

# ПОКАЗАТЕЛИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ САМОК КРЫС ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ

*Г.А. Ковалёв, Д.В. Черкашина, А.Ю. Петренко*

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

Институт проблем криобиологии и криомедицины, Харьков

**Ключевые слова:** алкогольное поражение печени, самки, крысы, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

В современном обществе широко распространено хроническое употребление спиртных напитков [5]. В частности, к началу третьего тысячелетия в Украине официально зарегистрировано 1,5% населения, злоупотребляющего алкоголем [2]. Однако реально эти цифры гораздо выше, поскольку сюда вошли только люди, попавшие в поле зрения наркологических диспансеров и имеющие диагноз «алкоголизм». Этанол относят к прямым гепатотоксичным агентам [8, 9], который, несмотря на открытие многообразных этиологических факторов поражения печени, по сегодняшний день остается одним из ведущих [3]. Следует отметить рост хронического злоупотребления алкоголем среди женщин [9]. Этот факт заслуживает особого внимания, так как у женщин алкогольное поражение печени (АПП) развивается при употреблении меньших доз, возникает быстрее и протекает более тяжело, чем у мужчин [9, 11]. Одним из важных механизмов негативного действия этанола и его метаболита — ацетальдегида является развитие оксидативного стресса [3, 10]. В настоящее время существует достаточно много научных публикаций, посвященных воздействию алкоголя на прооксидантно-антиоксидантный баланс печени. Однако подавляющее большинство экспериментальных исследований выполнены на самцах, данные о влиянии этанола на состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени самок разрознены и встречаются редко. Важность таких сведений можно проиллюстрировать исследованиями А. Nanji и соавторов, согласно которым тяжесть повреждения печени у самок крыс может быть связана с более высоким уровнем свободнорадикальных процессов по сравнению с самцами [11]. Учитывая несовершенство существующих методов лечения АПП, уточнение механизмов влияния этанола может сыграть важную роль в разработке новых терапевтических подходов, доклиническая апробация которых невозможна без постановки экспериментов на животных.

Таким образом, целью работы явилась оценка влияния алкоголя на интенсивность ПОЛ и активность ферментов системы антиоксидантной защиты печени самок крыс при алкогольном поражении.

## Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самок ( $n = 14$ ). На момент начала форми-

рования модели возраст животных составлял 3 мес. В качестве контроля использовали крыс того же пола и возраста, получавших аналогичную диету, но без этанола. АПП моделировали, как описано нами ранее [6]. Модель включает в себя три этапа: первый — отбор животных, склонных к алкоголизации; второй — привыкание животных к алкоголю (2 нед); третий — интенсивная алкоголизация (11 нед). В это время вместо обычной диеты крысы получали 96% раствор этанола на стандартных кусочках белого хлеба 2 раза в 1 нед (побеги овса). Доза алкоголя составляла 14—18 г/кг в 1 сут.

В последний день эксперимента животных декапировали, печень перфузировали *in situ* изотоническим раствором натрия хлорида и готовили 25% гомогенат на 50 mM tris-HCl буфере, содержащем 50 mM NaCl (pH 7,4). В гомогенатах печени исследовали базальный уровень ТБК-активных продуктов согласно методу [1], показатель выражали в пмоль МДА/мг белка. Также изучали интенсивность индуцированного ПОЛ. Для этого гомогенат инкубировали 10 мин в среде (pH 7,4), содержащей 50 mM tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,25 mM аскорбата и 12  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>. Скорость накопления ТБК-активных продуктов определяли по методу [4], выражали в пмоль МДА/мг белка за 1 мин. Активность каталазы исследовали по убыли перекиси водорода при длине волны 240 нм [7], выражали в мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / мг белка за 1 мин. Активность глутатионпероксидазы определяли по убыли содержания восстановленного глутатиона, выражали в мкмоль GSSG / мг белка за 1 мин [12]. Содержание белка в гомогенате печени оценивали при помощи биуретового метода. Все измерения интенсивности поглощения проб проводили на спектрофотометре «Cary-50».

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи компьютерного пакета программ «Statistica 5.5» с использованием U критерия Манна—Уитни ( $P < 0,05$ ).

## Результаты и их обсуждение

Для оценки прооксидантного статуса клеток печени после формирования модели АПП были выбраны следующие показатели: базальный уровень ТБК-активных продуктов и интенсивность неферментативного Fe<sup>2+</sup>-аскорбатиндуцированного ПОЛ. К концу

експеримента базальний рівень ТБК-активних продуктів в експериментальній групі становив  $(773,3 \pm 89,7)$ , в контрольній —  $(272,3 \pm 12,1)$  пмоль МДА / мг белка. Швидкість накоплення ТБК-активних продуктів в експериментальній і контрольній групах становила  $(42,4 \pm 8,5)$  і  $(19,2 \pm 3,5)$  пмоль МДА / мг белка за 1 мин відповідно (рис. 1).

Таким образом, в ходе развития АПП у животных наблюдалось увеличение базального уровня в 2,8 раза и скорости накопления ТБК-активных продуктов в 2,2 раза, что свидетельствует о стимуляции процессов ПОЛ.

Состояние антиоксидантной системы печени алкоголизованных животных оценивали по изменению активности ее основных ферментативных составляющих. Так, глутатионпероксидазная активность в печени животных экспериментальной группы составляла  $(0,129 \pm 0,014)$ , контрольній —  $(0,203 \pm 0,02)$  мкмоль GSSG / мг белка за 1 мин. В то же время каталазная активность была на уровне  $(66,9 \pm 8,9)$  и  $(138,5 \pm 9,2)$  мкмоль  $H_2O_2$  / мг белка за 1 мин соответственно (рис. 2).

Приведенные результаты демонстрируют снижение глутатионпероксидазной активности в 1,6 раза и каталазной — в 2,1 раза в печени у алкоголизованных

животных, что свидетельствует об угнетении работы системы антиоксидантной защиты под действием этанола.

Необходимо отметить, что процессы ПОЛ в норме наблюдаются во всех органах и тканях организма и являются важным звеном метаболизма, которое находится под контролем системы антиоксидантной защиты. Оксидативный стресс развивается в условиях нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса под действием агентов, индуцирующих генерацию активных форм кислорода на фоне угнетения антиоксидантной активности. Длительное поступление алкоголя вызывает индукцию микросомальной P450-этанолокисляющей системы. В процессе микросомального перекисного окисления образуются потенциально опасные активные радикалы кислорода. При этом уровень эндогенных веществ, удаляющих свободные радикалы, снижен. Развивающийся оксидативный стресс приводит к нарушению функции основного структурного компонента клеточных мембран — фосфолипидов. Это ведет к повышению проницаемости мембран, нарушению трансмембранного транспорта, изменениям функционирования клеточных рецепторов и мембраносвязанных ферментов [3]. Усиление ПОЛ является одним

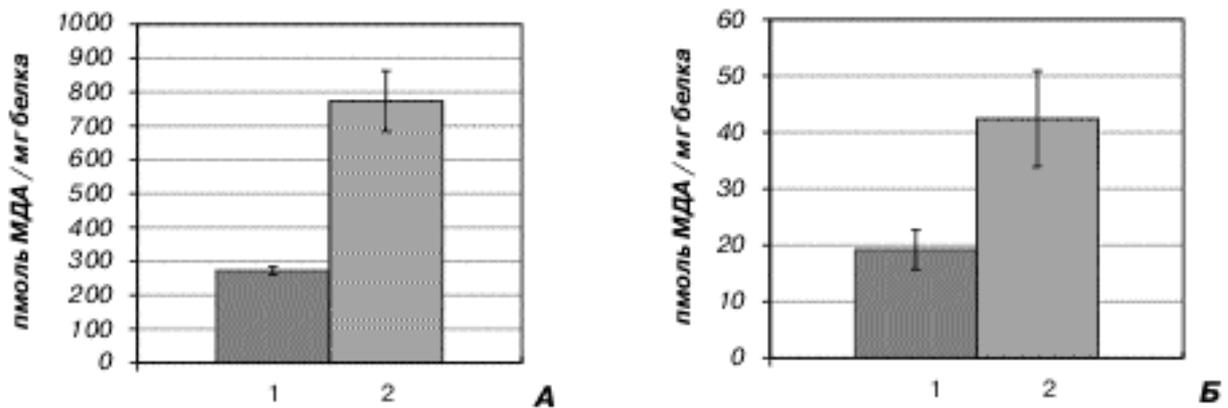


Рис. 1. Базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени животных контрольной (1) и экспериментальной (2) групп (А). Интенсивность индуцированного ПОЛ в печени животных контрольной (1) и экспериментальной (2) групп (Б)

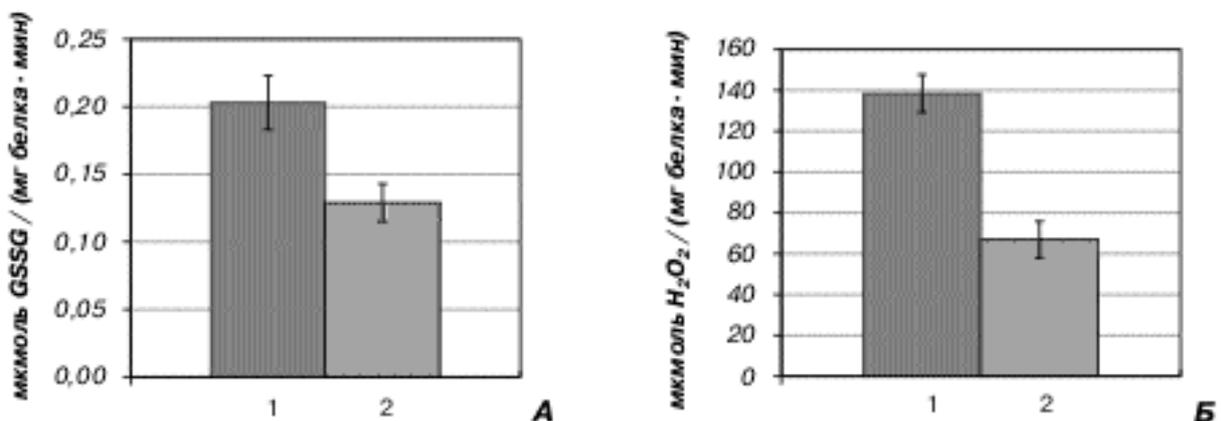


Рис. 2. Глутатионпероксидазная (А) и каталазная активность в печени животных контрольной (1) и экспериментальной (2) групп (Б)

из механизмов нарушения функции митохондрий: подавляется окисление жирных кислот и ацетальдегида, снижается активность цитохромксидазы, цепи дыхательных ферментов и угнетается окислительное фосфорилирование. Образующиеся при ПОЛ продукты распада активизируют клетки Ито и стимулируют синтез коллагена [9]. Терапия АПП сложна и пока еще недостаточно эффективна. Это связано с рядом причин, одной из которых можно назвать отсутствие лекарственных препаратов, способных контролировать патогенетические механизмы развития АПП, в том числе оксидативного стресса. Поэтому, помимо традиционного применения мембраностабилизирующих препаратов, активно исследуют возможности применения антиоксидантов (силлимарин, гептрал и другие). Появление лекарств, способных значительно снижать активность оксидативного стресса, может явиться эффективным методом уменьшения тяжести АПП и улучшения качества лечения. Полученные результаты демонстрируют повышение интенсивности перекисных процессов в печени самок крыс под действием этанола, которое сопровождается снижением активности основных фер-

ментов системы антиоксидантной защиты — каталазы и глутатионпероксидазы. Эти данные свидетельствуют о развитии свободнорадикального повреждения печени в ходе хронического употребления алкоголя, одного из основных механизмов реализации его деструктивных эффектов и, вероятно, могут указывать на тяжесть процесса. Кроме того, полученные результаты подтверждают, что разработанная модель АПП адекватна и может быть использована для дальнейших исследований.

#### Выводы

Моделирование АПП у самок крыс сопровождается нарушением прооксидантно-антиоксидантного баланса и развитием оксидативного стресса, что проявляется в активизации ПОЛ (увеличении количества ТБК-активных продуктов, усилении интенсивности индуцированного ПОЛ) и значительном угнетении антиоксидантной системы — уменьшении глутатионпероксидазной и каталазной активности.

Представленные данные могут быть использованы для разработки и оценки эффективности новых методов лечения АПП на этапе их доклинических испытаний.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Жибица Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма.— СПб: ИКС «Фолиант», 2000.— 200 с.
2. Бабюк И.А., Сосин И.К., Калиниченко О.Б. и др. Алкогольная и наркотическая зависимость у подростков.— Донецк—Харьков: Донеччина, 2004.— 192 с.
3. Болезни печени и желчевыводящих путей: Руководство для врачей / Под ред. В. Т. Ивашкина.— М.: ООО «Издательский дом «М-Вести», 2002.— 416 с.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.— 252 с.
5. Ерышев О.Ф., Рыбакова Т.Г., Шабанов П.Д. Алкогольная зависимость: формирование, течение, противоречивая терапия.— СПб: ЭЛБИ-СПб, 2002.— 192 с.
6. Ковалёв Г.А., Петренко А.Ю. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна.— 2004, № 617.— С. 14—18.

7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.— 1988.— № 1.— С. 16—19.

8. Маевская М.В. Алкогольная болезнь печени // Клинический перспект. в гастроэнтерол., гепатол.— 2001.— № 1.— С. 4—8.

9. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практик. рук.: Пер. с англ. / Под ред. З.Г. Апросиной, Н.А. Мухина.— М.: ГОЭТАР-МЕД, 2002.— 864 с.

10. Brind A., Hurlstone A., Edrington D. et al. The role of polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, M3, P1, T1 and A1 in susceptibility to alcoholic liver disease // Alcohol Alcohol.— 2004.— Vol. 39, N 6.— P. 478—483.

11. Nanji A., Jokelainen K., Fotouhinia M. et al. Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines // Am. J. Physiol.— Gastrointest Liver Physiol.— 2002.— N 281.— P. 1348—1356.

12. Rotruck J., Pope A., Ganther H. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science.— 1973.— Vol. 179, N 73.— P 588—590.

## ПОКАЗНИКИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ САМОК ЩУРІВ ПРИ АЛКОГОЛЬНОМУ УРАЖЕННІ

Г.А. Ковальов, Д.В. Черкашина, О.Ю. Петренко

Оцінювали вплив алкоголю на показники прооксидантно-антиоксидантного стану печінки самок щурів при алкогольному ураженні. Доведено, що моделювання алкогольного ураження печінки супроводжується вираженим посиленням процесів ПОЛ — збільшенням кількості ТБК-активних продуктів та інтенсивності індукованого ПОЛ, а також значним пригніченням активності ферментів системи антиоксидантного захисту — каталази і глутатионпероксидази.

## CHARACTERISTICS OF LIVER PRO-OXIDANT/ANTIOXIDANT STATE OF FEMALE RATS AT THE ALCOHOL INDUCED INJURY

G.A. Kovalyov, D.V. Cherkashyna, A.Yu. Petrenko

The influence of an alcohol on the characteristics of liver pro-oxidant/antioxidant state of female rats at the alcohol induced injury was estimated. It has been shown that modeling of alcohol induced hepatic injury in female rats was accompanied by the significant strengthening of lipid peroxidation - increase of TBA-active products level and intensity of induced lipid peroxidation, as well as by considerable depression activity of antioxidant defense system enzymes - catalase and glutathione peroxidase.