

Влияние тиоктовой кислоты на оксидативный статус тканей крыс при хронической алкогольной интоксикации*

САФОНОВА О.А.

ПОПОВА Т.Н.

СЕМЕНИХИНА А.В.

ИСКУСНЫХ И.Ю.

СВИРИДОВ М.М.

к.б.н., ассистент, Воронежский государственный университет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии

д.б.н., зав. кафедрой, Воронежский государственный университет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии

к.б.н., доцент, Воронежский государственный университет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии

студент, Воронежский государственный университет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии

к.б.н., ассистент, Воронежский государственный университет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии

Осуществлена оценка интенсивности свободнорадикального окисления путем определения содержания продуктов липопероксидации, параметров биохемилюминесценции, активности аконитатгидратазы, исследования степени фрагментации ДНК, а также активности антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы — в печени, сердце и сыворотке крови крыс при действии тиоктовой кислоты на фоне хронической алкогольной интоксикации. Выявлены торможение свободнорадикальных процессов и изменение активности супероксиддисмутазы и каталазы в тканях крыс при введении тиоктовой кислоты по сравнению с уровнем при патологии в сторону контрольных значений. Полученные данные могут быть объяснены антиоксидантными свойствами тиоктовой кислоты и ее позитивным влиянием на обменные процессы.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, тиоктовая кислота, свободнорадикальное окисление, супероксиддисмутаза, каталаза

Введение

Согласно исследованиям ряда авторов, в патогенезе алкогольного поражения тканей важная роль принадлежит интенсификации свободнорадикальных процессов, которая может быть результатом как метаболизма этанола, так и токсического действия ацетальдегида [11—13, 16]. Исследование протекания процессов свободнорадикального окисления (СРО) и функционирования антиоксидантной системы при алкогольном поражении печени и сердца, а также возможности применения при хронической алкогольной интоксикации в качестве кардио- и гепатопротекторов веществ с антиоксидантными свойствами может стать основой для получения новых сведений о путях коррекции нарушений обмена веществ и целенаправленной разработки медицинских методов терапии и профилактики этого заболевания. В связи с этим представляют интерес данные о возможном участии в регуляции уровня активных форм кислорода (АФК) тиоктовой кислоты (ТК), обладающей антиоксидантными свойствами и способной влиять на интенсивность углеводного и липидного метаболизма. Поскольку основная роль тиоктовой кислоты заключается в ее участии в качестве кофактора в окислительном декарбоксилировании пирувата и 2-оксоглутарата в митохондриальном матриксе, то

она играет существенную роль в энергетическом метаболизме клетки. Данное соединение обладает положительным липотропным действием, облегчая перенос ацетата и жирных кислот из цитозоля в митохондриальный матрикс для последующего окисления. Это приводит к уменьшению выраженности жировой дистрофии гепатоцитов, сопровождающейся активацией метаболической функции печени и желчеотделения. Антиоксидантный эффект тиоктовой кислоты обусловлен наличием двух тиоловых групп в молекуле и способностью связывать радикалы и свободное железо, а также участвовать в регенерации таких низкомолекулярных антиоксидантов, как глутатион и α -токоферол [9, 17, 18].

В связи с вышесказанным была осуществлена оценка интенсивности СРО и активности антиоксидантных ферментов — СОД и каталазы, в печени, сердце и сыворотке крови крыс в норме, при хронической алкогольной интоксикации и действии тиоктовой кислоты.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали белых лабораторных крыс-самцов массой 150—200 г. В ходе эксперимента животные были разделены на 3 экспериментальные группы: в 1-й группе (n=19) жи-

* Работа поддержана финансированием по Программе «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.4429 и грантом РФГФ 07-06-56605-а/Ц

вотных содержали на стандартном режиме вивария; 2-ю группу ($n=12$) составляли животные с хронической алкогольной интоксикацией, которую создавали путем добавления к стандартному рациону 15% этанола регулярно в течение месяца [1]; в 3-й группе ($n=9$) животным с 14-го дня развития хронической алкогольной интоксикации внутрибрюшинно вводили тиоктовую кислоту в дозе 35 мг на 1 кг каждые 48 ч в течение последующих 14 дней. Материал для исследования забирали через 28 дней после начала алкоголизации.

Для получения сыворотки использовали венозную кровь. При получении гомогенатов тканей навески печени и сердца крысы гомогенизировали в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% б-меркаптоэтанол) и центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Полученный материал использовали для дальнейших исследований.

Содержание продуктов перексидного окисления липидов (ПОЛ) — диеновых конъюгатов (ДК) — определяли на СФ-56 при 233 нм [8].

Для определения интенсивности свободнорадикальных процессов и общей антиоксидантной активности применяли также метод индуцированной перексидом водорода с сульфатом железа биохемилюминесценции (БХЛ) с помощью биохемилюминометра БХЛ-06М с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки ($I_{\max}$), характеризующие интенсивность СРО, и величину тангенса угла наклона кривой ($\operatorname{tg} \alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность [3].

Для оценки степени фрагментации ДНК использовали метод электрофореза в агарозном геле. ДНК выделяли фенол-хлороформным методом. Для окрашивания ДНК использовали бромистый этидий [4].

Активность аконитатгидратазы (аконитаза, КФ 4.2.1.3; АГ) определяли на спектрофотометре СФ-56 при 235 нм в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), 4 мМ цитрат. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6.) определяли спектрофотометрически при 410 нм по качественной реакции H_2O_2 с молибдатом аммония [2]. За единицу активности (E) АГ и каталазы принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкМ субстрата в 1 мин при 25°C. Активность СОД (КФ 1.15.1.1.) определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН спектрофотометрическим методом при 540 нм [5]. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ного ингибирования восстановления НСТ.

Содержание общего белка определяли по методу Лоури [14]. Данные обрабатывали с использованием t -критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно ранее полученным нами результатам, в тканях крыс при развитии хронической алкогольной интоксикации происходила интенсификация процессов СРО, что проявлялось в повышении параметров БХЛ — S и $I_{\max}$ [7], а также изменении активности АГ — критической мишени действия АФК [7]. В данной работе выявлены выраженная фрагментация ДНК (рис. 3) и повышение содержания ДК (рис. 1) в тканях крыс в патологическом состоянии. Введение тиоктовой кислоты экспериментальным животным приводило к существенному изменению исследуемых параметров.

При развитии хронической алкогольной интоксикации уровень первичных продуктов ПОЛ — диеновых

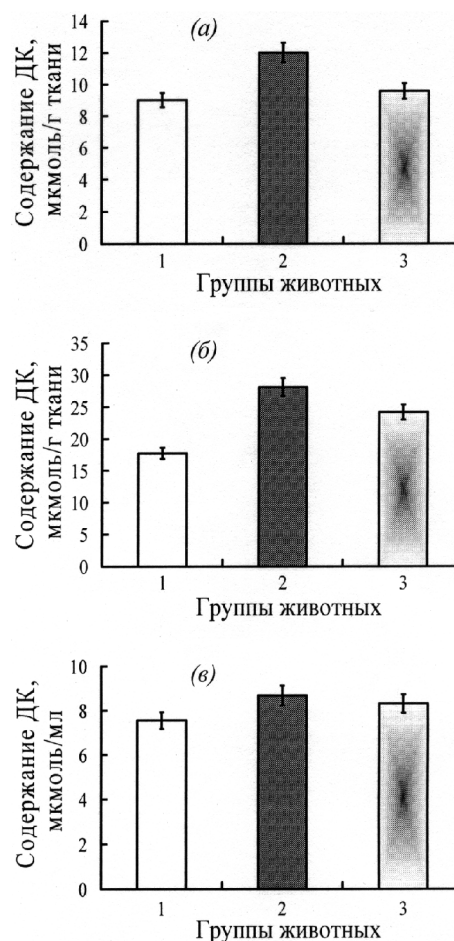


Рис. 1. Содержание диеновых конъюгатов: а — в печени; б — сердце; в — сыворотке крови крыс в условиях: 1 — нормы; 2 — при алкогольной интоксикации; 3 — при действии тиоктовой кислоты на фоне развития патологического процесса

конъюгатов в печени, сердце и сыворотке крови крыс возрастал соответственно на 33, 59, 15% по сравнению с интактными животными, что свидетельствовало об увеличении интенсивности СРО (рис. 1). При введении тиоктовой кислоты животным, получавшим этанол, наблюдалось снижение содержания ДК в тканях печени и сердца на 27 и 22% по сравнению со значениями при патологии. Тенденция к снижению уровня ДК имела место и в сыворотке крови крыс (рис. 1).

Значения $I_{\max}$ БХЛ, повышающиеся при патологии [7], под действием ТК снижались в печени и сердце в 1,2 раза, в сыворотке крови — в 1,4 раза по сравнению со значениями при хронической алкогольной интоксикации. Однако введение протектора не приводило к значительным изменениям таких показателей БХЛ, как S и $tg\alpha_2$.

В некоторых работах отмечается, что в качестве чувствительной и критической мишени действия АФК в условиях окислительного стресса можно рассматривать АГ (КФ 4.2.1.3), при разрушении Fe-S-кластера которой супероксидным анион-радикалом наблюдается подавление активности данного фермента [10, 15]. При исследовании активности аконитазы в условиях хронической алкогольной интоксикации нами были выявлены тканеспецифичные изменения: активность фермента в сердце и сыворотке крови крыс при патологии снижалась, в печени — увеличивалась. Возрастание активности АГ в печени, вероятно, связано с особенностями метаболизма данного органа при развитии алкогольной интоксикации, в ходе которого в больших количествах образуется ацетил-КоА [7]. Введение ТК животным при-

водило к изменению активности АГ в сторону контрольных значений. Так, под действием данного соединения активность фермента, выраженная в Е/г сырой массы, в сердце и сыворотке крови возрастала в 1,2 и 1,9 раза, в печени снижалась в 1,7 раза по сравнению со значениями при патологии (рис. 2). При выражении активности АГ в расчете Е на 1 мг белка также было выявлено изменение в сторону контрольных значений после введения протектора крысам с алкогольной интоксикацией.

Полученные данные об изменениях содержания ДК, интенсивности максимальной вспышки БХЛ и активности АГ при действии ТК на фоне хронической алкогольной интоксикации соотносятся с результатами оценки фрагментации ДНК в тканях печени и сердца экспериментальных животных. Выявлено, что ДНК образцов тканей крыс с патологией фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб. Фрагменты ДНК из печени и сердца крыс, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации, образуют характерную «апоптотическую лестницу». При исследовании образцов тканей крыс, которым вводили тиоктовую кислоту на фоне патологии, установлено, что степень фрагментации ДНК менее выражена по сравнению с ДНК образцов при алкогольной интоксикации (рис. 3).

Таким образом, основываясь на результатах исследований содержания ДК, интенсивности максимальной вспышки биохемилюминесценции, активности АГ, а также степени фрагментации ДНК, можно сделать вывод о снижении интенсивности свободнорадикаль-

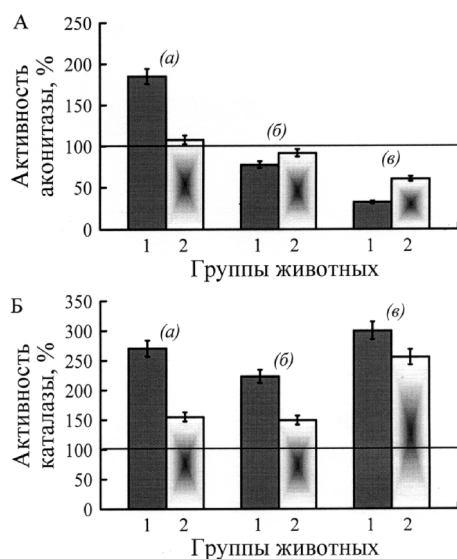


Рис. 2. Активность: А — аконитазы; Б — каталазы, выраженная в процентах от Е на грамм сырой массы: а — печени; б — сердца; в — Е на мл сыворотки крови при: 1 — хронической алкогольной интоксикации крыс; 2 — действию тиоктовой кислоты на фоне развития патологии;

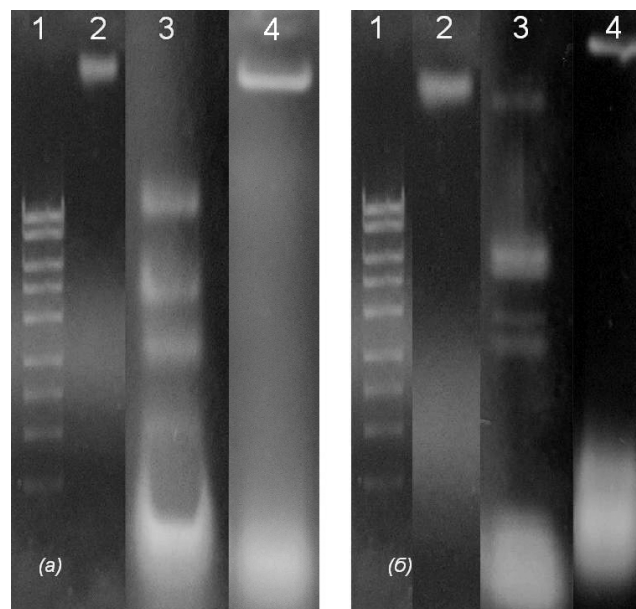


Рис. 3. Фрагментация ДНК: а — из печени; б — сердца крыс: 1 — маркеры; 2 — животные контрольной группы; 3 — крысы с хронической алкогольной интоксикацией; 4 — животные с патологией, которым вводили тиоктовую кислоту

ных процессов при введении экспериментальным животным тиоктовой кислоты.

Показано, что в печени и сыворотке крови крыс с хронической алкогольной интоксикацией активность СОД, выраженная в виде Е/мг белка, возрастает в 1,7 и 1,5 раза соответственно по сравнению с нормой (рис. 4). Результаты исследований могут являться свидетельством мобилизации антиоксидантной системы организма, направленной на снижение уровня свободнорадикальных процессов, в условиях усиления их интенсивности вследствие действия этанола и продуктов его превращения. В связи с этим возрастание активности СОД имеет важное адаптивное значение. В то же время было выявлено снижение активности СОД в сердце животных с алкогольной интоксикацией в 1,3 раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 4), что, возможно, является следствием истощения компенсаторных возможностей кардиомиоцитов и наступления стадии декомпенсации.

При введении ТК животным с хронической алкогольной интоксикацией активность СОД в печени и сыворотке крови крыс снижалась в 1,4 и 1,1 раза, в

сердце — увеличивалась в 1,2 раза по сравнению со значениями при патологии, т.е. было выявлено изменение активности в сторону нормы (рис. 4). Полученные результаты могут быть следствием проявления тиоктовой кислотой ее способности снижать интенсивность свободнорадикальных процессов.

Ранее нами было показано повышение активности каталазы в тканях крыс при алкогольной интоксикации по сравнению с нормальными значениями, что может иметь важное адаптивное значение как для ускорения процессов окисления алкоголя при его высоких концентрациях, так и для обезвреживания пероксидов, концентрация которых может при этом резко возрастать [6]. При введении ТК было выявлено снижение активности каталазы, рассчитанной в Е/г сырой массы, в печени и сердце в 1,8 и 1,5 раза соответственно, в сыворотке крови, выраженной в Е/мл, — в 1,1 раза по сравнению со значениями при патологии (рис. 2). При представлении данных в виде удельной активности также было выявлено приближение исследуемых параметров к нормальным величинам после введения тиоктовой кислоты экспериментальным животным. Полученные данные могут быть объяснены с точки зрения нормализации обменных процессов при введении ТК и проявления данным соединением антиоксидантных свойств, вследствие чего снижается нагрузка на ферментативную антиоксидантную систему.

Заключение

Таким образом, при введении тиоктовой кислоты животным с алкогольной интоксикацией в большинстве случаев было отмечено изменение исследуемых параметров в сторону нормы. Так, было выявлено изменение содержания диеновых конъюгатов, интенсивности максимальной вспышки биохилюминесценции, активности АГ, степени фрагментации ДНК, активности СОД и каталазы по сравнению со значениями при патологии. Полученные данные могут быть объяснены с точки зрения антиоксидантных свойств данного соединения, проявляющихся, в частности, благодаря наличию сульфгидрильных групп, способных принимать участие в перехвате свободных радикалов и в регенерации некоторых низкомолекулярных антиоксидантов (глутатиона, α -токоферола), вследствие чего снижается нагрузка на ферментативную антиоксидантную систему [9, 17]. Кроме этого, тиоктовая кислота, являясь коферментом пируватдегидрогеназного и 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплексов [18], может активировать их работу, что приводит к интенсификации аэробного пути окисления органических соединений, в частности превращения ацетил-КоА — продукта метаболизма алкоголя в печени, по пути цикла Кребса. При этом снижается использование ацетил-КоА в процессе биосинтеза жирных кислот, усиление которого приводит к жи-

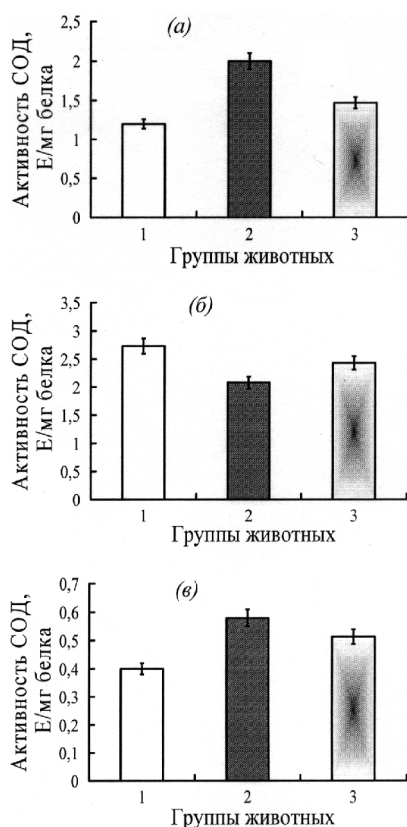


Рис. 4. Активность супероксиддисмутазы: а — в печени; б — сердце; в — сыворотке крови крыс в условиях: 1 — нормы; 2 — при алкогольной интоксикации; 3 — действии тиоктовой кислоты на фоне развития патологического процесса

вому перерождению печени. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования тиоктовой кислоты для коррекции нарушений метаболических процессов при алкогольном поражении тканей.

Список литературы

1. Бардина Л.Р., Сатановская В.И. Метаболическая адаптация к алкоголю у крыс, различающихся по предпочтению этанола воде // Вопросы медицинской химии. — 1999. — №2. (<http://medi.ru/pbmc/8890203.htm>).
2. Бузлама В.С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных. — Воронеж, 1997. — 35 с.
3. Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А. и др. Влияние витамина D₃ и эрдистерона на свободнорадикальное окисление липидов // Биохимия. — 1997. — Т. 62, №6. — С. 712—715.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — С. 194—198.
5. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении // Лаб. дело. — 1991. — №7. — С. 16—19.
6. Попова Т.Н., Рахманова Т.И., Сафонова О.А. Активность систем детоксикации пероксидов в тканях крыс при алкогольной интоксикации // Наркология. — 2008. — №2. — С. 32—35.
7. Попова Т.Н., Семенихина А.В., Сафонова О.А. и др. Оксидативный статус, содержание цитрата и активность аконитатгидратазы в тканях крыс при хронической алкогольной интоксикации // Наркология. — 2008. — №5. — С. 34—37.
8. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы

в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1972. — С. 63—64.

9. Щербак А.В. Метаболическая терапия: доказуемые перспективы, оправдавшиеся надежды // Здоровье Украины. — 2002. — №10. — С. 37—59.

10. Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1994. — Vol. 91, №25. — P. 12248—12252.

11. Kera Y., Ohbora Y., Komura S. The metabolism of acetaldehyde and not acetaldehyde itself is responsible for in vivo ethanol-induced lipid peroxidation in rats // Biochem. Pharmacol. — 1988. — Vol. 37, №19. — P. 3633—3638.

12. Koch O.R., Galeotti T., Bartoli G.M. et al. Alcohol-induced oxidative stress // J. Xenobiotica. — 1991. — №8. — P. 1077—1084.

13. Kurose I., Higuchi H., Kato S. et al. Ethanol-induced oxidative stress in the liver // Alcohol: Clinical and Experimental Research. — 1996. — Vol. 20, Suppl. 1. — P. 77A—85A.

14. Lowry O.H., Rosebrought N., Farr A. et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 194. — P. 265—271.

15. Murakami K., Yoshino M. Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1997. — Vol. 41, №3. — P. 481—486.

16. Nordmann R., Ribiere C., Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury // Free Radic. Biol. Med. — 1992. — №12. — P. 219—240.

17. Rosenburg H.R., Culik R. Effects of α-lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — Vol. 80. — P. 86—93.

18. Trent W.N. α-Lipoic acid: biological effects and clinical implications // Alternative Medicine Review. — 1997. — Vol. 2, №3. — P. 177—183.

THIOCTIC ACID INFLUENCE ON RATS TISSUES OXIDATIVE STATUS UNDER CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

SAFONOVA O.A., POPOVA T.N., SEMENIKHINA A.V., ISKUSNYKH I.Y., SVIRIDOV M.M.

Voronezh State University, Department of Medical Biochemistry and Microbiology

The estimation of free-radical oxidation intensity (by determination of lipoperoxidation products content, biochemiluminescence parameters, aconitate hydratase activity, investigation of DNA fragmentation degree) and activity of antioxidant enzymes — superoxide dismutase and catalase — in rats liver, heart and blood serum at thioctic acid action under chronic alcohol intoxication has been realized. Free-radical processes inhibition and superoxide dismutase and catalase activities changes in rats tissues under thioctic acid introduction concerning level at pathology to the side of norm have been revealed. Obtained data may be caused by thioctic acid antioxidant properties and positive influence on metabolic processes.