

Характеристика обмена глутатиона при алкогольном абстинентном синдроме

ВЫСОКОГОРСКИЙ В.Е. д.м.н., профессор, зав. каф. биологической химии с курсом клинической биохимии и лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии
ЕФРЕМЕНКО Е.С. аспирант кафедры биологической химии с курсом клинической биохимии и лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии
ГРИЦАЕВ И.Е. зав. отделением Омского областного наркологического диспансера

С целью оценки состояния обмена глутатиона и антирадикальной защиты при алкогольном абстинентном синдроме было проведено определение уровня восстановленного глутатиона, активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах больных алкоголизмом, находящихся в состоянии абстиненции. Выявлено статистически значимое снижение концентрации восстановленного глутатиона в 1-, 3- и 10-е сутки после поступления больных в стационар по отношению к группе контроля, которую составили условно здоровые лица. Активность глутатионредуктазы была снижена на 23% ($pU < 0,01$) в 1-е сутки лечения. Активность глутатион-S-трансферазы снижалась на 3-и сутки пребывания в стационаре на 25% ($pU < 0,05$). В дальнейшем отмечалось увеличение активности данных ферментов. Глутатионпероксидазная активность повышена в 1- и 5-е сутки лечения. Супероксиддисмутазная активность была снижена на 12% ($pU < 0,05$) в 1-е сутки после поступления больных в стационар. На 3-и сутки лечения активность этого фермента была выше по сравнению с группой контроля. При исследовании активности каталазы статистически значимых отличий не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о нарушении обмена глутатиона в период алкогольной абстиненции, что, вероятно, играет определенную роль в патогенезе алкогольной интоксикации и алкогольной зависимости.

Введение

Известно, что биотрансформация этанола сопряжена с увеличением образования свободных радикалов, которые оказывают мощное повреждающее действие на мембраны клеток и внутриклеточные компоненты [15, 19]. Неудовлетворительная инактивация соединений свободнорадикальной природы, осуществляемая антиокислительной системой, определяет возможность формирования окислительного стресса в условиях алкоголизации [8, 16].

Одной из важнейших составляющих этой многокомпонентной системы является глутатион, обладающий протекторными свойствами в отношении свободных радикалов и радикалообразующих агентов [5]. Незаменимость и невосполнимость эффектов глутатиона связаны, в первую очередь, со структурной особенностью его восстановленной формы — наличием лабильной тиоловой группы остатка цистеина, которая является донором протонов для многих соединений. Данные свойства глутатиона определяют возможность связывания различных токсичных продуктов и нейтрализацию свободнорадикальных субстанций [6]. Кроме того, значительная часть антиокислительной активности обеспечивается энзиматическими компонентами системы глутатиона — глутатионпероксидазой, глутатион-S-трансферазой, глутатионредуктазой, которые осуществляют конвертацию перекисей до воды и восстанавливают окисленные низкомолекулярные антиоксиданты [10].

Наиболее ярко значимость глутатионовой антирадикальной системы проявляется в условиях дефицита ее факторов, который наблюдается при алкоголизме. В частности, в работе Maher J.J. (1997 г.) отмечается, что уменьшение концентрации восстановленного глутатиона в гепатоцитах больных алкоголизмом может являться одним из механизмов алкогольиндуцированного повреждения печени.

Синхронно с системой глутатиона функционируют супероксиддисмутаза и каталаза, создавая существенную преграду для повреждающего действия молекул радикальной природы [5, 6, 10]. Активность данных ферментов в условиях алкоголизации значительно изменяется, что выражается в увеличении роли каталазного пути окисления этанола [20] и снижении супероксиддисмутазной активности [1].

Изменения в работе антиокислительной системы возникают и в наиболее тяжелый, критический период алкогольной болезни — период абстиненции. В работе Peng F.C. с соавторами (2005 г.) показано снижение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы у лиц с признаками алкогольной зависимости.

Однако, учитывая наличие определенной динамики клинической картины алкогольного абстинентного синдрома, можно предположить аналогичный характер деятельности антиокислительной системы в этот период. В связи с этим определение показателей антиоксидантной защиты в различные сроки течения абстинентного синдрома необходимо для характеристики состояния больных и уточнения роли свободнорадикальных процессов в развитии данного патологического состояния.

Материал и методы исследования

Для характеристики обмена глутатиона и состояния процессов свободнорадикального окисления при алкогольном абстинентном синдроме нами было проведено исследование содержания восстановленного глутатиона по E. Beutler [7] в модификации Д.В. Черданцева [6], активности глутатионредуктазы по I. Carlberg I. [9], глутатионпероксидазы по D.E. Paglia [17] в модификации Д.В. Черданцева [6], глутатион-S-трансферазы по W.H. Nabis [11], каталазы по М.А. Корольюк [2] и супероксиддисмутазы по Т.В. Сирота [4] у пациентов Омского областного наркологического диспансера в возрасте от 35 до 50 лет, которые

Уровень восстановленного глутатиона, активность ферментов антиокислительной системы в эритроцитах больных алкоголизмом при развитии абстинентного состояния ($M \pm m$)

	Контроль (n=15)	A1 (n=15)	A3 (n=10)	A5 (n=10)	A10 (n=15)
Глутатион восст., мкмоль/г белка	3,6±0,1	3,1±0,1**	3,1±0,1**	3,2±0,2	3,2±0,1*
Глутатионредуктаза, мкмоль/мин/г белка	6,5±0,3	5,0±0,2**	6,6±0,1	7,2±0,6	8,0±0,3**
Глутатионпероксидаза, мкмоль/мин/г белка	77,2±1,3	118,2±6,1***	95,7±9,4	101,5±8,9*	86,1±5,9
Каталаза, мкат/г белка	17,1±0,9	19,0±0,6	14,0±1,6	18,1±0,9	19,0±0,7
Супероксиддисмутаза, ед/г белка	1,02±0,03	0,90±0,04*	1,18±0,05*	1,08±0,09	0,98±0,04
Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/мин/г белка	6,2±0,6	6,1±0,6	4,6±0,4*	5,2±0,4	7,9±0,4*

Примечание. A1, A3, A5, A10 — больные в состоянии алкогольной абстиненции в 1-, 3-, 5- и 10-е сутки пребывания в стационаре соответственно; * — $pU < 0,05$, ** — $pU < 0,01$, *** — $pU < 0,001$ — по сравнению с контролем

находились в состоянии алкогольной абстиненции при поступлении в стационар (F.10.302, F.10.242).

Лечение пациентов осуществлялось по стандартной схеме. Забор и обработка крови для исследования проводились по стандартной методике в 1-, 3-, 5- и 10-е сутки после поступления больного в стационар. Содержание белка в эритроцитах определяли по методу Лоури [13]. Контрольную группу составили условно здоровые лица аналогичной возрастной категории. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью компьютерных программ Biostat и Microsoft Excel. Оценку достоверности различий проводили с использованием критерия Манна—Уитни [3].

Результаты и обсуждение

Значения показателей антиоксидантной защиты приведены в таблице.

При исследовании уровня восстановленного глутатиона у больных алкоголизмом в 1-е сутки после поступления в стационар отмечается более низкий уровень (в 1,2 раза) данного показателя ($pU < 0,01$) по сравнению со значениями контрольной группы. Данное изменение, вероятно, связано с ускорением глутатионзависимой дегградации пероксида водорода и различных органических гидропероксидов, осуществляемой глутатионпероксидазой [5, 6, 10], активность которой повышена на 53% ($pU < 0,001$).

Кроме того, восстановленный глутатион способен оказывать антирадикальное действие, вступая в непосредственное взаимодействие с супероксидным анион-радикалом, синглетным кислородом, гидроксильным радикалом [5], что также отрицательно отражается на его внутриклеточном содержании. Акцептируя эти радикалы, восстановленный глутатион окисляется с образованием промежуточных форм и, в конечном итоге, окисленного глутатиона [6].

Недостаточная активность (снижение на 23%, $pU < 0,01$) в этот срок глутатионредуктазы — основного фермента, осуществляющего поддержание уровня восстановленного глутатиона в клетках, снижает эффективность работы системы антиокислительной защиты и указывает на невозможность сохранения фонда восстановленного

глутатиона только за счет синтетических процессов, так как интенсивность его редукции не соответствует требуемому уровню.

Активность супероксиддисмутазы снижается на 13% ($pU < 0,05$) в 1-е сутки пребывания в стационаре. Пониженная активность СОД в ранние сроки формирования абстинентного синдрома предопределяет возможность генерации других активных форм кислорода, родоначальником которых считается супероксидный анион-радикал [5], что создает дополнительную нагрузку на компоненты глутатионовой системы.

Восстановленный глутатион способен осуществлять антиокислительное действие, конъюгируя с различными пероксидами и свободными радикалами органических соединений, образующихся при действии активных форм кислорода, под влиянием глутатион-S-трансферазы [6]. Активность данного фермента снижается на 26% ($pU < 0,05$) на 3-и сутки лечения. При сравнении глутатионпероксидазной и глутатионредуктазной активности в данный срок со значениями контрольной группы статистически значимых различий не выявлено. При исследовании активности супероксиддисмутазы отмечается увеличение скорости дисмутации супероксида на 15% ($pU < 0,05$) по отношению к контролю.

Несмотря на некоторое уменьшение использования восстановленного глутатиона в реакциях ферментативного обезвреживания свободнорадикальных субстанций, усиление первой линии антирадикальной защиты и возможности рециклирования восстановленного глутатиона, его внутриклеточный уровень остается сниженным.

Глутатион, обладая высокой конформационной подвижностью, способен принимать форму, которая препятствует его спонтанному окислению и позволяет участвовать в процессах, необходимых клетке [6]. Учитывая данный факт, можно предположить, что в условиях алкогольиндуцированного окислительного стресса роль восстановленного глутатиона как самостоятельного антиоксидантного агента увеличивается.

Увеличение активности глутатионпероксидазы на 31% ($pU < 0,05$) на 5-е сутки пребывания в стационаре по сравнению с контролем определяют уменьшение концентрации восстановленного глутатиона в эти сроки.

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что, несмотря на терапевтические мероприятия, проводимые при алкогольном абстинентном синдроме, в системе обмена глутатиона происходят негативные изменения. Их возникновение, вероятно, обусловлено интенсивным использованием восстановленного глутатиона в реакциях инактивации свободных радикалов и выражается в его недостаточной внутриклеточной концентрации. Неэффективное взаимодействие ферментативных компонентов глутатионовой системы создает дополнительное затруднение для функционирования антиокислительной системы в целом. Выявленные нарушения обуславливают необходимость создания условий для поддержания определенного уровня антиоксидантного потенциала клеток.

Список литературы

1. Бушма М.И., Зиматкин С.М., Амбрукшевич Ю.Г. и др. Роль антиоксидантной системы печени в предрасположенности крыс к гепатотоксическому действию этанола // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2003. — Т. 66, №1. — С. 60–63.
2. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — №1. — С. 16–17.
3. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. — М.: Издательство РАМН, 2000. — 52 с.
4. Сирота Т.В. Новый подход к исследованиям аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопр. мед. хим. — 1999. — №3. — С. 36–42.
5. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. Свободнорадикальное окисление и старение. — СПб: Наука, 2003. — 327 с.
6. Черданцев Д.В., Винник Ю.С., Каспаров Э.В. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите. — Новосибирск, 2002. — 147 с.
7. Beutler E. Red cell metabolism. A manual biochemical methods. — Orlando: Grune & Stratton, 1990. — P. 131–134.
8. Bjerneboe A., Bjerneboe G.E. Antioxidant status and alcohol-related diseases // Alcohol and Alcoholism. — 1993. — Vol. 28. — P. 111–116.
9. Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase // Mol. Enzymol. — 1985. — №113. — P. 484–490.
10. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // Physiol. Rev. — 2002. — Vol. 82. — P. 47–95.
11. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathione-S-transferases. The first step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, №22. — P. 7130–7139.
12. Kono H., Rusyn I., Yin M., Gabele E., Yamashina S., Dikalova A., Kadiiska M.B., Connor H.D., Mason R.P., Segal B.H., Bradford B.U., Holland S.M., Thurman R.G. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 106, №7. — P. 867–872.
13. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.Z. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
14. Maher J.J. Exploring alcohols effects on liver function // Alc. Health & Res. World. — 1997. — Vol. 21, №1. — P. 5–12.
15. Mufti S.I., Eskelson C.D., Odeleye O.E., Nachiappan V. Alcohol-associated generation of oxygen free radicals and tumor promotion // Alcohol and Alcoholism. — 1993. — Vol. 28. — P. 621–628.
16. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems // Alcohol and Alcoholism. — 1994. — Vol. 29. — P. 513–522.
17. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Clin. Lab. Med. — 1967. — №70. — P. 158–169.
18. Reinke L.A., McCay P.B. Spin Trapping Studies of Alcohol-Initiated Radicals in Rat Liver: Influence of Dietary Fat // The Journal of Nutrition. — 1997. — Vol. 127. — P. 899S–902S.
19. Teare J.P., Greenfield S.M., Watson D., Punched N.A., Miller N., Rice-Evans C.A., Thompson R.P. Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol // Gut. — 1994. — Vol. 35. — P. 1644–1647.
20. Ward R. J., Kest W., Bruyeer P., Lallemand F., De Witte P. Taurine modulates catalase, aldehyde dehydrogenase, and ethanol elimination rates in rat brain // Alcohol and Alcoholism. — 2001. — Vol. 36, №1. — P. 39–43.

CHARACTER OF GLUTATHIONE METABOLISM IN ALCOHOL WITHDRAWAL SYNDROME

VYSOKOGORSKI V.E. Dr.med.sci., professor, Head of biochemistry chair of Omsk State Medical Academy, Omsk
EFREMENKO E.S. postgraduate scientist, Omsk State Medical Academy, Omsk
GRITSAEV I.E. Head of department, Regional narcology hospital, Omsk

The aim of this study is to estimate state of glutathione metabolism and antiradical defence in alcoholic patients with alcohol withdrawal syndrome. Level of reduced glutathione, activities of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase and catalase was determined in erythrocytes alcoholic patients. Concentration of reduced glutathione was lowered on the 1st, 3d and 10 th day of the treatment group in comparison with the control group. Glutathione reductase activity was decreased by 23 percent (pU less than 0,01) on the 1st of the treatment. Glutathione-S-transferase activity was decreased by 25 percent (pU less than 0,05) on the 3d of the treatment. The enzymes activities increase was observed later on. Activity of glutathione peroxidase was increased on the 1st and 5 th day of the treatment. Superoxide dismutase activity was diminished by 12 percent (pU less than 0,05) on the 1st of the treatment. On the 3d day of the treatment activity of this enzyme was higher than in the control group. There were no statistical differences in catalase activity in comparison with the control group. These data demonstrate a disturbance of glutathione metabolism in alcohol withdrawal, which may be important in pathogenesis of alcohol intoxication and alcohol dependence.