

УДК: 616-36.36.001-07:577.15

**ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ОЦЕНКЕ
ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ**

Аскарров Т.А., Ахмедов М.Д., Файзиев Е.Н., Ашурметов А.М., Долимов К.С., Агзамова М.Н.,
Усаров А.М., Зупаров К.Ф.

Ташкентский педиатрический медицинский институт

✓ **Резюме,**

На лабораторных животных с различными моделями гепатоцеллюлярных повреждений (затравка четыреххлористым углеродом - CCL₄, DL-галактозамином, механическая желтуха, ишемия) разработан тест количественной оценки состояния паренхимы печени путем полярографических исследований. Тест основан на определении коэффициента получаемого в результате изучения в гомогенате ткани органа активности цитохромоксидазы в присутствии двух субстратов: цитохрома С и ТМДФ (тетраметилпарафенилендиамина).

Ключевые слова: значение определения активности митохондриальных ферментов, оценка гепатоцеллюлярных повреждений, лабораторные животные,

**ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯР ЖАРОҲАТЛАРНИ БАҲОЛАШ УЧУН МИТОХОНДРИАЛ ФЕРМЕНТЛАР
ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ**

Аскарров Т.А., Ахмедов М.Д., Файзиев Е.Н., Ашурметов А.М., Долимов К.С., Агзамова М.Н.,
Усаров А.М., Зупаров К.Ф.

Тошкент педиатрия тиббиёт институти

✓ **Резюме,**

Ҳар хил гепатоцеллюляр жароҳатланган (CCL₄ - тўртхлорли углерод, DL - галактозамин, механик сариклик, ишемия) экспериментал лабаратор каламушларда жигар паренхимаси полярографик муқдорий ўлчов тестлар билан текширувдан ўтказилди.

Тестлар асосида текширилаётган тўқиманинг гомогенатидаги цитохромоксидазалар фаоллиги белгиси: цитохром С ва ТМДФ(тетраметилпарафенилендиамина) активлиги муқдори аниқлаш оққали ўтказилди.

Ключевые слова: Гепатоцеллюляр жароҳатларни баҳолаш, митохондриал ферментлар фаоллигини аниқлаш, лабаратор ҳайвонлар.

THE MITOCHONDRIAL ENZYME ACTIVITY IN THE EVALUATION OF HEPATOCELLULAR INJURIES

Askarov, T. A., Akhmedov, M. D., Fayziev, Y. N., Ashurmetov, A. M., Dalimov K.S., Agzamova M.N.,
Usarov A., Zufarov K.

Tashkent Medical Pediatric Institute.

✓ **Resume,**

The test of quantitative evaluation of the state of liver parenchyma has been developed on the basis of different models of hepatocellular injuries induced by effect of CCL₄, DL-galactosamine, mechanical jaundice, ischemia in the laboratory animals. The test was based on determination of the coefficient obtained due to studying of the activity of cytochromoxidase during the, presense of two substrates cytochrome C and TMD in the organ tissue homogenate.

Key words: the mitochondrial enzyme activity, evaluation of hepatocellular injuries.

Актуальность

При диагностике степени гепатоцеллюлярных повреждений при острых и хронических заболеваниях печени использование методики позволяющей определить количество сохранных и функционально-способных клеток паренхимы печени является актуальной [1,2,3,6,8,9]. Так как, дает возможность объективно оценить состояние печёночной паренхимы в каждом конкретном случае, обоснованно подходить к выбору метода лечения и объёма хирургического вмешательства, его патогенетической обоснованности и адекватного контроля течения послеоперационного течения [4, 10].

Материал и методы

Для создания экспериментальной модели гепатоцеллюлярной недостаточности эксперименты были проведены на 124 крысах-самцах линии Вистар. Проведено 5 серий экспериментов:

11. Контрольная группа.
12. После затравки в дозе 150 мг/100 гр массы внутривенным введением DL-галактозамина.
13. После затравки внутривенным введением 0,25 мл/100 гр массы CCL₄.
14. Модель механической желтухи после перевязки общего желчного протока.
15. Нормотермической ишемии.

Введение галактозамина приводит к развитию острой печёночной недостаточности, уже через 24-48 часов со 100% гибелью животных через 56 часов. В отличие от него при введении CCL4 указанные изменения наблюдались в более ранние сроки (через 12-24 часа) после затравки. Через 12-18-24 и 48 часов после введения галактозамина, 12 и 24 часа – CCL4; через 30, 60 и 120 минут нормотермической ишемии; 7, 14 и 21 сутки после обтурации – животных забивали декапитацией в холодной комнате. Быстро извлекали печень, промывали и готовили гомогенат в среде, состоящей из 0,25 сахарозы, 2x10⁻⁴ М ЭДТА(этилендиаминтетрауксусная кислота); 0,01 М трис-HCL буфера с pH 7,4 в соотношении ткани и среды 1:2. Полярнографический анализ проводили со стандартным платиновым электродом Кларка закрытого типа на полярографе LP-7 [7].

В полярнографическую кювету объемом 1,1 мл. поочередно вносили гомогенат из расчёта 1-2 мг. белка, аскорбат натрия в конечной концентрации 2мМ, ТМДФ (тетраметиленапарафенилендиамин)-1 мкМ и цитохром-С-1 мкМ. Скорость дыхания выражали в нмоль O₂/минут. мг белка. Высчитывали прогностический коэффициент (ПК) по формуле:

ПК = Цитохром С- Аскорбат Na / ТМДФ - Аскорбат Na

Цифровой материал обработан методом вариационной статистики.

Результат и обсуждение

Через 12 часов после затравки галактозамином, полярнографические исследования показали (табл. 1), скорость аскорбат-зависимого потребления O₂ возросла на 62,8% (P<0,05), в дальнейшем этот показатель постепенно снижается и к концу эксперимента это увеличение составляет лишь 23,8%. В отличие от неё ТМДФ-оксидазная активность гомогената печени постепенно снижается (на 24,5% через 48 часов затравки). Цитохром-С оксидазная активность повышена статистически значимо на 30-50% во все сроки исследования. У крыс, получавших CCL4, нами выявлена такая же динамика изменений скорости потребления O₂ в различных метаболических состояниях. Отличительной особенностью данной модели от галактозаминового, была резкая активация цитохром С-оксидазы (превышение на 162,4 и 136,2 % значений интактных крыс через 12 и 24 часа от затравки). Модель нормотермической ишемии не оказывала существенного влияния на аскорбат - зависимое потребление O₂ гомогенатами печени. ТМДФ-оксидазная активность постепенно ингибировалась, тогда как цитохром-С-оксидазная - постепенно возрастала, превышая к 120-й минуте ишемии исходные параметры достоверно на 78,1%. Создание модели обтурационной желтухи способствовало повышению аскорбат-зависимого потребления O₂ на 98,1; 259 и 118,1% через 7, 14 и 21 сутки, соответственно от начала опыта. В отличие от вышеперечисленных моделей при данной модели, мы не наблюдали ингибирования ТМДФ-оксидазной активности. Значения ее во все сроки исследования достоверно превышали нормативные параметры на 39; 137,5 и 60,5%, соответственно. Отмечена резкая активация цитохром-С-оксидазной активности, значения которой возрастали на 215; 243 и 164,5%, соответственно срокам.

Следовательно, различные модели некроза печени, существенно изменяют скорость потребления O₂ гомогенатами печени. Более выражено это проявляется на модели обтурационной желтухи. Наблюдаемое ингибирование ТМДФ-оксидазной активности гомогенатов печени при химическом и ишемическом повреждениях, на наш взгляд, связаны резким нарушением терминального участка дыхательной цепи, так как согласно данным литературы [8] отмечается солиubilизация цитохрома С, локализованного на внешней стороне, внутренней мембраны митохондрий, что ограничивает перенос электронов на терминальный участок дыхательной цепи. Подтверждением нашего предложения является активация скорости потребления O₂ при добавлении экзогенного цитохрома С. Следует сказать, что выявленные некоторые отличительные особенности использованных нами моделей связаны с различной точкой приложения их.

При использованных нами моделях отмечается различная летальность. Так наиболее высокая летальность выявлена при использовании галактозаминовой модели поражения печени, что в определенной степени не совпадает с данными полярнографии. Для выяснения прогностического значения митохондриальных ферментов в оценке степени гепатоцеллюлярных повреждений нами был разработан прогностический коэффициент. Выбор данной формулы был обусловлен локализацией использованных нами ферментных систем дыхательной цепи митохондрий.

Анализ данного коэффициента у животных, затравленных галактозамином, показал резкое её увеличение до 5,00±0,05; 6,94±0,005; 9,70±0,10; 13,20±0,10 – через 12, 18, 24 и 48 часов после затравки, при значении этого показателя интактных крыс 1,90±0,05. Причём, значения его совпадали с летальностью в эти сроки исследования. Данный коэффициент при CCL4 поражении печени достигал 7,20±0,005 и 10,90±0,04 (через 12, 24 часа после затравки), а затем снижался до 7,90±0,005, но всё ещё превышал нормативные параметры. Причём, наибольшая летальность в данной группе проявлялась через 24 часа, а в дальнейшем отмечено снижение летальности.

Следовательно, предлагаемый нами коэффициент отражает степень повреждения гепатоцитов и совпадает с летальностью экспериментальных животных. Подтверждением этому является прогрессивное повышение ПК по мере длительности ишемии. В отличие от них значения ПК при обтурации общего желчного протока отмечены на 7 сутки (повышение до 9,80±0,0530)5 а затем постепенное его уменьшение, что совпадало с наибольшей летальностью в эти сроки. На наш взгляд, снижение летальности в более поздние сроки связано с реканализацией общего желчного протока [5].

Выводы:

1. У крыс с химическим и ишемическим поражением печени наблюдается снижение ТМДФ-оксидазной активности гепатоцитов, вследствие солиubilизации цитохрома С, так как добавление экзогенного цитохрома С существенно активизирует перенос электронов по дыхательной цепи.

2. В отличие от них, на модели механической желтухи активизируются, аскорбатзависимое потребление

ние O₂, ТМФД- и цитохром С-оксидазные активности гепатоцитов.

3. ПК характеризует степень повреждения печени и совпадает с летальностью. Если при галактозамино-вом и ишемическом поражениях печени он прогрес-

сивно возрастает, то при CCL₄ и обтурационной мо-дели он вначале резко возрастает и постепенно сни-жается в дальнейшем, что совпадает с летальностью животных в этих группах.

Таблица 1.

Скорость потребления кислорода (в нмоль O₂ мин⁻¹ мг⁻¹) печени экспериментальных животных в различных метаболических состояниях

Период исследования	Аскорбат зависимая	ТМФД-оксидазная	Цитохром С-оксидазная
Контрольная	10,50±0,15	20,00±1,50	27,90±3,00
ДЛ-галактозамин, через (час):12	17,10±0,98*	21,90±1,10	41,80±3,50*
18	13,10±0,60*	17,00±0,60	40,01±1,16*
24	13,50±0,60*	15,90±0,60*	36,82±0,60*
48	13,00±0,40*	15,10±0,80*	39,01±4,43*
CCL ₄ , через 12 час	13,73±0,37*	21,90±0,41	73,20±3,03*
24	11,82±0,41	14,85±0,44	65,90±2,02*
Ишемии, через (мин.):30	10,54±0,26	16,50±0,45*	28,60±0,86
60	12,01±0,80	15,72±0,91*	33,82±2,61
120	11,24±0,36	15,93±0,90*	49,72±6,32*
Обтурация, через (сутки) 7	20,81±0,80*	27,82±0,90*	87,93±2,50*
14	87,93±2,50*	7,53±0,81*	95,71±0,61*
21	37,72±0,91*	32,11±1,13*	73,85±4,52*

Примечание :* - различия между показателями контрольной и опытной групп достоверны (P<0,05)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Дунаевский О.А. Дифференциальная диагностика заболеваний печени.- /М., Медицина; 1985; 262.
2. Подымова С.Д. Болезни печени: Рук. для врачей. - /М. Медицина; 1998; 704.
3. Масевич ЦТ, Ермолаева Л.Г. Клинические, биохимические, морфологические особенности хронических гепатитов различной этиологии //Терапевтический архив. 2002; 2: 35-37.
4. Наврузбеков М.С. Оценка функциональных резервов печени и методы прогнозированного печеночной недостаточности при операциях на печени /Автореферат диссертации на соискание кандидата медицинских наук М.Медицина; 2009; 34.
5. Сахипов С.Ж. Нарушение функционального состояния и микроциркуляции печени при механической желтухе. /Дисс.к.м.н.-М.,1983; 162.
6. Титов В.Н. Биохимические методы диагностики патологии печени. //Терапевтический архив. 1993; 2: 85-89.
7. Трушанов А.А. Изготовление в лабораторных условиях закрытого полярографического электрода Кларка. /В кн. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М. Наука; 1973; 78-79.
8. Хазанов А.И. Функциональная диагностика болезней печени., - /М., Медицина,1988; 302.
9. Ozawa Kazue/ Adaptive response of the liver mitochondrial and its relation to hepatic functional reserve. Evaluation by cytochrome a (+ a 3) assay and glucosae intolerance //"Asian Med J", 1980; 23(7): 499-528.
10. Buechter, H., Zepp, R., & Gomer, G. (1990). The use of segmental anatomy for an operative classification of Liver injuries. //Ann. Sur., 1990; 211(6): 669-675.

Поступила 14.05. 2019