

# ОБЪЕКТИВИЗАЦИЯ СОСТОЯНИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАГРУЗОЧНОГО ТЕСТА В ПРАКТИКЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Зиновкина В. Ю.<sup>1</sup>, Глинская Т. Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Изучение механизмов и фазности развития ответной реакции организма в токсикологических исследованиях требует использования адекватных моделей и тестов, которые можно применять при остром, подостром и хроническом токсикологическом эксперименте. При проведении токсикологических исследований установление предикторов декомпенсации является особенно важным с позиций регламентации временных и дозовых воздействий и разработки профилактических и лечебных мероприятий. Для решения вопроса об установлении зависимости «доза-концентрация-эффект» в действии токсикантов на клеточном уровне актуальным является изучение реакции мембранных систем клеточных органелл. Известен ряд веществ, обладающих гепатотоксичностью, с которыми человек на протяжении своей жизни сталкивается в окружающей среде. Повреждение и повышение проницаемости лизосомальных мембран гепатоцитов играет важную роль в патогенезе токсических поражений печени, вызванных ксенобиотиками. С целью выявления ранних признаков декомпенсации при токсических поражениях печени (хроническое токсическое поражение печени, вызванное четыреххлористым углеродом и внепеченочный холестаза) в условиях токсикологического эксперимента проведен анализ динамики неседиментируемой активности кислых нуклеаз в ткани печени под влиянием нарастающих концентраций неионного детергента. Проведение нагрузочного теста при моделируемой патологии позволяет объективизировать прочность связи гидролаз с мембраной лизосом; выявить ранние нарушения стабильности мембран органелл и предикторы истощения функциональных резервов и начало стадии декомпенсации.

**Ключевые слова:** хронические токсические поражения печени; лизосомы; кислые нуклеазы; неседиментируемая активность; коэффициент седиментации; лизосомальные мембраны; нагрузочный тест.

**Введение.** В патогенезе хронических токсических поражений печени (хроническое токсическое поражение печени, вызванное четыреххлористым углеродом, и внепеченочный холестаза) важную роль играет лизосомальная система печеночных клеток, принимающая активное участие в процессах повреждения, цитолиза, деградации макромолекул, а также в последующей инициации процессов восстановления или регенерации [1]. Состояние мембран лизосом влияет на степень связи лизосомальных гидролаз с мембраной органелл, интенсивность выхода гидролаз в гиалоплазму и, в конечном счете, активность гидролаз и интенсивность их участия в реакциях деградации биополимеров и повреждения биологических субстратов. Кислые нуклеазы (кислая дезоксирибонуклеаза и кислая рибонуклеаза) лизосом — гидролазы, достаточно прочно связанные с мембранами органелл. Максимальная активность кислых нуклеаз отмечается в «легкой» лизосомальной фракции, а повышение неседиментируемой активности — при повреждении мембран лизосом, функциональной их активности, преобладании вторичных форм органелл. Для оценки состояния мембран лизосом был выбран тест на чувствительность к нарастающим концентрациям неионного детергента тритона X-100 [2]. Реакция на применение низких концентраций тритона X-100 (0,005; 0,01; 0,02; 0,05 %) косвенно отражает прочность связи фермента с мембраной лизосом, а при применении высоких концентраций (0,2–0,5 %) характеризует преимущественно степень повреждаемости (устойчивости) мембран органелл.

**Цель работы** — изучить состояние лизосомальных мембран гепатоцитов в различные сроки хронического токсического поражения печени (хроническое токсическое поражение печени, вызванное четыреххлористым углеродом, и внепеченочный холестаза) с помощью теста с нарастающими концентрациями неионного детергента для выявления ранних предикторов декомпенсации.

**Материалы и методы.** Экспериментальные исследования проведены на беспородных белых крысах-самцах с исходной массой 200–250 г с соблюдением правил работы с использованием экспериментальных животных. Моделирование хронического токсического поражения печени у крыс проводилось гепатотропным ядом — четыреххлористым углеродом по стандартной методике. Моделирование внепеченочного холестаза осуществлялось путем перевязки и перерезки общего желчного протока под наркозом. В различные сроки хронического токсического поражения печени (6, 20 и 36 недель) и внепеченочного холестаза (12 ч, 3 сут, 7 дней, 14 дней и 21 сут) для косвенного суждения о стабильности мембран лизосом печеночных клеток предварительно изучалась неседиментируемая и общая активность кислых нуклеаз,

рассчитывался коэффициент седиментации (отношение неседиментируемой активности к общей активности) для названных гидролаз. Коэффициенты седиментации оценивались по отношению к здоровому контролю. С целью более объективной оценки состояния мембран лизосом гепатоцитов изучалась их чувствительность к нарастающим концентрациям неионного детергента тритона X-100. Для постановки теста с тритоном X-100 свежеприготовленные суспензии, содержащие печеночные клетки, инкубировались в течение 30 мин при 37 °С с добавлением детергента в нарастающих концентрациях, а именно — 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 %. В последующем определялась активность гидролаз в супернатанте (неседиментируемая активность). При анализе результатов учитывали особенности реакции лизосом на применение низких и высоких концентраций детергента.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия t-Стьюдента [3].

**Результаты и их обсуждение.** Проведение теста у интактного контроля при низких концентрациях детергента характеризовалось умеренными колебаниями уровней неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы (в пределах 108,9–139,0 % к исходному уровню активности фермента в супернатанте до воздействия детергента — 75,2±6,11 ОЕ/мин × г ткани) и незначительными и недостоверными колебаниями уровней неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы (в пределах 88,3–106,8 % к исходному уровню активности фермента в супернатанте до воздействия детергента — 10,3±0,87ОЕ/мин × г ткани).

Чувствительность мембран к высоким концентрациям детергента (0,1; 0,2; 0,5 %) обеих кислых нуклеаз была значительной. Воздействие тритона X-100 в концентрации 0,1 % сопровождалось ростом неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы в 1,9 раза ( $p<0,001$ ), для кислой дезоксирибонуклеазы — 2-кратным ростом неседиментируемой активности ( $p<0,01$ ). Максимум же выхода кислых нуклеаз в супернатант отмечался при концентрации тритона X-100, равной 0,2 %, когда рост активности кислой рибонуклеазы превысил исходное значение в 3,1 раза ( $p<0,001$ ), для кислой дезоксирибонуклеазы — в 2,7 раза ( $p<0,01$ ). Дальнейший рост концентрации детергента сопровождался менее заметной реакцией со стороны проницаемости мембран для кислых нуклеаз, при этом уровень неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы превысил исходное значение в 2,0 раза ( $p<0,001$ ), неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы — в 1,4 раза ( $p<0,05$ ).

Проведение теста с детергентом в ранние сроки хронического токсического поражения печени (6 недель) показало, что на фоне хронической интоксикации отмечался заметный рост неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы (в 3,8 раза,  $p<0,05$ ). Дополнительная нагрузка детергентом сопровождалась смещением подъема ее резко влево, в сторону наименьших концентраций тритона X-100 (0,005–0,01 %), при этом степень максимального превышения над исходным уровнем приходилась на концентрацию, равную 0,01 %, и составила 160,0 % ( $p<0,01$ ) по отношению к исходному значению. Колебания уровня неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы при более высоких концентрациях детергента (0,02–0,5 %) находились в диапазоне 62,7–70,2 % ( $p<0,05$ ) от исходного.

В изучаемые сроки хронического токсического поражения печени отмечался умеренный рост неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы: на 80,0 % ( $p<0,05$ ). Дополнительная нагрузка детергентом сопровождалась смещением подъема неседиментируемой активности вправо, в сторону больших концентраций детергента (0,2–0,5 %), при этом степень превышения над исходным уровнем была менее значима, чем у интактного контроля, и составила: при концентрации тритона X-100 0,2 — 193,9 % ( $p<0,001$ ) от исходного уровня, а при концентрации детергента 0,5 — 169,4 % ( $p<0,05$ ) от контроля. Колебания уровня неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы при более низких концентрациях детергента находились в диапазоне 90,7–121,1 % от исходных значений и не имели с ними достоверных различий (таблица 1).

Таблица 1. — Показатели наглядности неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы и кислой рибонуклеазы в динамике хронического токсического поражения печени (% к контролю)

Срок эксперимента	Концентрация неионного детергента тритона X-100, %							
	0	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5
	Кислая ДНК-аза							
Интактный контроль	100	106,8	88,3	94,2	101,9	190,3	271,8	138,8
6 недель	100	101,1	126,7	101,1	91,7	121,1	193,9	169,4
10 недель	100	104,5	112,2	112,2	127	179,2	331,5	138,5
20 недель	100	163,1	140,5	162,4	247,7	201,7	127	242,8
36 недель	100	81,9	63	157,5	270,9	170,1	94,5	81,9

Продолжение таблицы 1

Срок эксперимента	Концентрация неионного детергента тритона X-100, %							
	0	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5
Кислая РНК-аза								
Интактный контроль	100	108,9	139,0	120,7	126,1	193,1	306,0	201,1
6 недель	100	125,0	160,0	69,0	62,7	65,8	70,2	67,3
10 недель	100	123,1	127,9	45,8	212,3	158,3	157,1	184,5
20 недель	100	88,2	155,7	104,6	309,0	86,3	74,0	209,7
36 недель	100	55,2	107,2	104,8	168,8	210,5	120,5	288,4

При внепеченочном холестазах в первые 12 ч, что соответствует острому периоду развития патологии, неседиментируемая активность кислой рибонуклеазы и кислой дезоксирибонуклеазы в гомогенате печени достоверно повышалась и составила соответственно 22,0 и 231,0 % от контрольного уровня ( $p < 0,01$ ). Изменения общей активности кислых нуклеаз в гомогенате печени были недостоверными ( $p > 0,05$ ). Коэффициент седиментации возрастал для кислой рибонуклеазы — в 3,2 раза ( $p < 0,01$ ), кислой дезоксирибонуклеазы — в 1,5 раза ( $p > 0,05$ ). В этот период внепеченочного холестаза несмотря на раннюю лабилизацию лизосомальных мембран, последние в определенной степени становились более устойчивыми к повреждающим воздействиям: максимальный выход кислых нуклеаз наблюдался, как и в контроле, при концентрации тритона X-100 — 0,2 %.

На 3 сут внепеченочного холестаза наблюдались выраженные изменения активности кислых нуклеаз. Неседиментируемая активность кислой рибонуклеазы резко увеличивалась, составляя 362 % от исходного уровня, кислой дезоксирибонуклеазы — 359 % контроля. Общая активность кислых нуклеаз по сравнению с предыдущим сроком внепеченочного холестаза возросла в среднем на 30 %. Резко возрастала проницаемость мембран лизосом: отношение коэффициента седиментации превосходило контрольный уровень для кислой рибонуклеазы — в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ), кислой дезоксирибонуклеазы — в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ).

По отношению к кислой рибонуклеазе сохранялась динамика, характерная для начала развития острого повреждения: устойчивость мембран лизосом резко снижалась. Максимум выхода фермента регистрировался при значительно более низкой концентрации тритона, чем в контроле (0,05 против 0,2 %), составляя в опыте 203,9 % ( $p < 0,05$ ). При концентрации детергента 0,2 %, обеспечивающей в контроле значительное нарастание активности кислой рибонуклеазы, составившей 291,0 % ( $p < 0,01$ ), в группе с внепеченочным холестазом на 3 сут активность фермента в супернатанте при концентрации тритона 0,2 % составила 144,6 % ( $p < 0,05$ ) и была не только намного ниже контрольных значений, но и заметно меньше его активности, регистрируемой после обработки гомогената детергентом в концентрации 0,05 %.

Активность кислой дезоксирибонуклеазы печени крыс в эти сроки внепеченочного холестаза при всех концентрациях тритона X-100 намного превышала активность того же фермента печени контрольных крыс, обработанного соответствующими концентрациями неионного детергента. Максимальный выход кислой дезоксирибонуклеазы и в опыте, и в контроле отмечался при концентрации детергента 0,2 %, составляя в опыте — 548,5 % ( $p < 0,01$ ), в контроле — 265,2 % ( $p < 0,01$ ) (таблица 2).

Таблица 2. — Показатели наглядности неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы и кислой рибонуклеазы в динамике внепеченочного холестаза (% к контролю)

Срок эксперимента	Концентрация неионного детергента тритона X-100, %							
	0	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	
Неседиментируемая активность кислой ДНК-азы								
Интактный контроль	100	109,7	77,3	104,2	204,4	265,2	166,0	
12 ч	100	56,9	64,7	68,6	119,6	148,2	119,6	
3 сут	100	190,5	296,9	225,9	319,4	548,5	202,6	
1 неделя	100	104,1	113,0	145,0	226,0	257,0	326,0	
2 недели	100	118,0	168,0	168,0	237,0	218,0	185,0	
3 недели	100	199,5	154,0	315,0	255,0	281,0	295,0	

Продолжение таблицы 2

Срок эксперимента	Концентрация неионного детергента тритона X-100, %						
	0	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2	0,5
Неседиментируемая активность кислой РНК-азы							
Интактный контроль	100	122,0	147,5	118,0	205,0	291,0	327,0
12 ч	100	87,4	97,0	143,7	191,0	309,1	182,5
3 сут	100	186,1	177,7	203,9	191,8	144,6	151,7
1 неделя	100	142,0	158,0	182,0	245,0	265,0	374,0
2 недели	100	91,4	109,0	156,0	135,0	125,0	161,0
3 недели	100	173,0	204,0	371,0	220,0	165,7	251,0

Дальнейшее проведение эксперимента (срок хронического токсического поражения печени 10 недель) вело к снижению исходного значения неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы в супернатанте. Тем не менее, имело место превышение показателя над контрольным значением в 2,2 раза ( $p < 0,01$ ). Тенденция к снижению уровня неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы косвенно отражает прогрессирующее развитие процесса компенсации и начало использования функциональных резервов пораженной ткани. Проведение теста с детергентом в этом сроке хронического токсического поражения печени характеризовалось смещением максимума неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы в супернатанте вправо, в сторону больших концентраций тритона X-100. Пик активности при этом приходился на концентрацию, равную 0,05 %, второй подъем — на концентрацию 0,5 % (превышение над исходным значением в 2,1 раза,  $p < 0,01$  и в 1,8 раза,  $p < 0,01$  соответственно).

По сравнению с предыдущим сроком хронического токсического поражения печени (6 недель) отмечалось повышение устойчивости мембран лизосом к низким концентрациям тритона X-100, что косвенно свидетельствует об улучшении связи нуклеазы с мембранами органелл, выявлялась и гораздо более выраженная реакция на воздействие высоких концентраций детергента, чем в контроле и при хроническом токсическом поражении печени в сроке 6 недель.

Для кислой дезоксирибонуклеазы сроки хронического токсического поражения печени 10 недель отмечалось 4-кратное нарастание значения неседиментируемой активности без нагрузки тритоном X-100 ( $p < 0,01$ ), что отражает прогрессирующее развитие процесса компенсации и начало использования функциональных резервов пораженной ткани и субклеточных структур. Проведение нагрузочного теста с детергентом характеризовалось сохранением устойчивости мембран лизосом к низким концентрациям тритона X-100 и отсутствием значимой реакции органелл на их применение. Колебания активности кислой дезоксирибонуклеазы находились в диапазоне 104,5–127,0 % к исходному уровню и не являлись статистически значимыми. В то же время наблюдалась гораздо более выраженная реакция на воздействие высоких концентраций детергента, чем у интактного контроля и у животных с моделируемой патологией в сроке 6 недель. Максимум активности фермента приходился на концентрацию детергента 0,2 %, при этом рост показателя произошел в 3,3 раза ( $p < 0,001$ ) по отношению к исходному значению, рост активности при концентрации тритона X-100, равной 0,1 %, составил 179,2 % ( $p < 0,01$ ) по отношению к исходному значению, а при максимальной концентрации, равной 0,5–138,5 % ( $p < 0,05$ ) от исходного уровня (таблица 1).

На 7-е сут от начала эксперимента при внепеченочном холестазах (начало стадии компенсации), также как и при 10-недельном хроническом токсическом поражении печени, неседиментируемая активность нуклеаз резко снижалась по сравнению с предыдущим уровнем, не достигая исходного, для кислой рибонуклеазы — на 145 %, для кислой дезоксирибонуклеазы — на 116 %. Увеличивалась общая активность ферментов, по которой можно косвенно судить об интенсивности синтеза гидролаз или самих лизосом, особенно заметно для кислой рибонуклеазы — на 58 % ( $p < 0,01$ ). К этому сроку внепеченочного холестаза происходила стабилизация мембран лизосом. Отношение неседиментируемой активности к общей активности, в частности, снижалось, не достигая исходных значений для кислой дезоксирибонуклеазы, для кислой рибонуклеазы значение данного показателя не имело достоверных отличий от контроля ( $p > 0,05$ ). Максимальный выход в супернатант обеих нуклеаз отмечался при значительно большей концентрации (0,5 %) тритона X-100 по сравнению с контролем (0,2 %) и составил: для кислой рибонуклеазы — 374 % ( $p < 0,01$ ), для кислой дезоксирибонуклеазы — 326 % ( $p < 0,05$ ). Активность обеих нуклеаз при концентрации тритона X-100 0,01–0,2 % практически соответствовала контрольным значениям и не имела достоверных отличий от них, а максимальный уровень существенно превышал контрольный (таблица 2).

Двадцатая неделя хронического токсического поражения печени — срок, когда на фоне выраженных компенсаторных реакций в ткани печени экспериментальных животных выявляются начальные признаки формирования цирротических изменений, — характеризовалась тенденцией к незначительному снижению уровня неседиментируемой активностикислой рибонуклеазы по сравнению с предшествующим сроком изучаемого патологического процесса (10 недель). При этом имело место превышение уровня неседиментируемой активности над значением в контроле в 1,9 раза ( $p < 0,01$ ). Проведение теста с детергентом продемонстрировало, что реакция лизосомальных мембран на данном этапе хронического токсического поражения печени претерпевает заметные изменения. Кривая максимума неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы сохранила двухпиковый характер с максимальным подъемом уровня максимума неседиментируемой активности нуклеазы при концентрации тритона X-100, равной 0,05 % (в 3,1 раза,  $p < 0,001$ ), второй подъем регистрировался при концентрации 0,5 % (в 2,1 раза,  $p < 0,001$ ). При низких концентрациях неионного детергента максимум неседиментируемой активности фермента колебался в диапазоне 88,2–115,7 %.

В изучаемый период хронического токсического поражения печени по сравнению с предшествующим сроком моделируемой патологии (10 недель) также отмечалось незначительное снижение уровня неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы. При этом сохранялось более чем 3,5-кратное превышение показателя над аналогичным значением у интактного контроля ( $p < 0,01$ ). Проведение теста с детергентом в нарастающих концентрациях продемонстрировало, что реакция мембран лизосом на данном этапе эксперимента претерпевает существенные изменения. Произошло заметное повышение чувствительности лизосомальных мембран к низким концентрациям тритона X-100 (0,005–0,05 %). Рост активности кислой дезоксирибонуклеазы в супернатанте по мере увеличения концентрации детергента выглядел так: 0,005 — 63,1 % ( $p < 0,01$ ) к исходному значению; 0,01 — 140,5 % ( $p < 0,01$ ); 0,02 — 162,4 % ( $p < 0,001$ ); 0,05 — 247,7 % ( $p < 0,001$ ). При этом сохранилась высокая чувствительность мембран к средней концентрации тритона X-100 — 0,1 %, что проявилось ростом неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы по отношению к исходному значению на 201,7 % ( $p < 0,001$ ). Второй пик активности кислой дезоксирибонуклеазы был зарегистрирован при максимальной концентрации детергента, равной 0,5 %, и составил 242,8 % ( $p < 0,001$ ) к исходному уровню (таблица 1). Повышение чувствительности мембран лизосом к низким концентрациям неионного детергента свидетельствует об ухудшении связи ферментов с мембраной органелл.

На 14-е сут внепеченочного холестаза (исход стадии компенсации) неседиментируемая активность кислых нуклеаз продолжала снижаться (по сравнению с внепеченочным холестазом 7 дней). Уровень ее был ниже на 33 % для кислой рибонуклеазы и на 72 % кислой дезоксирибонуклеазы по сравнению с предыдущим периодом. Общая активность нуклеаз не претерпевала сколько-нибудь существенных изменений по сравнению с предыдущим сроком внепеченочного холестаза и продолжала удерживаться на заметно повышенном по сравнению с исходным уровне. К концу 2-й недели изучаемой патологии для кислой рибонуклеазы коэффициент седиментации превосходил исходное значение в 1,3 раза ( $p > 0,05$ ). При использовании теста с детергентом при низких его концентрациях уровень неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы колебался в диапазоне 91,4–109,0 % ( $p > 0,05$ ). Кривая неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы стала иметь двухпиковый характер как при хроническом токсическом поражении печени в сроки 20 недель с первым пиком подъема уровня неседиментируемой активности нуклеазы при концентрации тритона X-100, равной 0,05 %, составляя 156 % ( $p < 0,01$ ) от контроля; второй подъем регистрировался при концентрации 0,5 %, составляя 161 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольным уровнем, для которого не был характерен двухпиковый характер динамики активности нуклеазы. В контроле максимальное значение нуклеазы отмечалось при концентрации тритона X-100 — 0,5 %, а все значения неседиментируемой активности превосходили таковые при внепеченочном холестазе сроком 14 дней (исключение отмечено лишь для концентрации 0,05 %, соответствующей первому пику при внепеченочном холестазе).

Проницаемость лизосомальных мембран при 2-недельном внепеченочном холестазе для кислой дезоксирибонуклеазы по сравнению с предыдущим сроком изучаемой патологии продолжала постепенно снижаться, коэффициент седиментации составил 105,7 % ( $p > 0,05$ ) от контроля. На фоне нагрузочного теста по отношению к исходному значению установлено достоверное повышение неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы уже при низких концентрациях детергента (0,01, 0,05 %), максимальное значение достигалось при концентрации тритона X-100 0,1 % (в контроле — 0,2 %), дальнейшее повышение концентраций тритона X-100 приводило к некоторому снижению выхода в супернатант кислой дезоксирибонуклеазы, динамика которой выглядела следующим образом: при концентрации детергента 0,005 — 118,0 % ( $p > 0,05$ ); 0,01 — 168,0 % ( $p < 0,05$ ); 0,05 — 168,0 % ( $p < 0,05$ ); 0,1 — 237,0 % ( $p < 0,05$ ); 0,2 — 218,0 % ( $p < 0,01$ ); 0,5 — 185,0 % ( $p < 0,05$ ) (таблица 2).

Таким образом, к концу 2-й недели внепеченочного холестаза намечалось снижение устойчивости мембран лизосом к повторяющимся воздействиям неионного детергента.

Проведение теста с тритоном X-100 в сроке 36 недель хронического токсического поражения печени сопровождалось дальнейшим ухудшением стабильности мембран лизосом гепатоцитов. Исходный уровень неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы практически не отличался от значения, регистрируемого на этапе 20 недель изучаемой патологии. Регистрировалось достоверное превышение в 1,9 раза над уровнем интактного контроля. Кривая неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы при нарастающих концентрациях неионного детергента сохраняла двухпиковый характер с максимумами выхода фермента в супернатант при концентрациях, равных 0,1 и 0,5 % (соответственно превышение над исходным уровнем произошло в 2,1 раза,  $p < 0,001$  и в 2,9 раза  $p < 0,001$ ). При низких концентрациях тритона X-100 (0,005–0,02 %) неседиментируемая активность кислой рибонуклеазы составляла от 55,2 до 104,8 % по отношению к исходному уровню. При концентрации, равной 0,05 %, уровень активности вырос в 1,7 раза по отношению к исходному значению ( $p < 0,05$ ). На позднем этапе хронического токсического поражения печени имело место сочетание обоих типов нарушений состояния мембран лизосом (повышение проницаемости и повреждаемости мембран органелл и ослабление связи кислой рибонуклеазы с мембраной органелл). Исходный уровень неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы в сроке 36 недель изучаемой патологии характеризовался повторным ростом показателя, превышающим значения, регистрируемые в более ранние ее сроки. По отношению к интактному контролю произошел 5-кратный рост неседиментируемой активности кислой дезоксирибонуклеазы ( $p < 0,001$ ). Проведение теста с детергентом в сроке 36 недель хронического токсического поражения печени выявило максимальную активность кислой дезоксирибонуклеазы при гораздо более низкой концентрации тритона X-100, равной 0,05 %. Превышение над исходным значением при этом произошло более чем в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ). Рост активности нуклеазы по отношению к исходному значению также отмечался при концентрации детергента, равной 0,02 — 157,5 % ( $p < 0,05$ ) и 0,1 — 170,1 % ( $p < 0,01$ ) (таблица 1).

На 21-е сут внепеченочного холестаза (стадия декомпенсации) происходило новое, значительное увеличение неседиментируемой активности кислых нуклеаз: кислой рибонуклеазы — на 40 %, кислой дезоксирибонуклеазы — на 86 %. Отмечалось снижение общей активности для кислой рибонуклеазы — на 68 %, для кислой дезоксирибонуклеазы — на 37 %. В данный период для кислых нуклеаз нарастала лабильность лизосомальных мембран. Коэффициент седиментации превышал контрольный уровень для кислой рибонуклеазы — в 2,6 раза ( $p < 0,01$ ), для кислой дезоксирибонуклеазы — в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ). На протяжении 3-й недели изучаемой патологии увеличение повреждаемости мембран, наблюдавшееся на 14-е сут холестаза, прогрессировало, и к 21-м сут достигало критических величин.

Кривая неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы при нарастающих концентрациях неионного детергента сохраняла двухпиковый характер, как при 2-недельном холестазе с максимумами выхода фермента в супернатант при концентрациях, равных 0,05 и 0,5 %, соответственно составляя 371,0 % ( $p < 0,01$ ) и 251,0 % ( $p < 0,05$ ). При низких концентрациях тритона X-100 (0,005–0,01 %) неседиментируемая активность кислой рибонуклеазы возросла от 173,0 % ( $p > 0,05$ ) до 204,0 % ( $p < 0,01$ ) по отношению к исходному уровню. При концентрации, равной 0,1 %, уровень активности составил 220,0 % ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю.

Максимальный выход кислой дезоксирибонуклеазы в цитозоль клетки отмечался при значительно более низких концентрациях тритона X-100 (0,05 против 0,2 % в контроле), составляя 315 % ( $p < 0,01$ ) по отношению к исходному уровню. При концентрациях 0,1–0,2–0,5 % неседиментируемая активность кислой дезоксирибонуклеазы соответственно составила: 255 % ( $p < 0,01$ ), 281,0 % ( $p < 0,01$ ), 295,0 % ( $p < 0,01$ ) и превосходила контрольный уровень при данных концентрациях детергента (таблица 2).

**Заключение.** Таким образом, в обоих токсикологических экспериментах при проведении нагрузочного теста с неионным детергентом тритоном X-100 продемонстрировано, что состояние лизосомальных мембран в ходе развития хронического токсического поражения печени (вызванного как четыреххлористым углеродом, так и внепеченочным холестазом) носит стадиязависимый характер.

При хроническом токсическом поражении печени наиболее неблагоприятные сдвиги (ухудшение связи нуклеаз с мембраной, повреждение мембран органелл и повышение их проницаемости) выявлялись на начальном этапе изучаемой патологии (6 недель), соответствующем конечному этапу стадии повреждения. При этом чувствительность теста была выше при анализе неседиментируемой активности кислой рибонуклеазы. Относительно благоприятная динамика выявлялась в сроке 10 недель хронического токсического поражения печени, соответствующего стадии устойчивой компенсации. Повторное нарастание негативных изменений со стороны мембран лизосом имело место на завершающем этапе изучаемой патологии (36 недель), соответствующем периоду развития стадии декомпенсации. На позднем этапе данной патологии имело место сочетание обоих типов нарушений состояния мембран лизосом (повышение проницаемости и повреждаемости мембран органелл и ослабление связи кислых нуклеаз с мембраной органелл).

При внепеченочном холестазах в ранние сроки эксперимента (12 ч) отмечается кратковременное заметное снижение повреждаемости мембран органелл с последующим отчетливым повышением степени их повреждения, оцениваемого по уровню прироста неседиментируемой активности изучаемых гидролаз при высоких концентрациях детергента, к исходу первой стадии (3-е сут).

Стадия компенсации (7–14-е сут) характеризуется повышенной устойчивостью мембран органелл к действию тритона X-100, несмотря на продолжающееся действие патогенных факторов на лизосомальную систему клеток печени, что проявляется в начальный период стадии компенсации как снижением повреждаемости и проницаемости мембран лизосом, так и повышением связи изучаемых гидролаз с лизосомальными мембранами. К концу стадии компенсации выявляется снижение устойчивости мембран органелл по отношению к кислой дезоксирибонуклеазе. В стадию истощения резервных возможностей лизосомальной системы (21-е сут) устойчивость мембран к повреждающему воздействию вновь значительно уменьшается как за счет ослабления связи нуклеаз с мембраной лизосом, так и за счет повышенной проницаемости и повреждаемости мембран органелл, выраженных в большей степени, чем в стадию повреждения (12 ч – 3-е сут).

Такого рода изменение устойчивости лизосомальных мембран к повреждающим воздействиям при токсическом поражении печени, вызванном четыреххлористым углеродом, и внепеченочном холестазах косвенно свидетельствует о структурных перестройках неоднородной системы лизосом. Высокая устойчивость лизосомальных мембран к повреждающим воздействиям, превосходящая таковую у контрольных животных, говорит о смене популяции лизосом и преобладании в ней, по-видимому, первичных форм, отличающихся по свойствам от лизосом в нормально функционирующих клетках печени. Установленное в стадию декомпенсации значительное снижение устойчивости мембран лизосом, возможно, связано с преобладанием в популяции лизосом вторичных форм, обладающих более хрупкой, легко повреждаемой мембраной.

Проведение теста с нарастающими концентрациями тритона X-100 при изучаемых формах патологии с оценкой активности кислых нуклеаз лизосом позволило установить универсальность теста, получить более точные представления о состоянии лизосомальных мембран на разных этапах развития токсических поражений печени, объективизировать данные и получить косвенное представление о возможных структурных перестройках и субпопуляционных сдвигах неоднородной по своей структуре лизосомальной системы.

Выявленная закономерность изменения состояния лизосомальных мембран при токсических поражениях печени, вызванных разными факторами, при использовании теста с нарастающими концентрациями тритона X-100, может быть использована в качестве установления ранних предикторов развития декомпенсации (снижение устойчивости лизосомальных мембран к повреждающим агентам) при изучении токсических воздействий различной природы на организм при токсикологическом эксперименте, а также при решении вопроса о выборе корректирующих лечебных мероприятий с точки зрения решения вопроса об их эффективности и целесообразности.

#### Литература

1. Саркисов, Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза / Д. С. Саркисов. — М. : Медицина, 1977. — 351 с.
2. Хронические поражения печени холестатической и токсической природы (патогенетические аспекты) / А. А. Кривчик [и др.]. — Минск : БГМУ, 2004. — 183 с.
3. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. — Минск : Выш. школа, 1973. — 320 с.

## THE OBJECTIVIZATION OF THE CONDITION OF LYSOSOMAL MEMBRANES OF HEPATOCYTES WITH USING OF THE LOADING TEST IN PRACTICE OF TOXICOLOGICAL EXPERIMENT

Zinovkina V. U.<sup>1</sup>, Glinskaya T. N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Republican Unitary Enterprise "The Scientific and Practical Center of Hygiene", Minsk, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>State Institution "The Scientific and Practical Center of Blood Transfusion and Medical Biotechnology", Minsk, Republic of Belarus

In order to identify early signs of decompensation in toxic liver damage (chronic toxic liver damage caused by carbon tetrachloride, and extrahepatic cholestasis) during the toxicological experiment, the dynamics of the non-sedimented acid nuclease activity in the liver tissue was studied with the help of the test with the increasing concentrations of non-ionic detergent.

It was established that the test with the increasing concentrations of Triton X-100 allows us to objectively assess the sensitivity of lysosomal membranes to these effects due to the demonstration of the extent of the association of acid nucleases with the organelles' membrane. The universal early predictors of decompensation in case of chronic toxic liver damage were revealed at the sub cellular level. Comparative evaluation of test results at

different stages of a toxicological experiment indicates a unidirectional, stage-dependent character of changes of the lysosomal membranes in both forms of models of the pathology.

Поступила 10.07.2018