

## РАННИЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК И ПЕЧЕНИ ПРИ РАЗОБЩЕНИИ ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Роговый Ю.Е.<sup>1</sup>, Белявский В.В.<sup>1</sup>, Филипова Л.О.<sup>1</sup>, Дорошко В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Буковинский государственный медицинский университет, г.Черновцы, Украина (58002, г.Черновцы, Театральна пл., 2, ), e-mail: [pathophysiology@bsmu.edu.ua](mailto:pathophysiology@bsmu.edu.ua)

В опытах на 120 белых нелинейных крысах-самцах массой 0,16-0,20 кг при гипонатриевом режиме питания в условиях моделирования тканевой гипоксии с позиций доказательной медицины приведено теоретическое обобщение и новое решение научной задачи относительно ранних механизмов патогенеза псевдогепаторенального синдрома как основы ухудшения течения почечной и печеночной недостаточности при разобщении окисления и фосфорилирования на фоне введения 2,4-динитрофенола. Показано увеличение концентраций фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкина -  $1\beta$ , интерлейкина -  $6$  в плазме крови и развитие синдрома потери ионов натрия с мочой, что сопровождалось увеличением экскреции и клиренса исследуемого катиона. Выявлено защитное влияние экзогенного мелатонина на степень окислительно-модифицированных белков в почках и печени крыс, который уменьшал уровень коэффициента R/B в проксимальных, дистальных отделах нефрона, собирательных канальцах сосочка почек и белковых массах цитоплазмы гепатоцитов.

Ключевые слова: 2,4-динитрофенол, почки, печень, цитокины, синдром потери ионов натрия, мелатонин, окислительно-модифицированные белки.

## EARLY PATHOGENESIS MECHANISMS OF KIDNEY AND LIVER LESIONS WITH BREAKING OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

Rohovyy Y.Y.<sup>1</sup>, Beliavskiy V.V.<sup>1</sup>, Filipova L.O.<sup>1</sup>, Doroshko V.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine (58002, c. Chernovtsy, Teatralna sq., 2, ), e-mail: [pathophysiology@bsmu.edu.ua](mailto:pathophysiology@bsmu.edu.ua)

From the positions of probative medicine the work presents theoretical substantiation and a new approach to solve the scientific task concerning early pathogenesis mechanisms of pseudohepatorenal syndrome as the basis to deteriorate the course of kidney and liver failure with breaking oxidative phosphorylation under conditions of 2,4-dinitrofenol administration. An increase of the concentration of the blood plasma tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin - $1\beta$ , interleukin - $6$  and development of the syndrome of the urinary loss of sodium ions with a growth of the excretion and clearance of the cation under study have been established in experiments on 120 albino outbred male rats with the body weight of 0,16-0,20 kg fed on low-sodium diet with tissue hypoxia modeling. A protective effect of exogenons melatonin has been established on the degree of oxidatively modified proteins in the kidneys and liver of rats with lowered the level of the R/B coefficient in the proximal, distal portions of the nephron, the collecting tubules of the renal papilla and the protein masses of the cytoplasm of hepatocytes.

Keywords: 2,4-dinitrofenol, kidneys, liver, cytokines, sodium ions loss syndrome, melatonin, oxidative modified proteins.

**Введение.** Известно, что введение 2,4 – динитрофенола вызывает развитие острой тканевой гипоксии [4] из-за разобщения процессов окисления и фосфорилирования, что приводит к расстройству функции почек с нарушением главного энергозависимого процесса - реабсорбции ионов натрия, белка в проксимальном отделе нефрона, повреждения печени [1]. В развитии ранних механизмов повреждения печени и почек при данных условиях могут играть цитокины, продукты окислительной модификации белков с формированием синдромов транслокации и потери ионов натрия с мочой. Как средство патогенетической коррекции этих нарушений целесообразно использовать антиоксидант мелатонин.

**Цель исследования.** Выяснить ранние механизмы повреждения печени и почек при условии гипонатриевого рациона питания в условиях острой тканевой гипоксии, вызванной введением 2,4-динитрофенола с разработкой путей патогенетической коррекции выявленных нарушений путем использования мелатонина.

#### **Материал и методы исследования**

В экспериментах на 120 самцах белых нелинейных крыс массой 0,16-0,20 кг исследовали острую тканевую гипоксию, которую моделировали путем введения 0,1% раствора 2,4-динитрофенола внутрибрюшинно в дозе 3 мг/кг однократно [3]. Устойчивость крыс к острой гипоксии оценивали по времени потери позы на “высотном плато” острой гипобарической гипоксии и временем общего пребывания животных от момента достижения “высоты” 12000 м до появления второго агонального вдоха (время жизни или резервное время), а также с учетом времени восстановления позы с момента начала спуска. Выделяли 3 группы животных: высоко-, средне- и низкоустойчивые [2]. Все дальнейшие исследования проводили на среднеустойчивых крысах.

Участки тканей печени и почек фиксировали в течении 48 часов в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, после чего проводили процедуру обезвоживания в восходящей батарее этанола и парафиновую заливку при температуре 58<sup>0</sup>С. Для оценки окислительной модификации белков срезы гистохимически окрашивали бромфеноловым синим по Микель-Кальво. Компьютерную спектрометрию осуществляли при помощи компьютерной программы ColorPic (Graphic Art Tools, 2004). Способ гистохимического определения соотношения между основными и кислыми группами белков, основанный на измерении интенсивности красного и синего цветов спектра при компьютерно-спектральном анализе цифровых изображений микроскопических объектов и расчета коэффициента R/B, как соотношения между интенсивностью окрашивания в участке красного спектра (R) к интенсивности окрашивания в участке синего спектра (B) [6].

Функциональное состояние почек исследовали при условии водной нагрузки, для чего крысам внутрижелудочно, при помощи металлического зонда, вводили водопроводную воду подогретую до температуры 37<sup>0</sup>С в количестве 5% от массы тела. Величину диуреза (V) оценивали в мл/2 часа <sup>⊙</sup>100 г. После водной нагрузки с целью получения плазмы проводили эвтаназию животных путем декапитации под легким эфирным наркозом, кровь собирали в пробирки с гепарином. Скорость клубочковой фильтрации (C<sub>cr</sub>) оценивали по клиренсу эндогенного креатинина, которую рассчитывали по формуле:

$$C_{cr} = U_{cr} \cdot V / P_{cr}$$

где U<sub>cr</sub> и P<sub>cr</sub> - концентрация креатинина в моче и плазме крови соответственно. Концентрации ионов натрия, калия в моче и плазме крови оценивали методом пламенной

фотометрии, концентрацию белка мочи определяли сульфосалициловым методом. Исследовали проксимальную и дистальную реабсорбцию ионов натрия ( $T^pNa^+$ ,  $T^dNa^+$ ). Расчеты проводили по формулам:

$$T^pNa^+ = (C_{cr} - V) \ominus PNa^+ \ominus$$

$$T^dNa^+ = (PNa^+ - UNa^+) \ominus V [7]$$

Цитокины крови определяли иммуноферментным методом [2, 3, 4].

Экзогенный мелатонин вводили в дозе 3,5 мг/кг однократно [8].

Статистическую обработку полученных данных проводили на компьютере с помощью программы “Statgrafics” и “Excell 7.0”. Все исследования выполнены на основании Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, которых используют в экспериментах и других научных целях (от 18.03.1986 г.), Директивы ЕЭС № 609 (от 24.11.1986 г.), приказов МЗ Украины № 960 от 23.09.2009 г и № 944 от 14.12.2009 г.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Результаты исследований показали возрастание концентраций фактора некроза опухолей- $\alpha$ , интерлейкина -1 $\beta$ , интерлейкина-6 в плазме крови (рис.1) через 2 часа после введения 2, 4 – динитрофенола в дозе 3 мг/кг в условиях гипонатриевого рациона питания.

При введении 2, 4 – динитрофенола величина мочевого выделения снижалась, возрастала концентрация ионов калия, белка в моче, снижалась клубочковая фильтрация (табл. 1). Концентрации креатинина в плазме крови и моче не изменялись. Оценка транспорта ионов натрия при условии введения 2, 4 – динитрофенола характеризовалась возрастанием концентрации ионов натрия в моче. Проксимальная реабсорбция ионов натрия характеризовалась тенденцией к торможению, а дистальная реабсорбция этого электролита снижалась достоверно. Концентрация ионов натрия в плазме крови не изменялась.

На рис. 2 показан форест-график сравнительной оценки защитного влияния мелатонина на коэффициент R/V цитоплазмы эпителия проксимальных канальцев, экскрецию ионов натрия, клиренс ионов натрия, концентрационный индекс ионов натрия через 2 часа после введения 2, 4 – динитрофенола в дозе 3 мг/кг при условии гипонатриевого рациона питания при водном индуцированном диурезе в объеме 5% от массы тела. Контроль для всех исследований представлено в виде вертикальной линии и принято за 1.

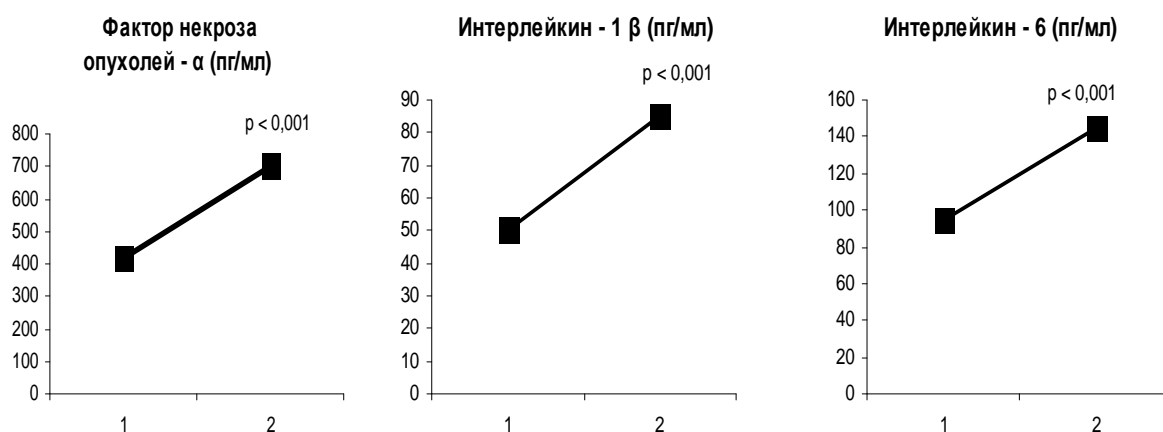


Рис.1. Концентрации фактора некроза опухолей- α, интерлейкина -1 β, интерлейкина - 6 в плазме крови (пг/мл) через 2 часа после введения 2, 4 – динитрофенола в дозе 3 мг/кг при условии гипонатриевого рациона питания при водном индуцированном диурезе в объеме 5% от массы тела. 1- контроль, 2 - введение 2, 4 – динитрофенола. p – достоверность отличий в сравнении с контролем.

Таблица 1

Показатели функции почек через 2 часа после введения 2, 4 – динитрофенола в дозе 3 мг/кг при условии гипонатриевого рациона питания при водном индуцированном диурезе в объеме 5% от массы тела ( $\bar{x} \pm Sx$ )

Показатели	Контроль (n=10)	2, 4 – динитрофенол (n=10)
Диурез, мл/2 час · 100 г	4,58±0,299	3,72±0,253 p< 0,05
Концентрация ионов калия в моче, ммоль/л	15,30±1,963	26,90±4,394 p< 0,02
Концентрация креатинина в моче, ммоль/л	1,46±0,086	1,41±0,058
Концентрация креатинина в плазме крови, ммоль/л	53,50±3,106	47,10±2,030
Клубочковая фильтрация, мкл/мин · 100 г	1096,6±136,57	919,1±42,61
Концентрация белка в моче, г/л	0,019±0,0037	0,032±0,0063
Концентрация ионов натрия в моче, ммоль/л	0,37±0,053	0,76±0,061 p< 0,001
Концентрация ионов натрия в плазме крови, ммоль/л	135,5±1,89	136,0±1,675
Дистальная реабсорбция ионов натрия, мкмоль/2 часа · 100 г	618,1±40,88	503,5±34,73 p< 0,05
Проксимальная реабсорбция ионов натрия, ммоль/2 часа · 100 г	17,29±2,293	14,53±0,811

p – достоверность отличий в сравнении с контролем; n - число наблюдений.

Как видно из приведенного графика наиболее существенное протекторное влияние в условиях опыта мелатонин выявлял на концентрационный индекс ионов натрия.

Введение 2,4-динитрофенола приводило к усилению окислительной модификации белков по возрастанию показателя R/B в проксимальных канальцах, мозговых толстых восходящих отделах петли нефрона, собирательных канальцах сосочка почек, в белковых массах цитоплазмы гепатоцитов (табл. 2).

Таблица 2

Степень окислительной модификации белков по коэффициенту R/B (усл. ед.) при гистохимическом анализе срезов почек и печени крыс после введения 2, 4 – динитрофенола и при действии мелатонина ( $X \pm Sx$ )

Структура, где измерялся показатель R/B	Группы исследования		
	Контроль, интактные животные (n = 8)	Введение 2,4-динитрофенола (n = 8)	Введение 2,4-динитрофенола на фоне мелатонина (n = 8)
Цитоплазма эпителия проксимальных канальцев	1,08±0,005	1,39±0,009 p < 0,001	1,24±0,008 p <sub>1</sub> < 0,001
Цитоплазма эпителия мозговых толстых восходящих частей петли нефрона	1,04±0,004	1,18±0,007 p < 0,001	1,05±0,004 p <sub>1</sub> < 0,001
Цитоплазма эпителия трубочек сосочка	1,03±0,004	1,15±0,008 p < 0,001	1,04±0,005 p <sub>1</sub> < 0,001
Белковые массы цитоплазмы гепатоцитов	1,12±0,006	1,26±0,009 p < 0,001	1,19±0,008 p <sub>1</sub> < 0,001

p – достоверность отличий в сравнении с контролем, p<sub>1</sub> – достоверность отличий в сравнении с введением 2,4-динитрофенола, n – число наблюдений.

Введение 2, 4 – динитрофенола обуславливало снижение уровня АТФ в почечных канальцах в среднем в 2 раза [2] за счет расщепления окисления и фосфорилирования. Дефицит АТФ обуславливал нарушения главного энергозависимого процесса почечных канальцев – реабсорбции ионов натрия, что приводило к развитию синдрома потери исследуемого катиона. Обозначенное подтверждено ростом концентрации ионов натрия в моче. Тенденция к снижению проксимальной реабсорбции ионов натрия обусловлена “скрытым” повреждением проксимального отдела нефрона [7], а вероятное снижение дистальной реабсорбции исследуемого катиона обусловлено тем, что процессы транспорта в дистальном канальце есть более энергозависимы нежели в проксимальном отделе нефрона.

В тоже время, степень проявлений синдрома потери был несущественным, поскольку концентрация ионов натрия в плазме крови не менялась, а несущественная активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы вызывала только вероятное снижение диуреза, возрастание концентрации ионов калия в моче при наличии тенденции к торможению клубочковой фильтрации. Повреждение барьеров кишечника и печени на фоне

энергетического дефицита приводило к транслокации эндотоксина с просвета кишечника в кровь [5], который обуславливал возрастание концентраций фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкина- $1\beta$  и интерлейкина-6, которые у свою очередь вызывали дополнительные реакции повреждения почечных канальцев с усилением проявления синдрома потери ионов натрия.

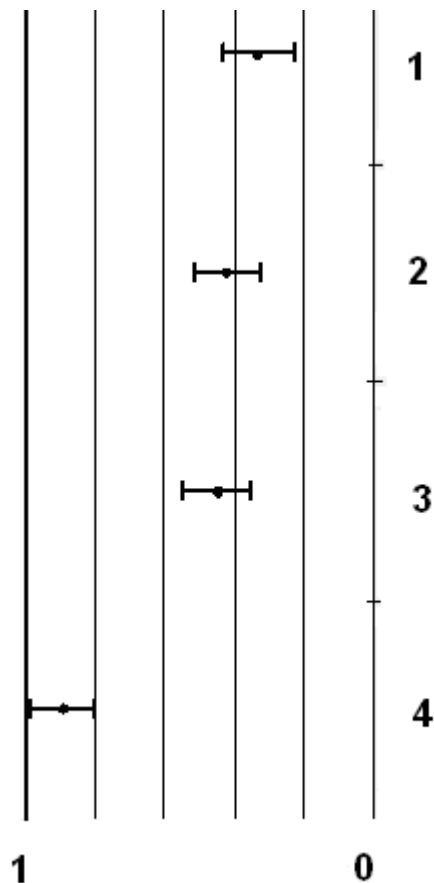


Рис. 2. Форест-график сравнительной оценки защитного влияния мелатонина на коэффициент R/V цитоплазмы эпителия проксимальных канальцев, экскрецию ионов натрия, клиренс ионов натрия, концентрационный индекс ионов натрия через 2 часа после введения 2, 4 – динитрофенола в дозе 3 мг/кг при условии гипонатриевых рациона питания при водном индуцированном диурезе в объеме 5% от массы тела. 1- концентрационный индекс ионов натрия (усл. ед.); 2- клиренс ионов натрия (мл/2 часа · 100 г); 3- экскреция ионов натрия (мкмоль/2 часа · 100 г); 4 – коэффициент R/V цитоплазмы эпителия проксимальных канальцев – (усл. ед.); Контроль для всех исследований представлено в виде вертикальной линии и принято за 1.

При гипонатриевом рационе питания через 2 часа моделирования тканевой гипоксии после введения 2,4-динитрофенола установлено возрастание концентраций фактора некроза опухоли-  $\alpha$ , интерлейкинов  $1\beta$  и -6 в плазме крови, показано повышение степени окислительно-модифицированных белков в почках и печени крыс по коэффициенту R/V, которые вызывали повреждения печени и почек, нарушения энергетического обмена с развитием синдромов транслокации и потери ионов натрия с мочой с возрастанием его

екскреції. Мелатонін за счет антиоксидантних свойств проявлял захисне впливання на течення псевдогепаторенального синдрому [9, 10] при тканевій гіпоксії, котрий виявлял захисне впливання на ступінь окислювально-модифікованих білків в нирках і печині крыс, зменшував рівень коефіцієнта R/B в проксимальних, дистальних отделах нефрона, збиральних каналцях сосочка нирок і білкових масах цитоплазми гепатоцитів в порівнянні со значеннями при інтоксикації 2,4-динітрофенолом.

### **Вывод**

В опытах на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах при гипонатриевом рационе питания в условиях моделирования тканевой гипоксии с позиций доказательной медицины приведено теоретическое обобщение и новое решение научной задачи относительно ранних механизмов патогенеза псевдогепаторенального синдрома как основания ухудшения течения почечной и печеночной недостаточности при разобщении окисления и фосфорилирования на фоне введения 2,4- динитрофенола.

### **Список литературы**

1. Бойчук Т.М. Патолофізіологія гепаторенального синдрому при гемічній гіпоксії/ Т.М.Бойчук, Ю.Є.Роговий, Г.Б.Попович // Чернівці: Медичний університет, 2012.- 192 с.
2. Белявський В.В. Функція нирок і фактор некрозу пухлин-альфа за умов уведення 2,4-динітрофенолу / В.В.Белявський, Ю.Є. Роговий, М.В.Дікал, В.В.Білоокій // Клінічна та експериментальна патологія.-2010.- Том IX, № 4 (34).- С. 5 - 9.
3. Белявський В.В. Роль інтерлейкіну-1 $\beta$  у розвитку синдрому втрати іонів натрію з сечею умов роз'єднання окиснення і фосфорилування/ В.В.Белявський // Одеський медичний журнал.-2011.- № 2 (124).- С. 4 - 6.
4. Белявський В.В. Роль інтерлейкіну-6 у розвитку синдрому втрати іонів натрію за умов уведення 2,4-динітрофенолу/ В.В.Белявський, Ю.Є.Роговий, М.В.Дікал, В.В.Білоокій // Вісник Вінницького національного медичного університету.-2011.- № 15(1).- С.24-28.
5. Пат. 5601 UA, МПК А61В10/00, G01N33/ 50. Спосіб діагностики синдрому транслокації / Білоокій В.В., Пішак В.П., Роговий Ю.Є., Магальяс Ю.М., Халтурник М.В.; заявка 20040705910; заявл. 19.07.2004; опубл. 15.03.2005, Бюл. № 3.
6. Пат. 13712 U Україна, МПК 7:А 61 В 10/00. Спосіб вимірювання окиснювальної модифікації білків в структурах плаценти / Шендерюк О.П., Давиденко І.С.; заявник: БДМУ - № u200509673; заявлено 14.10.2005; опубл. 17.04.2006., Бюл. «Пром. власність», № 4.

7. Роговий Ю.Є. Патолофізіологія гепаторенального синдрому на поліуричній стадії сулемової нефропатії/ Ю.Є.Роговий, О.В.Злотар, Л.О.Філіпова// Чернівці: Медичний університет, 2012. – 200 с.
8. Роговий Ю.Є. Окисномодифіковані білки у нирках та печінці при інтоксикації 2,4-динітрофенолом та дії мелатоніну в експерименті / В.В.Белявський, Ю.Є.Роговий, М.В.Дікал // Клінічна анатомія та оперативна хірургія.-2011.-Т.10, № 3.- С. 18-21.
9. Маммаев С.Н. Гепаторенальный синдром 1-го и 2-го типа: современное состояние проблемы / С. Н. Маммаев, А. М. Каримова // Рос. ж. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2008. – Т.18, № 6. – С. 4 – 14.
10. Basic Pathology / [ Robbins, Kumar, Abbas, Fausto, Mitchell].-[8<sup>th</sup> ed.].-Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: Bsevier Inc.-2007.- 902 p.

**Рецензенты:**

Швец В.И., д.б.н., профессор, профессор кафедры физиологии имени Я.Д.Киршенблата Буковинского государственного медицинского университета МЗ Украины, г.Черновцы.

Заморский И.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии Буковинского государственного медицинского университета МЗ Украины, г.Черновцы.