

Роль гидроперекисей в окислительном стрессе при алкоголизации на фоне экспериментального сахарного диабета

ВЫСОКОГОРСКИЙ В.Е.

д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии с курсом клинической биохимии и лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии

ЖУКОВА О.Ю.

ассистент кафедры биологической химии с курсом клинической биохимии и лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии

ПАНЧЕНКО Л.Ф.

д.м.н., профессор, академик РАМН, руководитель лаборатории биохимии ГУ Национальный научный центр наркологии Росздрава, Москва

Исследовано состояние свободнорадикальных процессов в ткани печени при алкоголизации на фоне аллоксанового сахарного диабета (СД) по данным хемилюминесценции, определен уровень восстановленного глутатиона и доступных сульфгидрильных групп, активность каталазы и супероксиддисмутазы. Установлен факт угнетения свободнорадикальных процессов в сочетании с признаками окислительного стресса при однократной алкоголизации и повышение интенсивности свободнорадикального окисления, снижение содержания доступных сульфгидрильных групп в ткани печени при длительной алкоголизации. Полученные данные свидетельствуют о ведущей роли гидроперекисей в прогрессировании окислительного стресса при неоднократной алкоголизации на фоне СД.

Введение

Результаты многих исследований показывают, что нарушения метаболических процессов при алкоголизации определяются, главным образом, активацией свободнорадикальных процессов, пусковым моментом которых является развивающийся дефицит антиоксидантов [2, 9], в частности восстановленного глутатиона [3]. При длительном потреблении алкоголя истощаются резервы восстановленного глутатиона (GSH) в печени и крови [21]. Предполагают [19], что алкогольная интоксикация ведет к истощению митохондриального GSH благодаря выведению из строя GSH-переносящих белков.

Молекулярные механизмы, посредством которых алкоголь ухудшает транспорт GSH в митохондрии, недостаточно ясны. Клетка, исчерпав митохондриальный GSH, становится более чувствительной к окислительному стрессу [23].

Тем не менее, употребление алкоголя при различной соматической патологии, в том числе и при СД, достаточно распространено [12].

СД, как известно, также сопровождается выраженной активацией ПОЛ и сочетается с различными нарушениями антиоксидантной системы, в том числе изменением активности ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, супероксиддисмутазы) [5, 11, 13], тиолдисульфидного состояния [20], истощением внутриклеточного [24] и плазменного глутатиона [16, 17, 25].

Есть данные о том, что сочетание СД с хронической алкоголизацией проявляется более выраженными лабораторными признаками повреждения миокарда, углублением нарушений и декомпенсацией углеводного обмена и резко выраженными патологическими сдвигами со стороны показателей активности процессов свободнорадикального окисления [4].

Молекулярные механизмы влияния алкоголизации на развитие окислительного стресса при СД не изучены.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводили на самцах белых беспородных крыс массой 180—200 г. СД моделировали интраперитонеальным введением 160 мг/кг аллоксана тетрагидрата по модифицированной методике Н.А. Пальчиковой (1987 г.). Алкоголизацию вызывали введением 20%-ного раствора этанола в дозе 2 г/кг после кормления однократно, в течение 3, 7, 14 и 28 суток. Животные были разделены на 4 группы:

- в первую группу (К) вошли животные, получавшие по 1 мл 0,9%-ного раствора NaCl,
- во вторую группу (А) — животные, которым вводили алкоголь;
- третью группу (СД) составили крысы с явным хроническим СД;
- четвертую группу (СДА) — крысы с явным хроническим СД, которым вводили алкоголь.

Животные группы сравнения (СД) получали вместо алкоголя 0,9%-ный раствор NaCl. Через 24 ч после последнего воздействия животных декапитировали, выделяли надмитохондриальную и митохондриальную фракции ткани печени по стандартной методике. Исследовали Fe^{2+} -индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ) по Ю.А. Владимирову (1989 г.). Кинетику ХЛ обрабатывали с помощью компьютерной системы Counter-2005. В кинетике ХЛ оценивали: амплитуду быстрой вспышки (h); длительность латентного периода (r) от момента введения Fe^{2+} до начала развития медленной вспышки и светосумму (S), амплитуду медленной вспышки (H) и тангенс угла наклона медленной вспышки (tg).

В надмитохондриальной фракции гомогенатов ткани печени также исследовали активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) (Т.В. Сирота, 1999), каталазы (М.А. Корольюк, 1988). В гомогенатах ткани печени определяли концентрацию восстановленного глутатиона и количество доступных HS-групп на единицу белка по методу J. Sedlak, R.H. Lindsay, основанному на реакции с ДТНБК (1968 г.).

Биометрический анализ осуществляли с использованием пакетов программ Statistica-6, SPSS 11.5, возможностей Microsoft Excel. Для проверки статистических гипотез применяли непараметрические методы на основании исключения нормальности для большинства исследуемых распределений с использованием критерия Шапиро—Уилка. Для сравнения числовых данных двух независимых групп применяли U-критерий Манна—Уитни, сравнения нескольких независимых групп, различающихся по степени воздействия исследуемого фактора — H-критерий Краскелла—Уоллиса, определения степени связи между двумя переменными, измеряемыми в ранговой шкале — непараметрический корреляционный анализ по Спирмену [10].

Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным 0,05.

Результаты исследования и обсуждение

При исследовании ХЛ установлено, что алкоголизация на фоне СД приводит к увеличению содержания гидроперекисей в надмитохондриальной фракции гомогенатов ткани печени (рис. 1), особенно в двухнедельной серии (на 89,1%, $p=0,049$). При однократном введении алкоголя на фоне СД длительность латентного периода (ЛП), отражающего скорость процессов СРО в зависимости от уровня антиоксидантов, увеличивается на 48,1% ($p=0,028$), а показатель светосуммы (S), соответствующий количеству образовавшихся перекисных радикалов на один ион железа и позволяющий оценить способность субстратов в препарате подвергаться процессам цепного перекисного окисления, уменьшается на 31,2% ($p=0,019$) наряду с высоким содержанием гидроперекисей (показатель h).

Через трое суток введения алкоголя на фоне СД длительность латентного периода остается больше, чем в группе сравнения СД, но уже намечается тенденция к ее сокращению, параллельно происходит активация цепных процессов СРО: показатель S выше, чем при СД без алкоголизации на 31% ($p=0,005$), амплитуда быстрой вспышки (БВ) — на 28% ($p=0,036$). При семидневной алкоголизации явления окислительного стресса прогрессируют: способность липидов к переокислению возрастает на 37,5% ($p=0,003$), длительность ЛП становится меньше, чем в контрольной группе, а величина h больше, чем в группе СД, на 46% ($p=0,016$). Возможно, укорочение длительно-

сти ЛП при недельной алкоголизации на фоне СД является закономерным результатом расходования антиоксидантов на нейтрализацию гидроперекисей и прерывание ПОЛ. При двухнедельной алкоголизации выраженное накопление гидроперекисей сопровождается исчезновением достоверных различий по показателям g и S. На 28-й день алкогольной интоксикации на фоне СД наблюдается более высокая величина светосуммы ХЛ надмитохондриальной фракции ткани печени (на 50,5%, $p=0,022$). Таким образом, снижение способности липидов к переокислению в начале эксперимента (1-е сутки) уже после трехкратного введения алкоголя сменяется увеличением показателя светосуммы ХЛ надмитохондриальной фракции, который возрастает через четыре недели алкоголизации, становясь ведущим нарушением, следующим за накоплением гидроперекисей.

При исследовании ХЛ митохондрий (рис. 2) различия между группами СД и СДА наблюдаются только через 24 ч эксперимента: продолжительность ЛП больше на 21,3% ($p=0,041$). Угнетение и снижение скорости СРО сочетается с высоким содержанием гидроперекисей в надмитохондриальной фракции. Возможно, токсический стресс на фоне СД вызвал более раннюю и сильную активацию СРО в ткани печени. Через сутки после воздействия мы наблюдаем уже ответную компенсаторную реакцию, последствия истощения субстратов и накопление гидроперекисей как показатель окислительного стресса, развивающегося в более ранние сроки.

По данным ХЛ видно, что «кажущееся» антиоксидантное действие однократного введения алкоголя (увеличение длительности ЛП и снижение светосуммы) сочетается с признаками активации СРО (увеличение БВ), дальнейшее введение алкоголя способствует развитию окислительного стресса в надмитохондриальной фракции гомогенатов ткани печени. Первичным нарушением оказывается накопление гидроперекисей, что может быть связано с дисфункцией первого уровня антиоксидантной защиты, представленного супероксиддисмутазой (СОД) и каталазой и призванного обезвреживать потенциально опасные активные формы кислорода — супероксидный радикал и перекись водорода [6].

Угнетение активности каталазы при алкоголизации на фоне СД более выражено, чем в группе сравнения, особенно при однократном (на 24,1%, $p=0,023$) и двухнедельном (на 25,9%, $p=0,014$) введении алкоголя (рис. 3), когда по

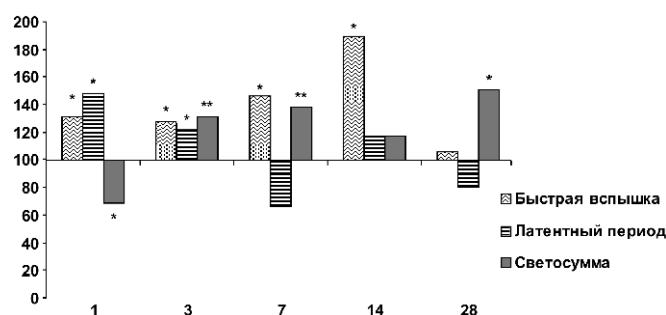


Рис. 1. Показатели Fe^{2+} -индуцированной ХЛ надмитохондриальной фракции ткани печени крыс при алкоголизации на фоне аллоксанового СД, % по отношению к группе СД; степень достоверности различий с группой сравнения (СД) по U-критерию Манна—Уитни: * — $0,01 < p \leq 0,05$; ** — $0,001 < p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$

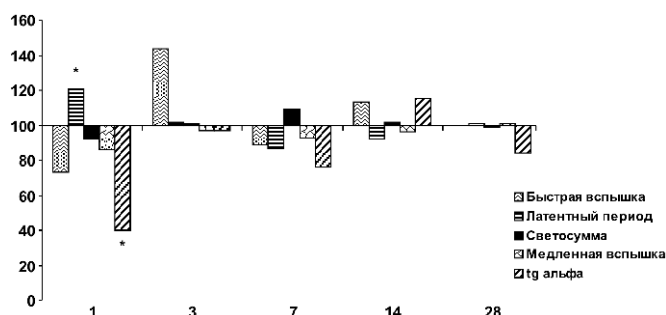


Рис. 2. Показатели Fe^{2+} -индуцированной ХЛ митохондриальной фракции гомогенатов ткани печени крыс при алкоголизации на фоне аллоксанового СД, % по отношению к группе СД; степень достоверности различий с группой сравнения (СД) по U-критерию Манна—Уитни: * — $0,01 < p \leq 0,05$; ** — $0,001 < p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$

Таблица 1

Параметры Fe²⁺-индуцированной ХЛ надмитохондриальной фракции ткани печени крыс
при однократном введении алкоголя на фоне аллоксанового СД

Показатели ХЛ		Группы животных			
		К	А	СД	СДА
h, имп.	n	10	10	10	10
	Ниж. кв.	56	296	157	179
	Me	68	369,5	165	216
	Верх. кв.	76	401	171	298
	X±m	67,8±4,3	372,0±62,0	167,0±8,7	258,0±40,2
	P _U		<0,001 К	<0,001 К	<0,001 К 0,03 СД
г, с	n	10	10	10	10
	Ниж. кв.	140	296	58	80
	Me	153	369,5	77	114
	Верх. кв.	206	401	98	150
	X±m	164,0±11,8	372,0±62,0	76,8±9,3	138,0±24,3
	P _U		0,034 К	<0,001 К	0,028 СД
S, тыс. имп. за 3 мин	n	10	10	10	10
	Ниж. кв.	6,90	5,26	12,4	8,48
	Me	7,58	7,0	12,4	8,5
	Верх. кв.	8,18	12,4	14,6	8,93
	X±m	7,41±0,31	6,56±1,35	11,3±1,17	8,37±1,56
	P _U			0,002 К	0,019 СД

Примечание. P_U — уровень значимости различий с указанной группой К, А, СД по U-критерию Манна — Уитни; Me — медиана; Ниж. кв. — нижний квартиль; Верх. кв. — верхний квартиль; n — количество животных в группе

Таблица 2

Параметры Fe²⁺-индуцированной ХЛ надмитохондриальной фракции ткани печени крыс
при алкоголизации на фоне аллоксанового СД (28 суток)

Показатели ХЛ		Группы животных			
		К	А	СД	СДА
h, имп.	n	10	10	10	8
	Ниж. кв.	107	132	90	94
	Me	124,5	201	112	118,5
	Верх. кв.	168	294	163	192
	X±m	133±10,3	210±30,1	126±14,1	140±21,3
	P _U				
г, с	n	10	10	10	8
	Ниж. кв.	74	62	54	48
	Me	83	72	65	52
	Верх. кв.	88	78	78	64
	X±m	80,4±5,5	71,0±3,2	65,4±3,9	55,5±4,1
	P _U			0,021 К	0,009 К 0,011 А
S, тыс. имп. за 3 мин	n	10	10	10	8
	Ниж. кв.	8,04	7,69	5,75	9,14
	Me	8,38	8,35	7,44	11,2
	Верх. кв.	8,69	7,96	6,41	11,2
	X±m	7,83±0,43	8,15±0,26	8,03±0,77	11,0±0,87
	P _U				0,009 К 0,022 СД 0,017 А

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1

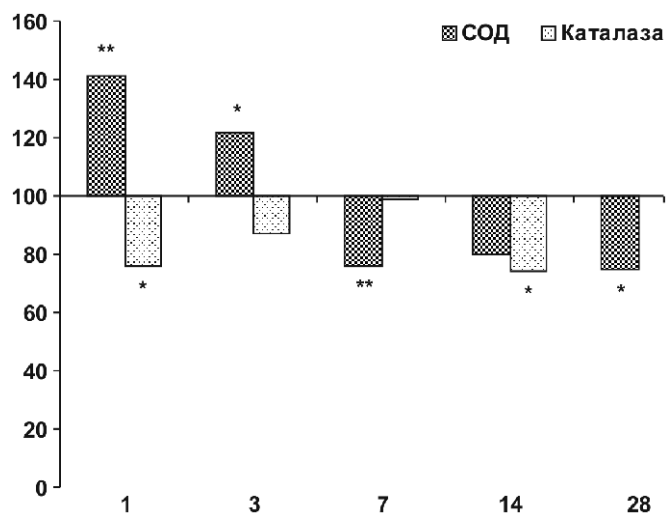


Рис. 3. Активность ферментов первой линии АОЗ цитозольной фракции ткани печени крыс при алкоголизации на фоне аллоксанового СД, % по отношению к группе СД; степень достоверности различий с группой сравнения (СД) по U-критерию Манна—Уитни: * — $0,01 < p \leq 0,05$; ** — $0,001 < p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$

ХЛ выявляется увеличение амплитуды БВ. Активность СОД при острой алкоголизации выше (на 40,1%, $p=0,008$ через 24 ч и на 21,9%, $p=0,016$ через трое суток), а при дальнейшей — ниже (на 23,9%, $p=0,007$ через 7 суток и на 24,9%, $p=0,014$ через 28 суток), чем в группе СД. Подавление активности СОД может быть связано с развитием выраженного ацидоза [14], характерного для СД и усиливающегося при алкогольной интоксикации.

Накопление гидроперекисей при острой алкоголизации, по-видимому, обусловлено дискоординацией ферментов антиокислительной защиты, что подтверждается отрицательной корреляцией между СОД и каталазой после трехкратного введения алкоголя: $r=-0,778$, $p=0,023$. Такая ситуация возможна, например, при содержании в ткани микромолярных концентраций перекиси водорода [15].

Дисфункция первой линии АОЗ благоприятствует образованию гидроксильного радикала, который индуцирует окисление полиеновых липидов. Образовавшиеся липидные радикалы устраняются второй линией защиты, представленной цепью неферментативных антиоксидантов, среди которых ключевая роль принадлежит восстановленному глутатиону [6, 7, 15]. Глутатион выполняет целый ряд функций в клетке, непосредственно и косвенно участвует в антиоксидантной защите, в том числе способен связываться с жизненно важными тиоловыми группами белков, предохраняя их от инактивации.

Концентрация глутатиона при введении алкоголя в течение недели выше на 55,9% ($p=0,009$), в остальные сроки достоверных различий с группой сравнения нет. Как отмечалось в работе Л.Ф. Панченко с соавторами [8], увеличение концентрации глутатиона в печени при форсированной алкоголизации может играть адаптивную роль и связано с активацией глутатионсинтезирующих ферментов посредством оксида азота, образующегося в результате работы индуцибельной изоформы NO-синтазы. На фоне СД данный тип реакции сохраняется. Через четыре недели алкоголизации при СД происходит снижение содержания доступных сульфгидрильных групп в ткани пе-

чени (рис. 4): в группе СДА данный показатель ниже на 16,5% ($p=0,021$), вероятно, вследствие окисления HS-групп белков.

Накопление гидроперекисей в надмитохондриальной фракции, кроме того, влечет за собой окислительное повреждение митохондрий, о чем свидетельствуют данные корреляционного и регрессионного анализа. В трехдневной серии появляется корреляция между величиной h ХЛ надмитохондриальной жидкости и ЛП ($r=-0,738$, $p=0,037$), амплитудой медленной вспышки ($r=0,810$, $p=0,015$), светосуммы ($r=0,833$, $p=0,01$), tg ХЛ митохондрий ($r=0,833$, $p=0,01$). Показатель быстрой вспышки надмитохондриальной фракции может влиять на светосумму ($y=0,046+2,87X$, $p=0,005$) и медленную вспышку ($y=1,61+140,0X$, $p=0,029$) митохондрий. Наличие положительной связи СОД и светосуммы ХЛ митохондрий ($r=0,648$, $p=0,043$), а также корреляций каталазы с показателями ХЛ митохондрий: ЛП ($r=0,839$, $p=0,002$), S ($r=-0,830$, $p=0,003$), tg ($r=-0,709$, $p=0,022$), говорит в пользу предположения о роли гидроперекисей в развитии митохондриального окислительного стресса.

Заключение

Полученные нами результаты согласуются с данными белорусских исследователей о повышении гепатотоксичности этанола на фоне предсуществующей активизации реакций перекисного окисления липидов и сниженного защитного антиоксидантного потенциала [1]. Алкоголизация влияет на состояние свободнорадикальных процессов при СД. Однократное введение алкоголя вызывает изменения в прооксидантно-/антиоксидантном статусе клеток печени, что выражается увеличением длительности ЛП ХЛ и снижением светосуммы у животных группы СДА. Однако некоторое угнетение ХЛ сочетается с высоким содержанием гидроперекисей в надмитохондриальной фракции, что связано с выраженной дискоординацией ферментов антиоксидантной защиты (СОД и каталазы). Накопление гидроперекисей может служить пусковым фактором развития свободнорадикального стресса в митохондриях печени. Возможно, гидроперекиси причастны к окислительному повреждению белков-транспортёров восстановленного глутатиона в митохондриях. Непродолжительная алкоголизация на фоне СД (7 суток) сопровождается накоплением восстановленного глутатиона в ткани печени. Длительное введение алкоголя на фоне СД приводит к снижению содержания доступных сульфгидрильных групп в ткани печени через четыре недели алкоголизации.

Список литературы

1. Амбрушкевич Ю.Г., Бушма М.И. Биохимические механизмы, ответственные за развитие гепатотоксичности этанола // До-стижения медицинской науки Беларуси. — 2001. — Вып. 6 (www.med.by)
2. Бойко Е.Р., Колесников М.А., Вахнина Н.А. и др. Молекулярные механизмы процессов свободнорадикального окисления в динамике острых алкогольных психозов у жителей Крайнего Севера // Наркология. — 2006. — №11. — С. 40—44.
3. Высокогорский В.Е., Ефременко Е.С., Грицаев И.Е. Характеристика обмена глутатиона при алкогольном абстинентном синдроме // Наркология. — 2006. — №8. — С. 59—61.
4. Индутный А.В., Быков Д.Е. Биохимические факторы и критерии повреждения миокарда у больных сахарным диабетом, злоупотребляющих алкоголем / Омский научный вестник (Приложение. Ч. 1). — 2006. — №3 (37). — С. 105—108.

5. Казаков С.А. Состояние углеводного обмена и активности антиоксидантных ферментов у крыс с аллоксановым диабетом // Патогенез, клиника и терапия экстремальных и терминальных состояний: Материалы научно-практ. конф. / Под ред. проф. В.Т. Долгих. — Омск: Изд-во Омской гос. мед. академии, 1998. — 130 с.
6. Мазо В.К. Глутатион как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1998. — №1. — С. 47—53.
7. Панкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология. — 2000. — №7. — С. 48—52.
8. Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В., Перегуд Д.И. и др. Активность синтазы оксида азота и окислительный стресс в печени крыс в условиях форсированной алкоголизации // Юмский научный вестник: актуальные проблемы биохимии патологических процессов (приложение к 21 вып.). — 2002. — М12. — С. 34—37.
9. Пирожков С.В., Панченко Л.Ф. Использование антиоксидантов для лечения абстинентных и постабстинентных расстройств у больных алкоголизмом // Наркология. — 2006. — №4. — С. 54—59.
10. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. — М.: Изд-во РАМН, 2000. — 52 с.
11. Сахарный диабет: ангиопатии и окислительный стресс (пособие для врачей) / Дедов И.И., Балаболкин М.И. и др. — 2003. — 86 с.
12. Сидоров П.И., Соловьев А.Г., Новикова И.А. Форма потребления алкоголя и течение сахарного диабета // Наркология. — 2002. — №5. — С. 28—33.
13. Снегирева Л.С., Варварина Г.Н., Боровков Н.Н. и др. Оценка антиоксидативной активности и клинической эффективности препарата церулоплазмин у больных микрососудистыми осложнениями сахарного диабета // Актуальные проблемы эндокринологии: Сб. науч. работ. — Н. Новгород, 2005. — С. 25—30.
14. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Артюнян А.В. и др. Свободнорадикальное окисление и старение / Под ред. акад. А.Д. Ноздрачева. — СПб: Наука, 2003. — 327 с.
15. Черданцев Д.В., Винник Ю.С., Каспаров Э.В. Диагностики и лечение окислительного стресса при остром панкреатите. — Новосибирск, 2002. — 147 с.
16. Awadallah R., El-Dessoukey E.A., Doss H. et al. Blood-reduced glutathione, serum ceruloplasmin and mineral changes in juvenile diabetes // Z. Ernährungswiss. — 1978. — №17 (2). — P. 79—83.
17. Bravi M.C., Pietrangeli P., Laurenti O. et al. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients // Metabolism. — 1997. — №46 (10). — P. 1194—1198.
18. Emanuele N.V. et al. Consequences of alcohol use in diabetics // Alcohol Health & Research World. — 1998. — Vol. 22, №3. — P. 211—219.
19. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Collet A. et al. Oxidative stress and alcoholic liver disease // Alcohol Health & Research World. — 1997. — Vol. 21, №4. — P. 321—324.
20. Hayden M.R., Tyagi S.C., Kerklo M.M. et al. Type 2 Diabetes Mellitus as a Conformational Disease // JOP. J. Pancreas (Online). — 2005. — №6 (4). — P. 287—302.
21. Ozaras R., Tahan V., Aydin S. et al. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat // World J. Gastroenterol. — 2003. — №9 (1). — P. 125—128.
22. Rimm E.B.; Williams P.; Fosher K. Et al. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors // British Medical Journal. — 1999. — Vol. 319. — P. 1523—1528.
23. Sastre J., Mifiana J.B., Alguaci P. et al. Chronic ethanol feeding causes oxidative stress in rat liver mitochondria // Free Radic. Res. — 1999. — №30. — P. 325—327.
24. Seckin S., Alptekin N., Kocak-Toker N. et al. Lipid peroxide and glutathione levels in the liver and its subcellular fractions of alloxan diabetic rats // Horm. Metab. Res. — 1993. — №25 (8). — P. 444—445.
25. Tachi Y., Okuda Y., Bannai C. et al. Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissue // Life Sci. — 2001. — №69 (9). — P. 1039—1047.