

## Манифестация и патохимические предпосылки повреждения миокарда при сочетании хронической интоксикации алкоголем и сахарного диабета

ИНДУТНЫЙ А.В.

к.м.н., доцент кафедры биохимии и лабораторной медицины  
с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО,  
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования (ГОУ ВПО)  
Омская государственная медицинская академия (ОГМА) Росздрава

ВЫСОКОГОРСКИЙ В.Е.

д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и лабораторной медицины  
с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО, ГОУ ВПО ОГМА, Омск

БЫКОВ Д.Е.

аспирант кафедры биохимии и лабораторной медицины  
с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО, ГОУ ВПО ОГМА, Омск

*Представлены результаты исследования уровня кардиоспецифичного тропонина I в плазме крови крыс, перенесших хроническую алкогольную интоксикацию на фоне сахарного диабета. Дана характеристика гликемии, проведена оценка содержания продуктов свободнорадикального окисления (тиобарбитурат-реактивных субстанций, окисленно-модифицированных белков) в сердце экспериментальных животных. Выявлено, что при сахарном диабете хроническая алкогольная интоксикация сопровождается повреждением миокарда, проявившимся значительным возрастанием уровня кардиоспецифичного тропонина I в плазме крови. В сердце данных особей содержание продуктов свободнорадикального окисления также более значительно повышено, в сравнении с соответствующими сдвигами при сахарном диабете вне алкоголизации и с изменениями при изолированном хроническом воздействии алкоголя. Полученные данные свидетельствуют, что в качестве патохимических предпосылок обнаруженного повреждения миокарда при сочетании сахарного диабета и хронической алкоголизации можно рассматривать гиперактивацию свободнорадикальных процессов в сердце.*

**Ключевые слова:** сахарный диабет, хроническая алкогольная интоксикация, кардиальный тропонин I, повреждение миокарда, окислительный стресс, тиобарбитурат-реактивные субстанции, окисленно-модифицированные белки

### Введение

Важным фактором поражения сердца при сахарном диабете является гиперпродукция свободных радикалов [1]. Данные нарушения предрасполагают к развитию в сердце окислительного стресса и могут стать триггером апоптотических и некротических процессов [14].

Известно, что риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний значительно повышается при длительном употреблении алкоголя [12]. Установлено, что хроническая алкоголизация сопутствует сахарному диабету, по крайней мере, у 8,3% больных [6]. Злоупотребление алкоголем способствует прогрессированию сосудистых осложнений сахарного диабета [13, 14]. Повреждающее действие на сердце способны оказывать этанол и продукты его биотрансформации, включая свободнорадикальные соединения [15, 16]. Однако характер, патохимические механизмы и результаты влияния на сердце хронической алкогольной интоксикации при сахарном диабете не вполне определены.

### Материалы и методы

Эксперимент проводили на половозрелых белых крысах-самцах породы Wistar массой 220—240 г. Животных разделяли на 4 группы: интактные крысы (контрольная группа — КГ); животные, подвергнутые хронической алкогольной интоксикации (АЛК); животные с экспериментальным сахарным диабетом (СД); крысы, перенесшие хроническую алкогольную интоксикацию в течение экспериментального СД (СД+АЛК). Для формирования 2-месячной хронической алкогольной интоксикации использовали методику, предложенную Cascales C. et al. [8]. Алкоголизацию проводили 15%-ным раствором этилового спирта, который предоставляли экспериментальным животным в качестве единственного источника жидкости. Суточное потребление алкоголя (в пересчете на чистый этанол) крысами группы АЛК и СД+АЛК составило  $5,35 \pm 0,27$  мл·кг<sup>-1</sup> и  $5,51 \pm 0,39$  мл·кг<sup>-1</sup> массы тела животного соответственно.

СД моделировали путем введения стрептозотоцина («MP Biomedicals LLC», США) в боковую вену

хвоста ( $15 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  массы тела; в виде раствора, приготовленного на  $0,05 \text{ М}$  цитратном буфере,  $\text{pH} = 4,5$ ), в соответствии с рекомендациями Zhang F. et al. [17]. Животным контрольной группы делали внутривенную инъекцию эквивалентного объема цитратного буфера. Для моделирования хронической алкогольной интоксикации, перенесенной на протяжении сахарного диабета, начиная со вторых суток после введения стрептозотоцина и в течение двух последующих месяцев, животным предоставляли доступ к раствору этанола в качестве единственного источника жидкости. Особи контрольной и экспериментальных групп питались стандартным сухим твердым кормом на протяжении всего эксперимента. Корм и жидкость были доступны ad libitum.

Крыс выводили из эксперимента с соблюдением правил эвтаназии, согласно рекомендациям [5]. Для биохимических исследований использовали сердце и плазму крови. Немедленно после извлечения сердце освобождали от крови и гомогенизировали в  $0,15 \text{ М}$  растворе KCl в соотношении 1:5 (масса ткани/объем среды выделения). После центрифугирования гомогенатов ( $4000 \text{ g}$ ,  $10 \text{ мин}$ ) получали надосадочную жидкость, которую использовали для определения исследуемых биохимических параметров. Все процедуры выделения биоматериала проводили при температуре  $+4^\circ\text{C}$ . В плазме крови измеряли концентрацию глюкозы гексокиназным методом с использованием набора реагентов «ГЛЮКОЗА-ГК-НОВО-А» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Уровень кардиального тропонина I (сTnI) определяли иммуноферментным методом (тест-система «Rat Cardiac Tn-I ELISA», Life Diagnostics, West Chester, PA) с детекцией результатов анализа на планшетном фотометре «Multiscan EX» (Финляндия). Содержание тиобарбитурат-реактивных субстанций (ТБК-РС) оценивали колориметрически [7] через эквивалентное количество малонового диальдегида (в  $\text{мкМ} \cdot \text{мг}^{-1}$  белка ткани). Уровень окислительной модификации белков (ОМБ) определяли спектрофотометрическим методом, предложенным Е.Е. Дубининой

[2]. Степень окислительной модификации белков выражали в виде концентрации динитрофенилгидразонов в  $\text{нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$  белка гомогената сердца. Общее содержание белка определяли по методу Лоури [12]. Спектрофотометрический и фотоколориметрический анализ проводили на спектрофотометре «UNICO 2802S UV/VIS» (США), оснащенном проточной кюветой.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с применением пакета статистических программ SPSS 11.5 (SPSS Inc., США). Результаты представлены как min-Me(LQ-HQ)-max, где min — наименьшее значение, Me — медиана, LQ — нижний (25-й) квантиль, HQ — верхний (75-й) квантиль, max — наибольшее значение. Численность выборки обозначена n. Различия между значениями показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Нулевой считали гипотезу о совпадении медианных значений двух независимых выборок. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принимали  $\rho = 0,05$  [4].

## Результаты и обсуждение

Представленные результаты свидетельствуют, что у особей с сахарным диабетом без алкоголизации (группа СД) отсутствуют грубые повреждения сердца с нарушением целостности кардиомиоцитов, но наблюдаются проявления окислительного стресса на фоне гипергликемии. Так, в группе СД не зарегистрировано статистически значимого изменения уровня сTnI в плазме крови (табл. 1). При этом в сердце животных данной группы выявлены признаки активации свободнорадикальных процессов (рис. 1, 2). Обнаружено увеличение в 4,9 раза (Me:  $0,34 \text{ мкМ} \cdot \text{мг}^{-1}$  против  $0,07 \text{ мкМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ ;  $\rho < 0,001$ ) содержания ТБК-РС и повышение уровня ОМБ на 20% (Me:  $1,21 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$  против  $1,01 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ ;  $\rho < 0,01$ ) при сахарном диабете по сравнению с КГ. Уровень глюкозы в плазме крови (табл. 2) особей группы СД в 1,9 раза превосходит значения в контроле ( $\rho < 0,001$ ).

Таблица 1

Уровень кардиоспецифичного тропонина I в плазме крови при сочетании сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации,  $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$

| Группы животных | n  | min  | Me (LQ-HQ)           | max   | p     |
|-----------------|----|------|----------------------|-------|-------|
| КГ              | 15 | 0,01 | 0,10 (0,01—0,74)     | 0,98  | —     |
| СД              | 18 | 0,01 | 0,10 (0,01—0,63)     | 3,06  | 0,767 |
| АЛК             | 10 | 0,01 | 0,28 (0,01—0,58)     | 0,68  | 0,810 |
| СД+АЛК          | 14 | 0,01 | 1,97 (0,21—3,48) *** | 16,52 | 0,009 |

Примечание. n — численность выборки, значения p представлены по отношению к контрольной группе, \*\* — статистически значимое отличие по сравнению с группой СД при  $\rho = 0,008$ ; # — по сравнению с группой АЛК при  $\rho = 0,045$  (U-тест Манна—Уитни)

Таблица 2

Уровень глюкозы в плазме крови при сочетании сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации, ммоль<sup>-1</sup>

| Группы животных | n  | min  | Me (LQ-HQ)             | max   | p      |
|-----------------|----|------|------------------------|-------|--------|
| КГ              | 24 | 5,40 | 7,55 (6,68—8,28)       | 10,40 | —      |
| СД              | 29 | 6,20 | 14,10 (8,70—27,0)      | 34,06 | <0,001 |
| АЛК             | 25 | 4,50 | 6,80 (6,25—7,50)       | 8,10  | 0,028  |
| СД+АЛК          | 22 | 7,40 | 13,60 (9,40—28,43) ### | 33,30 | <0,001 |

Примечание. n — численность выборки, значения p представлены по отношению к контрольной группе, ### — статистически значимое отличие по сравнению с группой АЛК (p<0,001; U-тест Манна—Уитни)

К числу вероятных причин обнаруженного увеличения в сердце концентрации тиобарбитурат-реактивных веществ можно отнести характерное для сахарного диабета повышение интенсивности процессов липопероксидации [1], а также — снижение активности в сердце ферментов, утилизирующих липидные перекиси [1, 10]. В присутствии пероксидных соединений белки способны вступать в реакции металлкаatalизируемого окисления [3], что может служить одной из причин обнаруженного увеличения содержания карбонильных производных протеинов. Окислительная модификация белков проявляется фрагментацией или агрегацией белковых молекул [3]. Формирование агрегатов окисленно-модифицированных белков в сердце ограничивает их элиминацию и, кроме того, является одним из апоптотических сигналов для кардиомиоцитов [11].

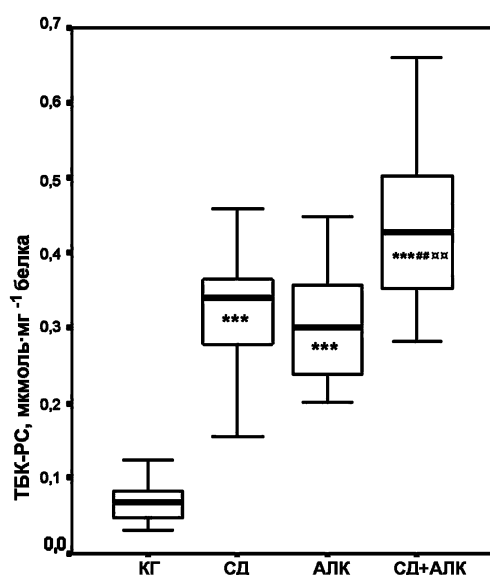


Рис. 1. Содержание тиобарбитурат-реактивных субстанций в сердце при сочетании сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации:

\*\*\* — по сравнению с контрольной группой при p<0,001; по сравнению с группой СД — ## — при p<0,01; по сравнению с группой АЛК — °° — при p<0,01 (U-тест Манна—Уитни)

Признаки развития окислительного стресса в сердце при отсутствии биомаркерного проявления деструкции кардиомиоцитов обнаружены нами и в случае изолированного воздействия алкоголя. Уровень cTnI в плазме крови особей группы АЛК оставался в пределах диапазона значений контрольной группы, а в сердце содержание тиобарбитурат-реактивных веществ (рис. 1) было увеличено в 4,4 раза (Me: 0,31 мкмоль·мг<sup>-1</sup> против 0,07 мкмоль·мг<sup>-1</sup>; p<0,001). Концентрация глюкозы в плазме крови у животных группы АЛК (табл. 2) оказалась на 10% ниже (p = 0,028) по сравнению с интактными особями, что отражает наличие гипогликемического эффекта этанола [16]. Развитие окислительного стресса в тканях при хронической интоксикации этанолом наряду с увеличением активности системы цитохрома P450 и оксидаз [15] может быть следствием гипоксии, а так-

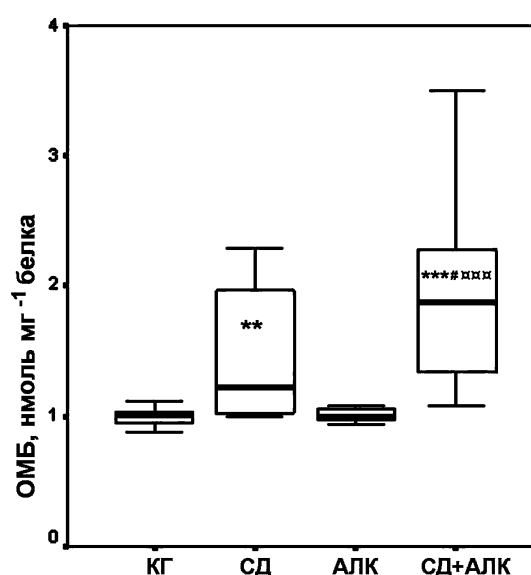


Рис. 2. Уровень окисленно-модифицированных белков в сердце при сочетании сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации:

по сравнению с контрольной группой — \*\* — при p<0,01 и \*\*\* — при p<0,001; по сравнению с группой СД — # — при p<0,05; по сравнению с группой АЛК — °°° — при p<0,001 (U-тест Манна—Уитни)

**Общее содержание белка в гомогенатах сердца  
при сочетании сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации, мг·г<sup>-1</sup> ткани**

| Группы животных | n  | min   | Me (LQ-HQ)          | max   | p    |
|-----------------|----|-------|---------------------|-------|------|
| КГ              | 20 | 24,82 | 36,46 (32,59—38,23) | 43,31 | —    |
| СД              | 25 | 23,68 | 36,05 (32,61—38,30) | 41,75 | 0,75 |
| АЛК             | 24 | 24,92 | 38,97 (32,30—51,87) | 61,42 | 0,80 |
| СД+АЛК          | 25 | 23,72 | 36,21 (30,48—37,40) | 41,90 | 0,66 |

Примечание. n — численность выборки, p — значение статистического уровня значимости отличия по отношению к контрольной группе

же результатом понижения активности антиоксидантных ферментов [9].

Характерно, что содержание в сердце ТБК-РС у животных групп СД и АЛК увеличено практически в равной степени, а уровень ОМБ повышен только при сахарном диабете. Можно предположить, что при изолированном воздействии алкоголя наблюдается главным образом активация процессов перекисного окисления липидов вследствие выраженного мембранотропного влияния этанола и продуктов, образующихся при его окислении [16]. При сахарном диабете могут быть преимущественно нарушены этапы элиминации ОМБ. В пользу такого предположения свидетельствуют данные об ослаблении убиквитин-зависимой деградации окислено-модифицированных протеинов при сахарном диабете [11].

Сочетание сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации, согласно полученным нами данным, отличается повреждением сердца с нарушением целостности кардиомиоцитов и сопровождается более выраженным окислительным стрессом. Уровень cTnI в плазме крови крыс группы СД+АЛК резко повышен по сравнению со всеми группами сравнения (табл. 1) и в 19,7 раза превышает значение медианы для интактных животных ( $p = 0,009$ ), что отражает наличие выраженной миокардиодеструкции. В сердце особей данной группы значительно повышен уровень продуктов свободнорадикальной природы (рис. 1, 2). Содержание ТБК-РС увеличено в 6,3 раза (Me: 0,44 мкМ·мг<sup>-1</sup> против 0,07 мкМ·мг<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ), а уровень ОМБ — на 85% (Me: 1,87 нМ·мг<sup>-1</sup> против 1,01 нМ·мг<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ), по отношению к группе интактных животных. При этом концентрация тиобарбитурат-реактивных веществ в сердце животных группы СД+АЛК оказалась на 29% (Me: 0,44 мкМ·мг<sup>-1</sup> против 0,34 мкМ·мг<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ), а ОМБ — на 55% (Me: 1,87 нМ·мг<sup>-1</sup> против 1,21 нМ·мг<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ) выше соответствующих значений неалкоголизированных особей с сахарным диабетом. По отношению к группе АЛК обнаружено увеличение на 42% (Me: 0,44 мкМ·мг<sup>-1</sup> против

0,31 мкМ·мг<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ) уровня ТБК-РС и повышение в 1,9 раза (Me: 1,87 нМ·мг<sup>-1</sup> против 0,99 нМ·мг<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ) концентрации ОМБ. Характерно, что отмеченные межгрупповые различия по содержанию ОМБ обнаружены при практически равном уровне белка в исследуемом биологическом материале (табл. 3). Это позволяет считать, что повышение содержания карбонильных групп в протеинах происходит вследствие более активной продукции свободных радикалов и/или более выраженного снижения антирадикальной устойчивости белковых молекул [2]. Отсутствие статистически значимых различий по уровню глюкозы крови между группами СД и СД+АЛК в определенной степени исключает взаимосвязь усиления окислительного стресса с изменением глубины нарушений углеводного обмена. Увеличению уровня ТБК-РС и карбонильных производных белков в сердце может способствовать снижение активности супероксиддисмутазы и ферментов антиперекисной защиты, характерное для хронической интоксикации этанолом [9].

Полученные данные свидетельствуют, что при сочетании сахарного диабета и хронической алкоголизации развивается повреждение миокарда, одной из причин которого может быть гиперактивация свободнорадикальных процессов в сердце.

### Выводы

1. При сочетании сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации обнаружено повреждение миокарда, проявившееся значительным возрастанием уровня кардиоспецифичного тропонина I в плазме крови.

2. Содержание продуктов липопероксидации и карбонильной модификации белков в сердце более значительно повышено при сочетании сахарного диабета и хронической алкогольной интоксикации в сравнении с соответствующими сдвигами при сахарном диабете вне алкоголизации и с изменениями при изолированном хроническом воздействии алкоголя.

## Список литературы

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Современные возможности профилактики сахарного диабета 2 типа // Рус. мед. журнал. — 2007. — №11. — С. 6—10.
2. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед. химии. — 1995. — №41. — С. 24—26.
3. Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В., Леонова Н.В., Морозова М.Г., Ковругина С.В., Смирнова Т.А. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона // Биохимия. — 2002. — Т. 67. — С. 413—421.
4. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. — М.: Изд-во РАМН, 2000. — 52 с.
5. Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 №755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».
6. Сидоров П.И., Соловьев А.Г., Новикова И.А. Форма потребления алкоголя и течение сахарного диабета // Наркология. — 2002. — №5. — С. 28—33.
7. Стальная Н.О., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 66—68.
8. Cascales C., Benito M., Cascales M., Caldes T., Santos-Ruiz A. The effect of chronic ethanol administration on lipogenesis in liver and adipose tissue in the rat // Br. J. Nutr. — 1983. — №3. — P. 549—553.
9. Das S.K., Vasudevan D.M. Alcohol-induced oxidative stress // Life Sci. — 2007. — №3. — P. 177—187.
10. Ford E.S. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence // Diabetes Care. — 2005. — №7. — P. 1769—1778.
11. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells // The FASEB J. — 1997. — №11. — P. 526—534.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — №1. — P. 265—275.
13. Moss S.E., Klein R., Klein B.E. The association of alcohol consumption with the incidence and progression of diabetic retinopathy // Ophthalmology. — 1994. — №101. — P. 1962—1968.
14. Niedowicz D.M., Daleke D.L. The role of oxidative stress in diabetic complications // Cell Biochem. Biophys. — 2005. — №2. — P. 289—330.
15. Panchenko L.F., Pirozhkov S.V., Popova S.V., Antonenkov V.D. Effect of chronic ethanol treatment on peroxisomal acyl-CoA oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart // Experientia. — 1987. — №5. — P. 580—581.
16. Preedy V.R., Patel V.B., Reilly M.E., Richardson P.J., Falkous G., Mantle D. Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac muscle // Front Biosci. — 1999. — №4. — P. 58—66.
17. Zhang F., Li G., Ding W. et al. The Rat Model of Type 2 Diabetic Mellitus and Its Glycometabolism Characters // Exp. Anim. — 2003. — №5. — P. 401—407.

## MANIFESTATION AND PATHOCHEMICAL PRECONDITIONS OF HEART DAMAGE BY COMBINATION OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION WITH DIABETES MELLITUS

INDUTNY A.V., BYKOV D.E., VYSOKOGORSKY V.E.

Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia

*The research results of plasma cardiac troponin I levels, glycemia, contents of free radical oxidation products (thiobarbiturate-reactive substances, oxidized-modified proteins) in heart of diabetes mellitus rats with chronic alcohol intoxication are presented. It is shown, that at presence of a diabetes mellitus the chronic alcohol consumption induce myocardial damage, which was manifested as elevation of plasma cardiac troponin I level. It is also more considerably increased the contents of thiobarbiturate-reactive substances and oxidizing modification of proteins products in animals heart at combination of the diabetes with chronic alcohol consumption, in comparison with changes at the diabetes mellitus outside of alcoholization and with changes at the isolated chronic alcohol influence. Our results indicate that a free radical processes hyperactivation in heart may be one of more pathochemical preconditions the myocardial damage, which was shown in combination diabetes mellitus and chronic alcohol intoxication.*

**Key words:** diabetes mellitus, chronic alcohol intoxication, cardiac troponin I, myocardial damage, thiobarbiturate-reactive substances, oxidative-modified proteins