

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ ЦИТОЛІЗУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ОТРУЄННЯ ТОКСИНАМИ БЛІДОЇ ПОГАНКИ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ

**ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського
МОЗ України» (м. Тернопіль)**

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт «Особливості порушень метаболічних процесів в організмі тварин, уражених солями кадмію та іншими ксенобіотиками і способи їх корекції» та «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних і біогенних токсикантів в біологічних системах» (№ держреєстрації 0112U000542) ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (№ держреєстрації 0109U001311).

Вступ. Отруєння грибами є актуальною проблемою сучасної медичної науки. Аналіз літератури останніх років свідчить про стійку тенденцію до збільшення числа отруєнь блідою поганкою. Важка клінічна картина цих отруєнь, відсутність специфічної терапії, висока летальність вимагають глибокого вивчення патогенезу даних інтоксикацій. Найважчі стани виникають при отруєнні блідою поганкою, токсини якої призводять до глибоких порушень гомеостазу [1, 2, 4, 5, 10–11].

Тому актуальним є необхідність експериментального вивчення механізму впливу БП на печінку, – орган, який найбільше пошкоджується аманіта-фалюїдинами. Дія даної отрути супроводжується посиленням процесів катаболізму в тканинах з утворенням нових токсичних продуктів [6, 10–11].

Загальноприйнятими маркерами порушення цілісності клітинних мембран (маркерами цитолізу гепатоцитів) є органо- і органелоспецифічні ферменти, які з'являються у крові. Серед них інформативними є аланінамінотрансфераза (АлАТ) і аспартатамінотрансфераза (АсАТ). Як відомо, вміст цитозольних ферментів у плазмі крові та позаклітинному просторі тканин перебуває на відносно низькому рівні. Але пошкодження плазматичних мембран або підвищення клітинної проникності призводить до ряду змін всередині клітини, завершується пошкодженням клітинних органел і виходом ферментів із цитозолу і вміст їх вказує на ступінь пошкодження мембран [3, 5, 7].

З метою дослідження функціонального стану клітинних мембран при аманіта-фалюїдиновій інтоксикації ми визначали активність у плазмі крові щурів АлАТ та АсАТ.

Мета дослідження. З'ясувати та дослідити динаміку активності ферментів цитолізу аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в організмі щурів 3-, 6- і 18-24-місячного віку за умов отруєння токсинами БП.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на нелінійних білих щурах-самцях, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Досліди проведено на щурах трьох вікових груп: 3-місячного віку (період статевого дозрівання; молоді), 6-місячного віку (період статевої зрілості; дорослі) і 18-місячного віку (період старості; старі) (Трахтенберг І. М. і др., 1994).

Отруєння тварин здійснювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення екстракту БП, отриманого за методом Wieland [12], в дозі 85 мг/кг маси тіла ($S LD_{50}$). Евтаназію щурів проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом через 6, 24 та 72 год після отруєння з подальшим забором крові.

Дослідні тварини були поділені на 2 групи: I – інтактні щури; II – щури, яким вводили екстракт БП (у подальшому щури, отруєні БП). Проведено 3 серії дослідів. Першу серію проведено на щурах 3-місячного віку; другу – на щурах 6-місячного віку; третю – на щурах 18-місячного віку.

Експерименти на тваринах були виконані відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених Національним конгресом з біоетики (2004 р., Київ) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (1986р., Страсбург).

Матеріалом для досліджень служила кров, в якій визначали активність АлАТ (КФ 2. 6. 1. 2) і АсАТ (КФ 2. 6.1.1) за методом Райтмана і Френкеля концентрацію (за допомогою стандартних наборів ООО НПП «Філісит діагностика», Україна), визначали коефіцієнт де Рітца (АсАТ / АлАТ).

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Розраховували значення середніх арифметичних величин (M) і помилку середньостатистичного значення (m). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій

Стьюдента (t). Зміни показників вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

Одним із важливих показників обміну речовин в організмі є рівень активності ферментів, які беруть участь в адаптивних перебудовах. До них належать ферменти переамінування – АлАТ (КФ 2. 6. 1. 2) та АсАТ (КФ 2. 6. 1. 1). У процесах обміну речовин живого організму трансамінази, зокрема АлАТ та АсАТ, відіграють суттєву роль, зумовлену їхньою участю у переамінуванні амінокислот, а також у спряженні амінокислотного та вуглеводного обмінів. Трансамінази, особливо АсАТ, беруть участь у синтезі сечовини. Є відомості про те, що АсАТ пов'язана з транспортом у мембранах клітин, із енергетичною функцією мітохондрій та передаванням нервового імпульсу в синапсах [9].

Відомо, що зміни каталітичної активності специфічних ферментних систем можуть бути прямим показником порушення цілісності клітин і субклітинних органел [7].

В таблиці наведені дані змін ферментної активності ферментів переамінування АлАТ та АсАТ за умов отруєння екстрактом блідої поганки у тварин різного віку.

У плазмі крові інтактних тварин найнижчою була активність АлАТ у молодих (3-місячних) щурів у порівнянні із статевозрілими (6-місячними) і старими (18-24 місячними) тваринами, що, очевидно, пов'язано з особливостями метаболізму амінокислот.

Встановлено підвищення активності АлАТ відповідно через 6, 24, 72 год після отруєння у сироватці крові молодих (у 5,0; 14, 6 і 3,7 рази), дорослих (у 5,0; 8,0; 3,6 рази) та старих (у 5,9; 9,4; 8,6 рази) щурів, порівняно з показниками тварин інтактною групи.

Найбільш виразні зміни щодо вмісту АлАТ спостерігали через 24 год з моменту отруєння токсинами блідої поганки у тварин всіх вікових періодів. Очевидно, що розпал токсичного гепатиту припадав на 24 год експерименту. Незважаючи на таку тенденцію, активність обох ферментів через 72 год досліджу все ще залишалася статистично достовірно вищою порівняно з інтактними щурами, що свідчить про ще неповну регенерацію тканини печінки у цей термін дослідження.

З огляду на те, що АлАТ є органоспецифічним ферментом печінки, підвищення його активності в плазмі крові слід розцінювати як наслідок цитотоксичного впливу блідої поганки на гепатоцити, що супроводжувалося пошкодженням плазматичних мембран та підвищенням проникності гепатоцитів.

Подібних змін зазнавав ще один цитозольний фермент печінки – АсАТ. Як видно із **табл.**, в інтактних тварин була вища активність АсАТ у старчих щурів порівняно з молодими і дорослими.

При дії отрути блідої поганки на організм щурів усіх вікових періодів нами зафіксовано також достовірне зростання АсАТ у всі терміни дослідження. Відносно інтактних тварин ензимна активність даного фермента у молодих щурів зростала у 2,1, 2,7 та 3 рази відповідно (через 6, 24 та 72 години), у дорослих – у 3,9; 6 та 4 рази відповідно та старих – у 4,1; 7,6; 7,9 рази відповідно порівняно із контролем.

Відомо, що підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові може бути, як наслідком ушкодження гепатоцитів, так і збільшення біосинтезу ферментів тканиною печінки. При зворотніх запальних процесах, що характеризуються збільшенням проникності мембран, або цитоліз гепатоцитів вивільнюється перш за все фермент цитозолу – АлАТ. При некротичних станах наростає

Таблиця

Зміни ферментної активності АлАТ, АсАТ (ммоль·год/л) та коефіцієнт де Рітиса у сироватці крові щурів 3-, 6 – і 18-24-місячного віку за умов отруєння токсинами блідої поганки ($M \pm m$, $n=6-8$)

Вік, місяці	Показник	Групи тварин			
		інтактні	уражені БП, час після отруєння		
			6 год	24 год	72 год
3	АлАТ	0,95±0,04	4,83±0,11*	4,35±0,08*	3,53±0,19*
	АсАт	0,93±0,01	1,93±0,07*	2,48±0,11*	2,75±0,06*
	АсАт/АлАт	0,98±0,02	0,4±0,01*	0,57±0,02*	0,78±0,01*
6	АлАТ	1,35±0,09	6,75±0,08*	10,8±0,12*	4,86±0,03*
	АсАт	1,22±0,02	4,76±0,11*	7,34±0,08*	4,77±0,05*
	АсАт/АлАт	0,9±0,01	0,4±0,01*	0,71±0,02*	0,98±0,03*
18-24	АлАТ	1,65±0,04	9,74±0,03*	15,51±0,09*	14,22±0,64*
	АсАт	1,34±0,03	5,49±0,06*	10,18±0,03*	10,59±0,07*
	АсАт/АлАт	0,81±0,01	0,56±0,01*	0,66±0,04*	0,74±0,01*

Примітка: * – $p_1 < 0,05$ – вірогідні відмінності порівняно з тваринами контрольної групи.

активність ферменту, локалізованого в мітохондріях – АсАТ [7-8], на що й звертає на себе увагу той факт, що через 72 год після ураження токсинами БП активність АсАТ, особливо у молодих і старих тварин, перевищувала аналогічний показник АлАТ, що вказує на значно глибші порушення структурної організації гепатоцитів.

Як показують результати, для тварин усіх вікових груп з аманіта-фалотоксикозом активність досліджуваних ензимів, що є маркерами цитолітичного синдрому, протягом усіх досліджуваних термінів досліджень зазнала однотипних, спрямованих у бік зростання змін.

Виявлена нами динаміка активності досліджуваних амінотрансфераз служить опосередкованим доказом порушення цілісності

структури мембран гепатоцитів і свідчить про виснаження функціональних можливостей печінки.

Співвідношення активності АсАТ: АлАТ (коефіцієнт де Рітіса) несе діагностичну інформацію про форми і тяжкості захворювання, оскільки АлАТ – фермент цитоплазми гепатоцитів, а АСТ в печінкових клітинах локалізується переважно в мітохондріях [3,7].

Отримані у нашому досліді значення АсАТ / АлАТ свідчать про те, що цей показник достовірно знижувався у тварин усіх вікових періодів, однак найбільші зміни зафіксовано у щурів 3-місячного віку, що вказує на глибший ступінь ураження паренхіми печінки.

Висновок. Ураження токсинами блідої поганки супроводжується виразним цитолітичним синдромом, на що вказує достовірне зростання активності амінотрансфераз у сироватці крові. Найбільш виразні зміни спостерігаються у старих, дещо менші у молодих тварин, що вказує на вікові особливості цього процесу. У тварин цих вікових періодів має місце глибший ступінь ураження гепатоцитів, що впливає із зниження коефіцієнта де Рітіса.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення показників холестатичного, мезенхімально-запального синдромів і можливість їх медикаментозної корекції.

Література

1. Бабенко О. В. Отравления грибами: вопросы диагностики и лечения / О. В. Бабенко, М. М. Авхименко, В. И. Агапов // Мед. помощь. – 2002. – № 4. – С. 25–27.
2. Буланов М. А. Проблемные вопросы отравления бледной поганкой у детей / М. А. Буланов, А. П. Кузьменко, В. Е. Зайцев // Матеріали конференції «Стандарты и индивидуальные подходы в анестезиологии и реаниматологии», Москва, 2009. – Вестник интенсивной терапии. – 2009. Приложение к № 5. – С. 6–7.
3. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике / А. М. Горячковский. – Одесса : Экология, 2005. – 616 с.
4. Досвід використання Гепасолу НЕО 8% при лікуванні синдрому печінкової енцефалопатії, зумовленого отруєнням аманітальними грибами / І. П. Шлапак, С. М. Недашківський, О. А. Галушко [та ін.]. // Медицина невідкладних станів. – № 3(34). – 2011. – С. 58.
5. Лужников Е. А. Острые отравления взрослых и детей / Е. А. Лужников, Г. Н. Суходолова. – Москва: изд-во «Эксмо». – 2009. – С. 479–487.
6. Москаленко С. Отравление грибами у детей / С. Москаленко, Д. Гриненко // Медицина неотложных состояний. – 2006. – № 6(7). – С. 22–26.
7. Никифоров А. П. Активность ферментов сыворотки крови мужчин и женщин при некоторых патологических состояниях / А. П. Никифоров // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 1. – С. 14–15.
8. Фульминантная недостаточность печени как проявление отравления гепатотоксичными грибами / В. И. Черный, И. В. Кузнецова, С. Г. Тюменцева [и др.] // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2003. – № 4. – С. 69–80.
9. Янович Л. Вплив фенолу на активність ферментів переамінування у тканинах UNIO PICTORUM / Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2003. – Вип. 34. – С. 32–40.
10. Acute Liver Failure Caused by Amanita phalloides Poisoning / L. Santi, C. Maggioli M. Mastroberto [et al.] // <http://www.hindawi.com/journals/ijhep/2012/487480/>.
11. Poisonous mushrooms; a review of the most common intoxications / A. D. L. Lima, R. Costa Fortes, M. R. C. Garbi Novaes [et al.] // Nutr. Hosp. – 2012. – Vol. 27, № 2. – P. 402–408.
12. Wieland H. Über die giftstoffe des knollenblätterpilzes. VI. Amanitin, das Hauptgift des Knollenblätterpilzes / H. Wieland, R. Hallermayer // Liebig's Ann. Chem. – 1941. – №. 548. – P. 1-18.

УДК 616.36–099:582.284–06:612.128]–092.9–053

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ ЦИТОЛІЗУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ОТРУЄННЯ ТОКСИНАМИ БЛІДОЇ ПОГАНКИ

Кузьмак І. П.

Резюме. В умовах отруєння блідою поганкою відмічаються виражені цитолітичні процеси. Встановлено статистично достовірне збільшення активності АлАТ (аланінамінотрансфераза) та АсАТ (аспартатамінотрансфераза) у статевонезрілих, статевозрілих та старих щурів з гострою інтоксикацією токсинами блідої поганки в динаміці. Виявлено, що максимальні зміни активності даних ферментів спостерігаються через 24 год експерименту та найбільш виражені в групі старих тварин.

Ключові слова: бліда поганка, отруєння, щури, вікові особливості отруєння.

УДК 616. 36–099:582. 284–06:612. 128]–092. 9–053

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОЛИЗА В КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ТОКСИНАМИ БЛЕДНОЙ ПОГАНКИ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Кузьмак И. П.

Резюме. В условиях отравления бледной поганкой отмечаются выраженные цитолитические процессы. Установлено статистически достоверное увеличение активности АлАТ (аланинаминотрансфераза) и АсАТ (аспартатаминотрансфераза) у неполовозрелых, половозрелых и старых крыс с острой интоксикацией токсинами бледной поганки в динамике. Выявлено, что максимальные изменения активности данных ферментов наблюдаются через 24 часа эксперимента и наиболее выражены в группе старых животных.

Ключевые слова: бледная поганка, отравление, крысы, возрастные особенности отравления.

UDC 616. 36–099:582. 284–06:612. 128]–092. 9–053

Dynamics of Cytolysis Indices of Rats in the Conditions Acute Poisoning by Amanita Phalloides Toxins in Age Aspect

Kuzmak I. P.

Summary. Poisoning by Amanita phalloides is characterized by expressed cytolysis processes. It was found out a statistically significant increase in AST (aspartataminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase) activity in immature, mature and old rats with acute intoxication in the dynamics has been studies. The maximum changes in activity of this enzymes was observed after 24 hours of the experiment and the most pronounced were in the group of old rats.

Keywords: Amanita phalloides (death cup), poisoning, rats, alanine aminotransferase, aspartataminotransferase albumins, age-related features of poisoning.

Стаття 5. 03. 2013 р.

Рецензент – проф. Олійник С. А.