

# Экспериментальный анализ факторов биологической предрасположенности к развитию алкогольной болезни печени\*

БУШМА М.И.

ЗИМАТКИН С.М.

АМБРУШКЕВИЧ Ю.Г.

ЛЕГОНЬКОВА Л.Ф.

БУШМА Т.В.

ШЕЙБАК В.М.

д.м.н., зав. каф. фармакологии Гродненского гос. мед. университета (ГГМУ), Белоруссия

д.б.н., проф. каф. гистологии с основами цитопсии и эмбриологии ГГМУ, Белоруссия

ст. преподаватель каф. биологии ГГМУ, Белоруссия

к.б.н., вед. научн. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ГГМУ, Белоруссия

нач. отдела автоматизированных систем управления ГГМУ, Белоруссия

д.м.н., зав. Центральной научно-исследовательской лаборатории ГГМУ, Белоруссия

*Разработан новый методический подход по выявлению факторов, ответственных за предрасположенность к гепатотоксичности этанола. С использованием корреляционного, пошагового многофакторного регрессионного, дисперсионного и канонического анализов установлена взаимосвязь между индивидуальными особенностями протекания биохимических процессов в печени до воздействия этанола и характером, степенью выраженности (в последующем) алкогольного поражения органа. Доказано, что к гепатотоксичности этанола предрасположены крысы с генетически высокой активностью в печени алкогольдегидрогеназы и системы ПОЛ. Кроме того, у таких животных снижено содержание в печени восстановленного глутатиона, ретинолов и цитохрома b<sub>5</sub>; для них характерны энзимопатия в отношении УДФ-глюкуронил-, глутатион-S-трансфераз и низкая скорость окисления NADH. Они также более чувствительны к наркотическому действию этанола.*

Хорошо известна индивидуальность чувствительности печени животных и человека к алкоголю. При действии на животных одной и той же дозы этанола морфологические изменения в печени варьируют в широких пределах как в количественном, так и в качественном (белковая и жировая дистрофия, гепатоз, гепатит, некроз, цирроз) отношении [5]. Несмотря на многочисленные исследования, до настоящего времени не расшифрованы механизмы, ответственные за предрасположенность печени человека и животных к повреждающему действию этанола.

В настоящем исследовании предлагается модель для выявления биохимических маркеров повышенной чувствительности животных к гепатотоксическому действию этанола.

## Методика исследования

Опыты проведены на 112 нелинейных белых крысах-самцах с исходной массой 250–300 г. Животных подопытной группы (94 крысы) подвергали частичной гепатэктомии (удаление центральной и левой боковой долей печени; 65 — 70% массы) под эфирным наркозом с наложением лигатуры на их основания [10]. Через 2 мес. начинали вводить этанол (через зонд в желудок в дозе 5 г/кг в виде 30%-ного водного раствора, 1 раз в день, 57 дней; опыт). Животных контрольной группы (16 крыс) оперировали, как описано выше, а в послеоперационный период им вводили воду в том же объеме, что и этанол подопытным животным.

В изъятых до интоксикации этанолом долях печени крыс определяли: активность ферментов метаболизма этанола и ацетальдегида, состояние систем перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, биотрансформации ксенобиотиков (всего 33 показателя). В том числе в гомогенате печени регистрировали: содержание малонового диальдегида (МДА) и активность систем его образования в аскорбат- и NADPH-зависимых реакциях [6]; уровень восстановленного

глутатиона [14] и ретинолов [15]. В постмитохондриальной фракции печени оценивали активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) [16]; в микросомах — скорость окисления NADH [8], содержание цитохрома b<sub>5</sub> [13], активность УДФ-глюкуронил- [11] и глутатион-S-трансфераз [9]. Последний фермент определяли также и в постмикросомальной фракции печени. Чувствительность крыс к наркотическому действию этанола оценивали по длительности алкогольиндуцируемого сна у животных после введения алкоголя.

На основании данных изучения вышеприведенных показателей в предварительно изъятых долях печени составляли биохимический паспорт каждого животного.

После хронического введения этанола крыс декапитировали. В печени гистологическими методами изучали интенсивность: воспалительной и жировой инфильтрации паренхимы, вакуолизации гепатоцитов, их деструкции и гибели. Оценку проводили в баллах. Кроме того, в плазме крови определяли активность маркерных ферментов повреждения печени: аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) [3].

Для нахождения взаимосвязей между исходными индивидуальными биохимическими показателями в печени крыс, с одной стороны, и характером, степенью выраженности последующего алкогольного поражения органа, с другой, использовали методы корреляционного, пошагового многофакторного регрессионного, дисперсионного и канонического анализа [2, 4].

## Адекватность модели задачам исследования

При сравнении значений показателей в долях печени крыс, полученных при частичной гепатэктомии, с таковыми у этих же животных через 2 мес. (период восстановления структуры и функции органа перед началом хронической алкогольной интоксикации), не обнаружено достоверных различий. Гистологически печень также не различалась. Это свидетельствует о полном структурно-метаболическом восстановлении органа после частичной гепатэктомии.

\* Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда Фундаментальных исследований при СМ РБ (грант Б96-335).

## Результаты исследования

### Математическое моделирование

#### Межиндивидуальная вариабельность характера и степени выраженности проявлений гепатотоксичности этанола

Интенсивность воспалительной инфильтрации печени и вакуолизации гепатоцитов у крыс после хронической алкогольной интоксикации (этанол; внутрижелудочковая, 5 г/кг в виде 30%-ного водного раствора, 1 раз в день, 57 дней) варьирует от 0,2 (очень слабая выраженность) до 4,0 (очень сильная выраженность) баллов. Значения степени деструкции и гибели гепатоцитов колеблются от 0,33 (очень слабая выраженность) до 4,00 баллов. Жировая инфильтрация паренхимы печени характеризуется значениями 0,1 (очень слабая выраженность) — 3,0 (сильная выраженность) баллов. Активность АлАТ в плазме после хронической алкогольной интоксикации варьирует от 0,6 до 3,6 и АсАТ — от 1,65 до 3,90 ммоль/л.

#### Корреляционный анализ

О корреляционной взаимосвязи между биохимическими показателями в печени (до воздействия этанолом) и характером, степенью тяжести последующего поражения печени (после воздействия этанолом) свидетельствуют данные, представленные в таблице.

Воспалительная инфильтрация паренхимы печени коррелирует с повышенным уровнем МДА, низким содержанием цитохрома  $b_5$  и энзимопатией УДФ-глюкуронилтрансферазы. К вакуолизации гепатоцитов предрасполагает исходно низкое содержание в печени ретинолов, цитохрома  $b_5$  и замедленное окисление NADH. Эти животные более чувствительны к наркотическому действию этанола (“долгоспящие”).

Деструкции и гибели гепатоцитов способствует исходно повышенная активность алкогольдегидрогеназы, а также повышенное содержание МДА и активизированные системы его образования в аскорбат- и NADPH-зависимых реакциях. Жировая инфильтрация паренхимы печени коррелирует с исходно низким содержанием в органе восстановленного глутатиона, низкой скоростью окисления NADH и энзимопатией микросомальной глутатион-S-трансферазы. Эти животные также относятся к “долгоспящим”.

Активность АлАТ в крови под влиянием этанола в большей степени возрастает у крыс с исходно низкой скоростью окисления NADH и энзимопатией цитозольной глутатион-S-трансферазы. Активность АсАТ в крови к концу эксперимента возрастает преимущественно у крыс с исходно низким уровнем в печени восстановленного глутатиона, низкой скоростью окисления NADH; энзимопатией глутатион-S-трансферазы. Длительность наркотического сна у этой популяции крыс больше.

На основе полученных коэффициентов корреляции построены математические модели.

#### Пошаговый многофакторный регрессионный анализ

1. Взаимосвязь между выраженностью воспалительной инфильтрации ( $z$ ), содержанием цитохрома  $b_5$  ( $y$ ) и МДА ( $x$ ) описывается уравнением множественной регрессии линейного типа:  $z = 3,666x - 0,959y$ . Воспалительная инфильтрация печени под влиянием этанола наиболее выражена у крыс с исходно высоким содержанием в печени МДА и низким уровнем цитохрома  $b_5$  (рис. 1).

2. Вакуолизация гепатоцитов ( $z$ ) более выражена у животных с исходно низким уровнем в печени цитохрома  $b_5$  ( $y$ ) и ретинолов ( $x$ ). Эта взаимосвязь описывается уравнением множественной регрессии линейного типа:  $z = 2,863x - 0,013y - 3,082$  (рис. 2).

Таблица

Корреляционные взаимосвязи между показателями, характеризующими степень алкогольного поражения печени крыс, и некоторыми показателями в органе до воздействия этанолом

| Показатели до интоксикации этанолом                                                                                                                                 | Показатели после интоксикации этанолом |                          |                                 |                                |                        |                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------|
|                                                                                                                                                                     | Печень                                 |                          |                                 |                                | Плазма                 |                          |
|                                                                                                                                                                     | Воспалительная инфильтрация            | Вакуолизация гепатоцитов | Деструкция и гибель гепатоцитов | Жировая инфильтрация паренхимы | Аланинаминотрансфераза | Аспартатаминотрансфераза |
| 1. Алкогольдегидрогеназа                                                                                                                                            | +0,23                                  | -0,06                    | <b>+0,43</b>                    | -0,10                          | -0,07                  | -0,22                    |
| 2. Малоновый диальдегид                                                                                                                                             | <b>+0,42</b>                           | +0,39                    | <b>+0,52</b>                    | +0,34                          | -0,03                  | -0,08                    |
| 3. Аскорбатзависимая ПОЛ                                                                                                                                            | +0,001                                 | -0,26                    | <b>+0,44</b>                    | -0,12                          | -0,30                  | -0,35                    |
| 4. NADPH-зависимая ПОЛ                                                                                                                                              | +0,20                                  | -0,39                    | <b>+0,41</b>                    | -0,22                          | -0,35                  | -0,38                    |
| 5. Восстановленный глутатион                                                                                                                                        | -0,27                                  | -0,27                    | +0,02                           | <b>-0,71</b>                   | +0,02                  | <b>-0,46</b>             |
| 6. Ретинолы                                                                                                                                                         | -0,21                                  | <b>-0,70</b>             | -0,27                           | -0,09                          | +0,22                  | +0,31                    |
| 7. Окисление NADH                                                                                                                                                   | +0,05                                  | <b>-0,69</b>             | +0,36                           | <b>-0,51</b>                   | <b>-0,47</b>           | <b>-0,49</b>             |
| 8. Цитохром $b_5$                                                                                                                                                   | <b>-0,69</b>                           | <b>-0,44</b>             | -0,31                           | -0,24                          | -0,36                  | -0,02                    |
| 9. УДФ-глюкуронилтрансфераза                                                                                                                                        | <b>-0,40</b>                           | -0,04                    | -0,26                           | -0,35                          | +0,33                  | -0,01                    |
| 10. Микросомальная глутатион-S-трансфераза                                                                                                                          | -0,35                                  | -0,39                    | -0,25                           | <b>-0,41</b>                   | -0,26                  | <b>-0,42</b>             |
| 11. Цитозольная глутатион-S-трансфераза                                                                                                                             | +0,06                                  | -0,33                    | +0,33                           | -0,15                          | <b>-0,48</b>           | <b>-0,69</b>             |
| 12. Длительность этанольного наркоза                                                                                                                                | -0,11                                  | <b>+0,56</b>             | -0,36                           | <b>+0,53</b>                   | +0,17                  | <b>+0,43</b>             |
| Примечание. Приведены наиболее информативные показатели, коррелирующие с показателями поражения печени. Жирным шрифтом выделены значимые корреляционные взаимосвязи |                                        |                          |                                 |                                |                        |                          |

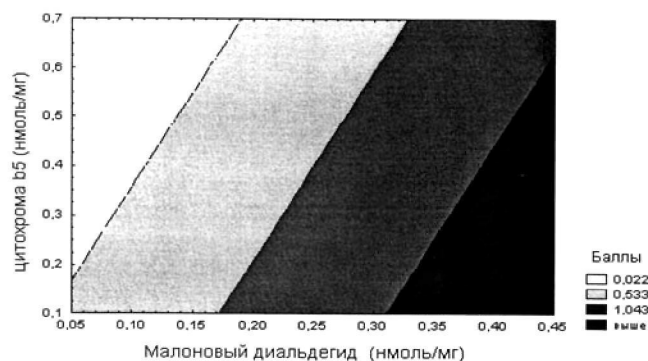


Рис. 1. Взаимосвязь между выраженностью воспалительной инфильтрации печени (после алкогольной интоксикации), содержанием цитохрома  $b_5$  и малонового диальдегида в печени крыс (до алкогольной интоксикации).

Примечание. Здесь и на рис. 2–4: степень выраженности гепатотоксичности этанола отражают интенсивность цвета и цифровые значения, представленные на шкале справа

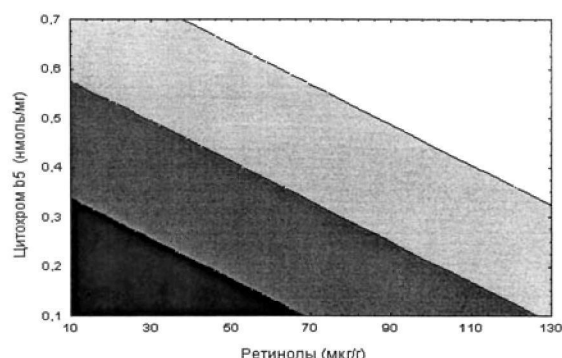


Рис. 2. Взаимосвязь между выраженностью вакуолизации гепатоцитов (после алкогольной интоксикации) и содержанием цитохрома  $b_5$  и ретинолов в печени крыс (до алкогольной интоксикации)

3. Деструкция и гибель гепатоцитов ( $z$ ) под влиянием длительного введения этанола в большей степени проявляется у крыс с исходно высоким уровнем в печени МДА ( $y$ ) и активизированной системой его образования в аскорбат-зависимом пути ( $x$ ) (до воздействия этанолом). Взаимосвязь этих показателей описывается уравнением множественной регрессии нелинейного типа:  $z = 3,071 - 1,519x - 4,465y - 1,672x^2 + 19,711xy - 29,718y^2$ .

4. Жировая инфильтрация паренхимы печени ( $z$ ) особенно проявляется у крыс с исходно низким уровнем восстановленного глутатиона ( $y$ ) и низкой скоростью окисления NADH ( $x$ ) в печени. Взаимосвязь этих показателей описывается уравнением множественной регрессии линейного типа:  $z = 1,656 - 0,39x + 0,01y$  (рис. 3).

5. У крыс с повышенной активностью АЛат в плазме крови ( $z$ ) после хронической интоксикации этанолом регистрировалась исходно низкая активность цитозольной ХДНБ-глутатион-S-трансферазы ( $y$ ) и скорость окисления NADH ( $x$ ) в печени. Взаимосвязь этих показателей описывается уравнением множественной регрессии линейного типа:  $z = 2,094 - 0,142x - 0,645y$  (рис. 4).

#### Дисперсионный анализ

Результаты дисперсионного анализа свидетельствуют о высоких информационных качествах разработанных нами моделей. Модели статистически значимы ( $p = 0,05$ ).

#### Канонический анализ

Результаты канонического анализа подтвердили наличие сильной статистически значимой корреляционной

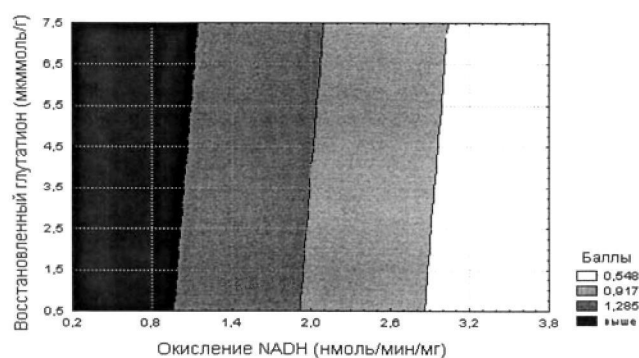


Рис. 3. Взаимосвязь между выраженностью жировой инфильтрации паренхимы печени (после алкогольной интоксикации), содержанием восстановленного глутатиона и скоростью окисления NADH в печени крыс (до алкогольной интоксикации)

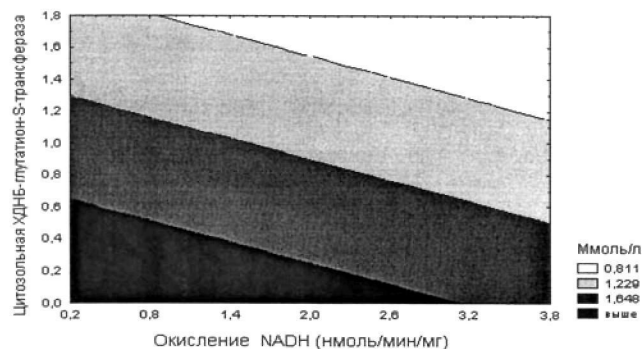


Рис. 4. Взаимосвязь между активностью АЛат в плазме крови крыс (после алкогольной интоксикации), активностью цитозольной ХДНБ-глутатион-S-трансферазы и скоростью окисления NADH в печени крыс (до алкогольной интоксикации)

связи между показателями до интоксикации и показателями повреждения печени алкоголем. Это означает, что алкогольное поражение печени у крыс значимо связано с представленными в таблице исходными биохимическими показателями в печени. Рассчитанный квадрат канонического анализа  $r (0,92; p = 0,0002)$  свидетельствует о том, что в 92% случаев предрасположенность к алкогольному поражению печени, судя по данным морфологических (печень) и биохимических (плазма) исследований, обусловлена состоянием изученных биохимических показателей в печени (см. таблицу). Только в 8% случаев алкогольное поражение печени обусловлено влиянием неучтенных случайных факторов невыясненной природы.

#### Обсуждение полученных результатов

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о существовании тесной взаимосвязи между особенностями протекания биохимических процессов в печени интактных животных и их чувствительностью (в последующем) к гепатотоксичности этанола.

Крысы с исходно высокой активностью АДГ в печени быстрее метаболизируют этанол до ацетальдегида. Последний крайне токсичен и реакционноспособен. Он связывается с фосфолипидами, аминокислотами, сульфгидрильными группами, особенно в месте образования — печени; повреждает плазматические мембраны путем деполимеризации белков [5, 12]. Следовательно, крысы с исходно высокой скоростью образования ацетальдегида (активизированная АДГ) в нашем опыте оказались в боль-

шей степени подвержены деструкции и гибели гепатоцитов (см. таблицу).

Известно, что цитохром P 450 2E1 катализирует метаболизм этанола с образованием больших количеств реакционноспособных интермедиатов кислорода (супероксидный радикал, перекись водорода) [7]. В этой связи у животных с исходно активизированными процессами перекисного окисления липидов (повышенное количество МДА и ускоренная его генерация в аскорбат- и NADPH-зависимых реакциях), а также у животных со сниженным антиоксидантным потенциалом (низкое содержание восстановленного глутатиона и ретинолов, энзимопатия глутатионтрансфераз) (см. таблицу) создались условия для усиления алкоголь-индуцированного окислительного стресса.

Доказано, что этанол вызывает нарушение внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала. Соотношение  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  в гепатоцитах под его влиянием значительно возрастает. Этот механизм играет важную роль в патогенезе развития жировой дистрофии печени, усилении образования коллагена в печени и других структурно-функциональных нарушениях органа [5]. Как видно из данных таблицы, у животных с низкой скоростью окисления NADH, что предрасполагает к сдвигу соотношения  $\text{NADH}/\text{NAD}$  в сторону NADH, этанол оказал более выраженное гепатотоксическое действие. Одним из факторов замедления скорости окисления NADH у этих животных может быть сниженное содержание цитохрома  $\text{b}_5$  — акцептора электронов в NADH-зависимой микросомальной электрон-транспортной цепи [1].

Более выраженное фармакологическое действие этанола (судя по длительности алкоголь-индуцированного сна) также может свидетельствовать в пользу большей чувствительности этих животных к алкоголю.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что индивидуальные особенности протекания биохимических процессов в печени крыс играют важную роль в проявлении в последующем

гепатотоксических свойств этанола. Предрасполагают к алкогольному поражению печени наличие более активных систем ПОЛ, а также сниженный антиоксидантный потенциал, энзимопатия УДФ-глюкуронил- и глутатион-S-трансфераз, низкое содержание цитохрома  $\text{b}_5$  и скорости окисления NADH.

### Список литературы

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. — М.: Наука, 1975. — 328 с.
2. Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. — М.: Мир, 1982.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. // В кн.: Справочник по клинической химии. — Минск: Беларусь, 1982. — С. 111—121.
4. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1975. — 295 с.
5. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. — М.: ГЭОТАР “Медицина”, 1999. — С. 440—462.
6. Buege, J.A., Aust, S.D. // In: Methods in Enzymology. — 1978. — Academic Press, NY. — 52. — P. 306—312.
7. Cederbaum A.I. Ethanol Pharmacokinetics, Metabolism and Forensic Aspects. In The Research Society on Alcoholism Lecture Series “Alcohol and Alcohol Actions”. Series 2: Biomedical (Ed. Grud D., Israel Y.). — P. 28—56.
8. Gillette J.R., Brodie B.B., La Du B.N. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1957. — 119. — P. 532—540.
9. Habig W.H., Pabst M.I., Jakoby W.B. // J. Biol. Chem. — 1974. — 249 (22). — P. 7130—7139.
10. Higgins G.M., Anderson R.M. // Arch. Path. — 1931. — 12, (2). — P. 186—202.
11. Isselbacher K.J. // Recent Progr. Horm. Res. — 1956. — 12. — P. 134—143.
12. Matysiak-Budnik T., Jokelainen K., Karkainen P., Ohisalo J., Salaspuro M. // J. Hepatol. — 1996. — 178. — P. 469—474.
13. Omura T., Sato R., Cooper D.E., et al. // Fed. Proc. — 1965. — 24. — P. 1181—1187.
14. Sedlak G., Lindsay R.H. // Anal. Biochem. — 1968. — 25 (1). — P. 192—205.
15. Taylor S.L. // Lipids. — 1976. — 11 (7). — P. 350—358.
16. Tottmar S.O.C., Petterson H., Kiessling K.H. // Biochem. J. — 1973. — 135. — P. 577—586.