina SV. Effektivnost' lazernoy terapii [The effectiveness of laser therapy]. Moscow; 2014. Russian.

12. Protasova GA, Popov VB, Shabashova JIB, Radilov AC. Otsenka vliyaniya vodnykh ekstraktov bitumno-solevykh mass, sodershashchikh produkty detoksikatsii zarina, zomana i Vx na razvitiye do- i postimplantatsionnykh zarodyshey myshi i krysy [Assessing the impact of water extracts bitumen-salt mass, containing sarin detoxification products, soman and Vx for the development of pre- and post-implantation embryos of mice and rats.]. Mat. Rossiyskoy nauch. konf. «Meditsinskie aspekty radiatsionnoy i khimicheskoy bezopasnosti». Sankt-Peterburg; 2001. Russian.

13. Putilina EF. Opredelenie vosstanovlennogo glutationa v tkanyakh. V sb.: Metody biokhimicheskikh issledovaniy [Determination of glutathione in the tissue. In Sat. : Methods of biochemical research.]. Leningrad: Meditsina; 1982. Russian.

14. Ruuge EK. Mitochondrial'nye bolezni: sovremennye kontseptsii [Mitochondrial disease: current concepts]. V sb.: Aktivnye formy kisloroda, oksid azota, antioksidanty i zdorov'e cheloveka. Smolensk; 2005. Russian.

15. Srubilin DV, Enikeev DA, Myshkin VA. Antiradikal'naya i antioksidantnaya aktivnost' kompleksnogo soedineniya 5-oksi-6-metiluratsila s yantarnoy kislotoy i ego effektivnost' pri gipoksicheskikh sostoyaniyakh [Antiradical and antioxidant activity of the complex compound of 5-hydroxy-6-methyluracil with succinic acid and its efficacy in hypoxic conditions]. Fundamental'nye issledovaniya. 2011;6:166-70. Russian.

16. Chevri S, Chaba N, Sekey Y. Rol' superoksiddismutazy v okislitel'nykh protsessakh kletki i metod opredeleniya ee v biologicheskikh materialakh [The role of superoxide dismutase in cell oxidation processes and the method of its determination in biological material]. Laboratornoe delo. 1985;11:678-80. Russian.

17. Khadartsev AA, Zilov VG, Es'kov VM, Vinokurov BL, Morozov VN, Kidalov VN, Filatova OE, Gontarev SN, Khadartseva KA, Tsogoev AS, Naumova EM, Kryukova SV, Mitrofanov IV, Valentinov BG, Sedova OA. Vosstanovitel'naya meditsina: Monografiya [Regenerative medicine: Monograph]. Pod red. Khadartseva AA, Gontareva SN, Es'kova VM. Tula: Izd-vo TulGU – Belgorod: ZAO «Belgorodskaya oblastnaya tipografiya»; 2010. T.1. Russian.

18. Khadartsev AA, Ryazanova EA. Sistemnye efekty lazeroforeza gialuronovoy i yantarnoy kislot v sochetanii s elektromiostimulyatsiyey v dermatokosmetologii [Systemic effects of hyaluronic laser phoresis and succinic acids in combination with electromyostimulation in dermatology]. Sistemnyy analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh. 2006;5(4):912-5. Russian.

19. Khadartsev AA, Ryazanova EA. Lazerofores gialuronovoy i yantarnoy kislot v sochetanii s elektromiostimulyatsiyey v praktike dermatologa i kosmetologa [Laser phoresis hyaluronic acid and succinic electromyostimulation in conjunction with the practice of dermatology and cosmetology]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2006;4:79-80. Russian.

20. Glock G, McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem. 1953;55(3):400-8.

21. Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. Analyt. Biochem. 1973;2:1-9.

22. Sharp D. Long-term effects of sarin. Lancet. 2006;14(367):95-7.

23. Shin TM, Kan RK, McDonough JH. In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents. Chem. Biol. Interact. 2005;157-8:293-303.

Библиографическая ссылка:

Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А., Акбердина Г.Р., Погорелов А.М. Влияние комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой и низкоинтенсивного лазерного излучения на функциональное состояние гепатоцитов при хронической интоксикации карбофосом // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №4. Публикация 2-9. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-4/2-9.pdf> (дата обращения: 31.10.2016). DOI: 10.12737/22629.