

Активность систем детоксикации пероксидов в тканях крыс при алкогольной интоксикации*

ПОПОВА Т.Н.

д.б.н., зав. кафедрой, Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии

РАХМАНОВА Т.И.

к.б.н., ассистент, Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии

САФОНОВА О.А.

к.б.н., ассистент, Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии

Проведено исследование активности глутатионовой антиоксидантной системы и каталазы в печени, сердце и сыворотке крови крыс при хронической алкогольной интоксикации. Установлено, что на фоне данной патологии наблюдается снижение уровня восстановленного глутатиона в печени, сердце и сыворотке крови крыс в 1,8, 4,8 и 4,5 раза соответственно относительно контроля. При алкогольной интоксикации происходит также снижение активности селеновой глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в тканях крыс. Активность каталазы в тканях животных в данных условиях возрастает. Изменение активности исследованных систем может быть следствием влияния алкоголя и продуктов его трансформации на ход метаболических процессов, в частности усиления свободнорадикального окисления биомолекул.

Введение

Одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем в настоящее время является алкоголизм, что вызывает необходимость проведения широкого круга научных исследований для целенаправленной разработки методов профилактики и терапии этого заболевания. Несмотря на большое число работ, посвященных изучению биохимических сдвигов в организме при алкогольной интоксикации, многое остается невыясненным. Особую актуальность приобрел вопрос о способности этанола и его производных индуцировать свободнорадикальное окисление (СРО), что может сопровождаться изменением активности компонентов антиоксидантной системы. Так, имеются сведения, что при алкогольном поражении в тканях млекопитающих, в первую очередь в печени, происходит индукция пероксидного окисления липидов (ПОЛ) [4,7]. Известно, что в превращениях продукта метаболизма этанола — ацетальдегида — принимают участие ксантинооксидаза и альдегидоксидаза, продуцирующие $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 , способные инициировать СРО важнейших биомолекул [6]. Образование активных форм кислорода может также быть следствием нарушения функционирования компонентов электронтранспортной цепи митохондрий при увеличении отношения НАДН/НАД⁺. Необходимо отметить, что наряду с поражением печени среди метаалкогольных заболеваний ведущее место по смертности и инвалидизации больных занимает алкогольная кардиомиопатия. В связи с вышесказанным

представляет интерес оценка активности систем детоксикации пероксидов в тканях млекопитающих при алкоголизме. Целью данной работы было исследование активности глутатионовой антиоксидантной системы и каталазы в печени, сердце и сыворотке крови крыс в условиях алкогольной интоксикации.

Материалы и методы

Объектом исследования служили самцы белых крыс массой 150—200 г. Животные были разделены на группы: в 1-й группе (контроль; n=18) животных содержали на стандартном режиме вивария; животные 2-й группы (n=14) для создания модели хронической алкогольной интоксикации в добавление к стандартному рациону регулярно получали 15%-ный этанол в течение месяца [1]. Для получения сыворотки использовали венозную кровь.

При получении гомогенатов навески печени и сердца крысы гомогенизировали в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащие 1 мМ ЭДТА, 1%-ный β-меркаптоэтанол), и центрифугировали при 7000 г в течение 10 мин.

Активность ферментов определяли на СФ-56. За ферментативную единицу (Ед.) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкМ субстрата за 1 мин при 25°C. Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли при 340 нм в среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер

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

(рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ окисленного глутатиона (GSSG). Активность глутатионпероксидазы (ГП) измеряли при 340 нм в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ восстановленного глутатиона (GSH), 0,37 мМ H_2O_2 , 1 Ед./мл ГР. Активность каталазы определяли при 410 нм по качественной реакции H_2O_2 с молибдатом аммония [2]. Концентрацию GSH определяли с помощью реакции с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой [2]. Содержание общего белка определяли по методу Лоури [8]. Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что на фоне хронической алкогольной интоксикации наблюдается снижение уровня GSH в печени, сердце и сыворотке крови крыс в 1,8, 4,8 и 4,5 раза соответственно относительно контроля (рис. 1). По данным литературы, употребление этанола вызывает снижение содержания GSH на 95% в тканях легких и плазме пациентов с хронической алкогольной интоксикацией, что увеличивает риск возникновения острой респираторной недостаточности [5]. Уменьшение содержания GSH, вероятно, связано с тем, что образующийся в ходе метаболизма этанола ацетальдегид способен реагировать с SH-группами белков, ферментов и других соединений, в том числе с SH-группами глутатиона, в результате чего последний подвергается окислению. Кроме того, согласно данным литературы, для обеспечения необходимых условий метаболизма этанола важное значение имеет поддержание высокой скорости обмена коэнзима А (КоА) вследствие активизации «цистеин-глутатионового» оборота при посредничестве γ -глутамилтрансферазы в условиях злоупотребления алкоголем [3]. Вероятно, при хронической алкогольной интоксикации включается механизм адаптационно-регуляторного характера, направленный на синтез цистеина из GSH. При этом цистеин не только является предшественником КоА, но может оказывать сдерживающее влияние на жировую инфильтрацию печени.

Глутатион необходим организму не только для восстановления реакционной способности SH-групп многих белков, КоА, но и для функционирования ферментов глутатионзависимой антиоксидантной системы защиты от ПОЛ. В ходе проведенных нами исследований установлено, что при алкогольной интоксикации происходит снижение активности селеновой ГП и ГР в тканях крыс (рис. 2, 3). Так, активность ГП, выраженная в Ед./г сырой массы, уменьшается в сердце и печени крыс в 2,2 и 1,8 раза соответственно по сравне-

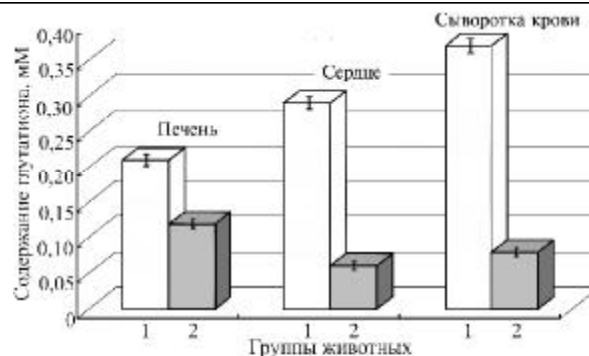


Рис. 1. Содержание восстановленного глутатиона в печени, сердце и сыворотке крови крыс группы 1 – в норме и группы 2 – при хронической алкогольной интоксикации

нию с нормой. Активность ГР, выраженная в Ед./г сырой массы, в печени снижается в 2,5 раза, однако в сердце практически не отличается от контрольного уровня. Уменьшается также активность ГП и ГР в сыворотке крови крыс, выраженная в Ед./мл, в 2,8 и 1,6 раза соответственно по сравнению с контролем. При этом удельная активность ферментов во всех тканях крыс снижается в большей степени, что может быть связано с увеличением содержания белка при развитии патологии. Полученные нами результаты по возрастанию уровня белка в исследуемых пробах могут быть объяснены усилением синтеза белков теплового шока — шаперонов — при окислительном стрессе [11]. Так, удельная активность ГП в сердце, печени и сыворотке крови крыс при хронической алкогольной интоксикации уменьшается относительно нормальных значений в 13,0, 4,1 и 5,8 раза соответственно. Удельная активность ГР в печени экспериментальных крыс снижается в 18,8 раза, в сыворотке крови — в 3,2 раза и сердце — на 10% относительно контроля. По-видимому, снижение функциональной активности ГР в тканях крыс при хронической алкогольной интоксикации вносит определенный вклад в уменьшение содержания GSH в данных условиях.

Таблица

Активность каталазы в тканях крыс в норме (группа 1) и при хронической алкогольной интоксикации (группа 2)

Ткань	Группа крыс	Активность, Ед./г сырой массы (Ед./мл сыворотки)	Удельная активность, Ед./мг белка
Печень	Группа 1	0,64±0,029	0,040±0,0019
	Группа 2	1,73±0,081	0,034±0,0015
Сердце	Группа 1	0,65±0,031	0,070±0,0032
	Группа 2	1,45±0,068	0,075±0,0031
Сыворотка крови	Группа 1	0,09±0,004	0,008±0,0004
	Группа 2	0,27±0,011	0,007±0,0003

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ НАРКОЛОГИЯ

Наблюдаемое уменьшение активности ГП, вероятно, связано с тем, что при хронической алкогольной интоксикации снижается содержание селена, который необходим для синтеза аминокислоты селеноцистеина, играющей важную роль в катализе [10]. В данных условиях, по-видимому, основная нагрузка по обезвреживанию пероксидов органических кислот приходится на неселеновую ГП — глутатионтрансферазу (ГТ), активность которой при интоксикации этанолом в кардиомиоцитах возрастает [10]. Однако в печени на фоне низкой ГП-активности функционирование ГТ при хроническом употреблении алкоголя не изменяется относительно контрольного уровня, что, вероятно, является причиной большей подверженности гепатоцитов ПОЛ [9].

Вероятно, основная нагрузка по обезвреживанию пероксида водорода при хронической алкогольной ин-

токсикации приходится на каталазу, активность которой в данных условиях возрастает. Так, согласно полученным нами данным, в гомогенате печени и сердца крыс при патологии наблюдается повышение активности каталазы, выраженной в Ед./г сырой массы ткани, в 2,7 и 2,2 раза соответственно по сравнению с нормальными значениями. Активность исследуемого фермента, выраженная в Ед./мл сыворотки крови крыс, получавших этанол, превышала контрольные значения в 3,0 раза. Активация фермента при алкогольной интоксикации может иметь большое значение не только для обезвреживания гидропероксида, концентрация которого может при этом резко возрастать, но и для ускорения процессов окисления алкоголя при его высоких концентрациях, причем наибольший вклад в метаболизм этанола, как известно, вносит печень. Хотя в нормальных условиях каталазный

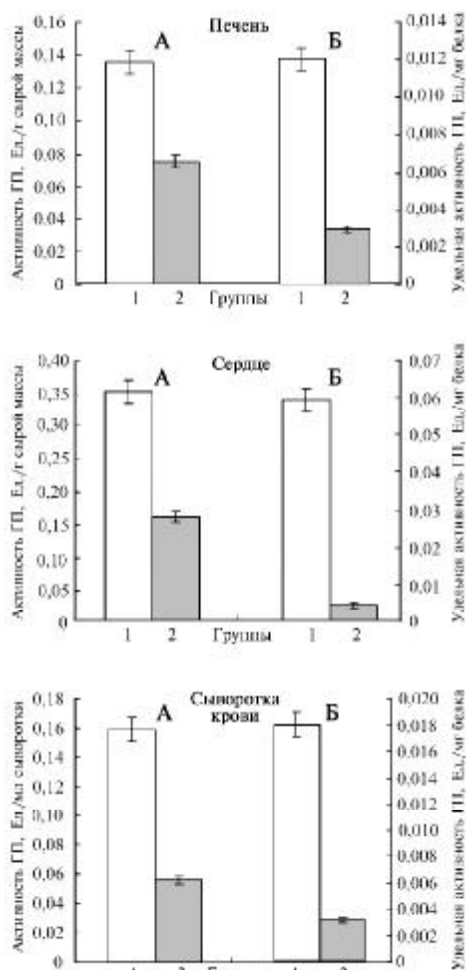


Рис. 2. Активность глутатионпероксидазы в печени, сердце и сыворотке крови крыс группы 1 (норма) и группы 2 (при хронической алкогольной интоксикации), выраженная: А — в Ед./г сырой массы ткани или в Ед./мл сыворотки; Б — в виде удельной активности

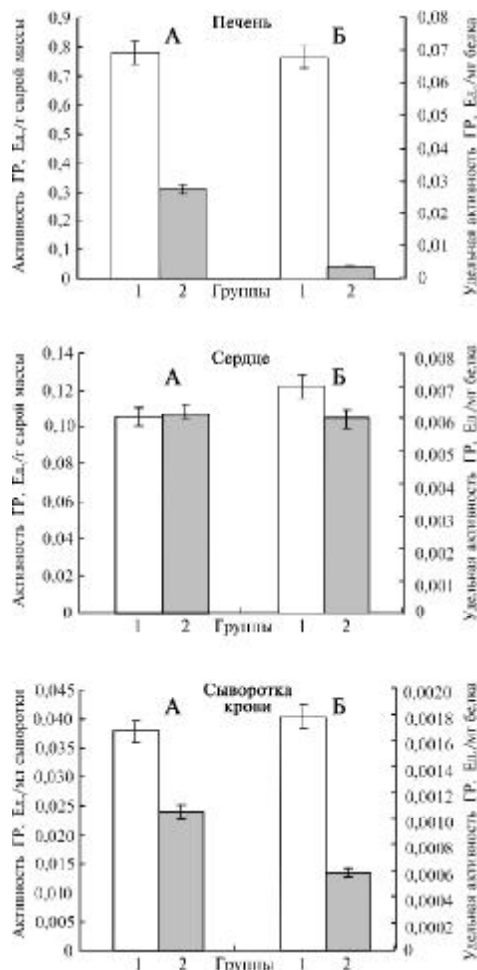


Рис. 3. Активность глутатионредуктазы в печени, сердце и сыворотке крови крыс группы 1 (в норме) и группы 2 (при хронической алкогольной интоксикации), выраженная: А — в Ед./г сырой массы ткани или в Ед./мл сыворотки; Б — в виде удельной активности

путь окисления этанола малоактивен, так как скорость образования пероксида водорода существенно ниже способности к его утилизации, он может приобретать определенное значение в ситуациях, сопровождающихся значительным ростом образования H_2O_2 . При этом необходимо отметить, что усиление СРО при алкогольной интоксикации может наблюдаться не только в печени, но и в миокарде и других тканях, в связи с чем активация каталазы может играть важную роль в развитии адаптивных реакций. Так, повышение активности каталазы может оказывать протекторное действие на функционирование цитохрома P450, который инактивируется в ходе метаболизма ксенобиотиков под действием H_2O_2 , образующегося в основном при разрушении пероксикомплекса [1].

В то же время при выражении активности каталазы в виде удельной активности было установлено снижение данного параметра в печени в 1,2 раза и в сыворотке крови — в 1,1 раза по сравнению с контрольными значениями, в сердце была выявлена тенденция к повышению активности. Полученные результаты могут быть объяснены возрастанием содержания общего белка в патологическом состоянии.

Заключение

При алкогольной интоксикации в тканях крыс происходит истощение запасов GSH, а также уменьшение активности ГП/ГР-системы и увеличение активности каталазы, что может являться следствием влияния алкоголя и продуктов его трансформации на ход метаболических процессов, в частности усиления СРО биомолекул, опосредующего многие патологические процессы в организме.

ACTIVITY OF PEROXIDES DETOXICATION SYSTEMS IN RATS TISSUES UNDER ALCOHOL INTOXICATION

POPOVA T.N.

Dr. of Biology, Head of the Department, Voronezh State University, Department of Analytical and Medical Biochemistry and Microbiology

RAKHMANOVA T.I.

Dr. of Biology, Associate Professor, Voronezh State University, Department of Analytical and Medical Biochemistry and Microbiology

SAFONOVA O.A.

Dr. of Biology, Associate Professor, Voronezh State University, Department of Analytical and Medical Biochemistry and Microbiology

The investigation of glutathione antioxidant system and catalase activity in liver, heart and blood serum of rats under chronic alcohol intoxication has been realized. Under this pathology glutathione level decrease in liver, heart and blood serum in 1.8, 4.8 and 4.5 times accordingly concerning to control has been established. Under alcohol intoxication the decrease of seleno glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in rats tissues also takes place. Catalase activity in animals tissues at these conditions rises. The change of investigated systems activity may be a consequence of ethanol and products of its transformation influence on metabolic processes, in particular, intensification of biomolecules free-radical oxidation, participating many pathological processes development in an organism.

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. Горюшкин И.И. Алкоголизм: механизмы изменения активности гамма-глутамилтрансферазы и аспартатаминотрансферазы и возможность предотвращения жировой инфильтрации печени // Вопросы наркологии. — 2001. — №1. — С. 60—66.
4. Пирожков С.В., Панченко Л.Ф. Внутриклеточные перекисные процессы при хронической алкогольной интоксикации // Укр. биохим. журн. — 1989. — Т. 61, №4. — С. 3—16.
5. Holguin F., Marc Moss I., Brown L.A.S. et al. Chronic ethanol ingestion impairs alveolar type II cell glutathione homeostasis and function and predisposes to endotoxin-mediated acute edematous lung injury in rats // The Journal of Clinical Investigation. — 1998. — Vol. 101, №4. — P. 761—768.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Nordman R. Alcohol and antioxidant systems // Alcohol and Alcoholism. — 1994. — Vol. 29. — P. 513—522.
10. Rabiere C., Hininger I., Rouach H. et al. Effects of chronic ethanol administration on free radical defence in rat myocardium // Biochem. Pharmacol. — 1992. — Vol. 44, №8. — P. 1495—1500.
11. Rogallu T., Ehrnsperger M., Reville H. et al. Regulation of Hsp 27 oligomerization, chaperon function and protective activity against oxidative stress // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 277. — P. 947—956.