

Известно, что вегетативные формы микобактерий туберкулеза возникают не только в результате их деления, но и путем развития из зерен. Поэтому, увеличение количества микобактерий туберкулеза в сроки микрокультивирования, свидетельствует об их усиленном размножении на поверхностях парафиновых дисков. Исследование развития различных форм микобактерий туберкулеза помогает изучению условий, от которых зависит количественные и качественные изменения этих форм. Учитывая количественные и качественные соотношения различных форм микобактерий туберкулеза в патологических материалах от животных, можно судить об иммунном состоянии организма.

Из применявшихся трех методов микробиологического исследования наиболее эффективным методом микробиологического исследования всех морфологических форм туберкулезных очагов является метод микрокультур, позволяющий: 1) в большом проценте случаев обнаружить микобактерии туберкулеза; 2) определить степень контаминирования ими исследуемых биоматериалов; 3) изучить морфологические, тинкториальные свойства микобактерий туберкулеза в различные сроки культивирования.

В то же время четко выраженной зависимости явлений их изменчивости от морфологии очагов (обызвествленные, казеозно-обызвествленные и казеозные) нами не установлено.

Литература: 1. Модель Л.М. Биология и биохимия микобактерий, М., 1952. 2. Хайкин Б.Я. Лабораторная диагностика туберкулеза / Б.Я. Хайкин, Н.М. Колычев, Н.С. Боганец // Рекомендации. – Омск, 1988. – 65 с

ВЛИЯНИЕ ЛЕЙКОВОРИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ CCl_4

Сутько И.П., Мельниченко Н.Г., Зверинский И.В., Институт биохимии НАН Беларуси, Гродно

Печень вовлечена во многие патологические процессы, и ее повреждения вызывают серьезные нарушения метаболизма, иммунного ответа и детоксикации. Печень относится к органам, способным к регенерации после повреждений, благодаря клеточной кооперации, наличию молекулярных механизмов реакции острой фазы и синтезу ряда веществ протекторной природы. Наиболее часто повреждения печени реализуются через химические и иммунологические механизмы [16].

Исследования репаративной способности печени после введения CCl_4 с различными сроками введения показали, что при разных вариантах схемы эксперимента резкий подъем числа гепатоцитов, интенсивно синтезирующих ДНК, происходит всегда на 2-е сутки после очередной инъекции CCl_4 , а точнее через 24-36 часов после введения [10, 11]. Подъем интенсивности синтеза ДНК происходит в сохранившихся печеночных клетках и представляет собой их компенсаторную реакцию в ответ на дистрофические и некротические изменения печеночной ткани, возникающие под влиянием CCl_4 [8]. Ранее этого начинает компенсаторно усиливаться синтез РНК. Интенсивный синтез ДНК и РНК обеспечивает в этих условиях деление гепатоцитов, т.е. клеточную (тканевую) регенерацию [10, 11]. Такие процессы ведут к повышенной утилизации коферментных форм фолиевой кислоты, участвующей в синтезе ДНК и РНК [19].

К ранним нарушениям при тетрахлорметановом поражении печени относится ингибирование ферментных систем, структурно и функционально связанных с мембранами эндоплазматического ретикулума, в частности - ингибирование цитохром Р450 - содержащих монооксигеназ [3]. Эти нарушения связывают, как с липидной дезорганизацией мембран эндоплазматического ретикулума, нарушением молекулярной организации систем в них, так и с инактивацией самого цитохрома Р450 [21]. Учитывая важную роль фолиевой кислоты в реакциях синтеза предшественников нуклеиновых кислот, белка и в обмене фосфолипидов [1, 12, 13], способность витамина ускорять процессы регенерации, а также повышать каталитическую активность микросомальных монооксигеназ [4, 18], представлялось целесообразным изучить влияние коферментной формы фолиевой кислоты - 5-формилтетрагидрофолата (лейковорина) на функциональное состояние печени крыс при интоксикации CCl_4 .

Целью эксперимента было исследовать функциональное состояние печени крыс после 2-х месячного введения тетрахлорметана, а также способность лейковорина "защищать" печень от токсического действия CCl_4 .

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на 34 крысах-самцах породы Wistar начальной массой 145-165 гр. Животные были разбиты на две опытные группы. Животным из первой группы вводили тетрахлорметан 2 раза в неделю с интервалом 48 часов, в виде 30% раствора на оливковом масле, внутривнутрибрюшинно, в дозе 1 мг/кг (n=12). Второй группе также вводили тетрахлорметан по той же схеме, как и первой группе, а через 6 и 24 часов после CCl_4 вводили лейковорин в дозе 17.5 мг/кг, внутривнутрибрюшинно (n=10). Контрольной группе назначали оливковое масло и физиологический раствор в объемах эквивалентных при введении тетрахлорметана и лейковорина (n=12). Через 8 недель после начала эксперимента животных декапитировали. Производили забор крови. Вскрывали брюшную полость, печень промывали 1.15% раствором KCl. Методом дифференциального центрифугирования, выделяли мик-

росомальную и цитозольную фракции печени крыс [6]. Далее фракции замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

В крови определяли активность АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы, глутамилтранспептидазы, содержание альбумина, восстановленного глутатиона, средних молекул. В микросомальной фракции печени крыс исследовали содержание общего пула цитохромов P450 и b5, а также скорость окисления NADH и NADPH, активность NADH- и NADPH- феррицианид редуктаз и NADH- и NADPH-цитохром C редуктаз по методам описанным ранее [2, 7]. Активность дигидрофолат редуктазы определяли в цитозольной фракции печени по скорости убыли NADPH в присутствии дигидрофолиевой кислоты [20]. Содержание белка определяли по методу Lowry [17]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Полученные результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка.

Результаты и их обсуждение. Показано, что введении тетрахлорметана на протяжении двух месяцев два раза в неделю с интервалом 48 часов в дозе 1 мг/кг приводит к увеличению содержания АлАТ в 8 раз и АсАТ в два раза (таблица). Наблюдается рост активности щелочной фосфатазы и глутамилтранспептидазы в сравнении с интактными животными на 23 и 88% (соответственно). Зарегистрировано увеличение образования тимол-липидного комплекса (тимоловая проба) и содержания средних молекул на 79 и 56% ($p < 0.05$). Наблюдается незначительное, но статистически достоверное падение содержания альбумина в сыворотке крови на 17%. В микросомальной фракции печени крыс в первой опытной группе установлено резкое снижение содержания общего пула цитохромов P450 и b5 в 5 и 2 раза соответственно. Отмечается падения скорости утилизации NADPH и NADH, а также снижение активности NADPH-феррицианид редуктазы на 39, 31 и 24% соответственно. В цитозольной фракции печени крыс в первой группе зарегистрировано снижение активности глутатион редуктазы и дигидрофолат редуктазы на 18 и 24% ($p < 0.05$). Остальные исследуемые показатели были на уровне контрольной группы.

Назначение лейковорина в дозе 17,5 мг/кг через 6 и 24 часа введения тетрахлорметана (II группа) нормализует синтетическую функцию печени (содержание альбумина) и отчасти стабилизирует мембрану гепатоцитов, в частности активность АлАТ снижается в два раза в сравнении с нелечеными животными. Следует отметить, что уровень средних молекул после назначения лейковорина был на уровне контрольной группы. Ряд авторов отмечают, что в процессе эффективной терапии снижается уровень средних молекул опережает период устранения клинических признаков заболевания. В микросомальной фракции печени показано увеличение содержания цитохрома P450 на 78% в сравнении с I группой, наблюдается нормализация скорости окисления NADPH и NADH. Активность глутатион редуктазы и дигидрофолат редуктазы были на уровне контрольной группы (таблица).

Мы полагаем, что эффект лейковорина в первую очередь реализуется через усиление процессов метилирования. Для восстановления формильной группы лейковорина до метильной требуется два метаболических "шага": $\text{CHO} \leftrightarrow \text{CH}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CH}_3$ [1, 14, 23]. Согласно современным представлениям о метаболизме и транспорте одноуглеродных единиц, 5-метилтетрагидрофолат имеет только один метаболический путь – превращение в тетрагидрофолат, при котором происходит метилирование гомоцистеина, с образованием метионина [1, 14]. Активация процессов метилирования по-видимому способна стимулировать синтез ненасыщенных жирных кислот, что несомненно будет способствовать стабилизации клеточных мембран гепатоцитов при отравлении CCl_4 [15]. Ранее нами было показано, что назначение лейковорина здоровых животных приводит к увеличению содержания ненасыщенных жирных кислот, как в крови, так и в микросомальной фракции печени крыс [5, 25].

С другой стороны, положительный эффект лейковорина на функцию печени при тетрахлорметановом поражении может реализовываться и через метилирование мРНК, что защищает рибонуклеиновую кислоту от действия РНК-нуклеаз. Ряд авторов полагает, что метилирование мРНК один из основных механизмов адаптации клеток печени в период ее компенсаторной регенерации [16, 24].

Также одним из механизмов гепатозащитного действия лейковорина при интоксикации CCl_4 может быть предупреждение снижения активности дигидрофолат редуктазы [22].

Тетрахлорметановое поражение печени всегда сопровождается увеличением интенсивности перекисного окисления липидов [3]. В ряде работ показано, что фолиевая кислота и ее восстановленные коферментные формы обладают антиоксидантными свойствами [9]. Можно предположить, что лейковорин может быть "ловушкой" для свободных радикалов.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали, что лейковорин (5-формилтетрагидрофолиевая кислота) обладает гепатопротекторным эффектом при хронической тетрахлорметановой интоксикации, что по-видимому связано, как с интенсификацией процессов метилирования, стабилизацией дигидрофолат редуктазы, так и с его антиоксидантными свойствами.