

УДК 615.015.6+613.83

© Коллектив авторов

## **ПРЕРЫВИСТАЯ АЛКОГОЛИЗАЦИЯ И ПЕЧЕНЬ: СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ, ОКСИД АЗОТА, АДАПТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ**

*Д.А. Мискевич, А.Н. Бородинский, Н.Э. Петушок,  
О.В. Коноваленко, В.В. Лелевич*

Институт Биохимии Национальной Академии наук Беларуси, 230017, Гродно,  
БЛК-50. тел.: +375 0152 337835; эл. почта: dr.mengel@aport2000.ru

Исследовали состояние ферментативного звена антиоксидантной системы и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в печени, уровень оксида азота в плазме крови крыс в условиях так называемой "прерывистой алкоголизации". Крысы-самцы Wistar получали этанол в наркотической дозе (3,5 г/кг интрагастрально, в виде 25% раствора) дважды в сутки по схеме: этанол в течении 4 дней чередовался с 3 сутками его отмены. Продолжительность эксперимента составила 28 дней. Повторение циклов алкоголизации приводило к дисбалансу между продукцией и утилизацией различных активных форм кислорода (АФК). Нарушение равновесия происходило, главным образом, в системе супероксиддисмутаза-каталаза, активность системы глутатиона оставалась неизменной. Нарушение баланса в активности основных ферментов-антиоксидантов может предполагать интенсификацию свободнорадикальных процессов (СРП), связанную с повышением уровня АФК и активацией перекисного окисления липидов. Однако практически во всех экспериментальных группах отмечено снижение уровня ТБК-реагирующих продуктов, что может быть обусловлено антиоксидантным действием оксида азота. Вместе с тем отмечено увеличение трансаминаз в плазме крови. На 28 день эксперимента активность всех исследуемых показателей была на уровне контрольных значений. Данные обсуждаются в свете гипотезы о периферических регуляторных механизмах в ферментативной АОС и антиоксидантной роли оксида азота.

**Ключевые слова:** прерывистая алкогольная интоксикация, оксид азота, активные формы кислорода, печень.

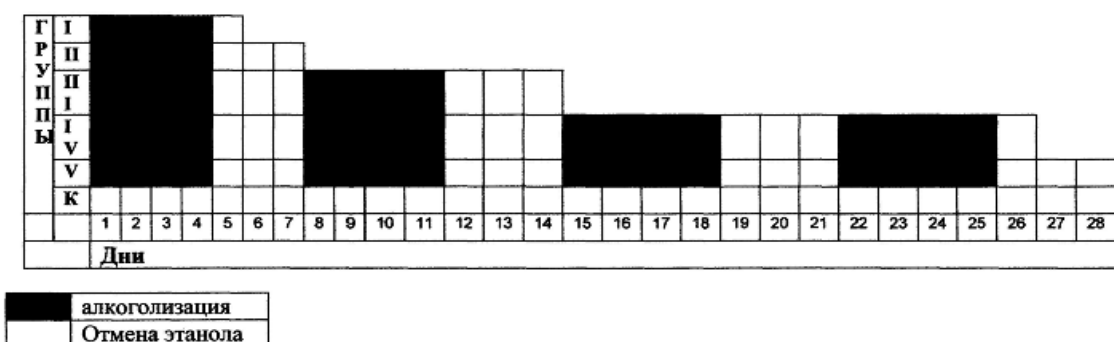
**ВВЕДЕНИЕ.** Адаптационные изменения, происходящие в ответ на злоупотребление алкоголем, имеют наиболее общие звенья патогенеза алкоголизма, которые часто используются в различных патогенетических построениях отечественных и зарубежных исследователей. Но алкоголизм – это ещё и следствие "инерционности" регуляторных процессов, участвующих в адаптационной перестройке молекулярных структур организма: его рецепторов, ферментов, компонентов мембран и т.п. [1]. Свободнорадикальный гомеостаз - динамическая, постоянно изменяющаяся система, поэтому защита от цепных свободнорадикальных реакций также должна быть лабильной, мгновенно и специфически реагирующей на изменение уровня оксидантов. Трудно предположить, что антиоксидантная система (АОС) подчинена централизованным, гормонально-опосредованным, адаптивным механизмам. В этом случае она была бы громоздкой, сложной и мало эффективной. Можно предположить, что в некоторых случаях она регулируется локальными изменениями

## ПРЕРЫВИСТАЯ АЛКОГОЛИЗАЦИЯ И ПЕЧЕНЬ

в уровне активных форм кислорода (АФК) и азота, продуктов метаболизма этанола, обусловленных как энзиматическими, так и химическими процессами, протекающими в клетке. Таким образом, по нашему мнению, антиоксидантную систему не всегда можно рассматривать как часть системы гормонально-опосредованных процессов адаптации, а при некоторых условиях, как локальную, независимую адаптивную систему, от функционального состояния и активности которой зависит интенсивность перекисных процессов, трансдукция сигнала, регуляция активности некоторых ферментов. Поступая в организм, алкоголь активно вмешивается в ход общеметаболических процессов, изменяет про/антиоксидантный статус клетки [2], поэтому введение этанола в организм, так же как и его отмена вызывает многочисленные метаболические перестройки. В качестве модельной ситуации для оценки адаптивных изменений в АОС была выбрана модель так называемой “прерывистой алкоголизации”, при которой периоды интенсивного потребления алкоголя чередуются с периодами его отмены. Смена периодов алкоголизация/отмена этанола, по нашему мнению, может создать наиболее благоприятные условия для яркого проявления действия адаптационных процессов. С другой стороны, в обществе значительно чаще чем хроническая встречается ситуация уже упомянутой выше прерывистой алкоголизации, однако данных о состоянии АОС в этих условиях крайне недостаточно. Таким образом, правильная оценка и своевременная коррекция оксидативных процессов может определить эффективность лечения. В данной работе мы попытаемся описать состояние свободнорадикальных процессов (СРП) в печени крыс в условиях прерывистой алкоголизации, а так же проверить наше предположение о периферической регуляции состояния АОС.

**МЕТОДИКА.** В эксперименте использованы белые крысы-самцы линии Wistar с массой 160-180 г. Животных содержали на обычном рационе вивария; 12 часов до забоя крысы голодали. Этанол вводили дважды в сутки в наркотической дозе (3,5 г/кг, интрагастрально в виде 25% раствора). Эвтаназию осуществляли путём декапитации. Животные были разделены на 6 групп (n=8). Первая опытная группа получала алкоголь в течение 4 суток, декапитацию проводили через 1 сутки после отмены этанола. Вторая опытная группа подвергалась тем же манипуляциям, однако декапитацию проводили через 3 суток после отмены алкоголя. В третьей опытной группе двукратно повторяли цикл - алкоголизация 4 суток, 3 суток отмены, и декапитацию проводили на 14 сутки от начала эксперимента. Четвертая и пятая опытные группы подвергались более длительной прерывистой алкоголизации – цикл “алкоголизация-отмена” был воспроизведен четырежды, с декапитацией через 1 сутки в четвертой группе и через 3 суток после последней алкоголизации в пятой. Животные из контрольной группы вместо этанола получали эквивалентное количество воды (см схему опыта).

### Схема опыта



В эксперименте были использованы печень и плазма крови. В постмитохондриальной фракции гомогената печени, полученной по стандартной схеме центрифугирования (20 мин, при 12000 g) определяли активности: супероксиддисмутазы (СОД) (ед. активности/мин<sup>-1</sup>/мг белка) [3], каталазы (КАТ) (мкмоль/мин·мг белка) [4], глутатионпероксидазы (ГПО) (нмоль глутатиона/мин/мг белка) [5], глутатионредуктазы (ГР) (нмоль NADPH/мг белка/мин) [6], активность аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой трансаминаз (АСТ) [7], а так же уровни: восстановленного глутатиона (глутатион) (мкмоль/гр ткани) [8] и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), (нмоль/гр ткани) [9]. В плазме крови оценивали уровень нитритов NOx (мкмоль/мл плазмы) [10]. Полученные результаты были статистически обработаны при помощи пакета статистических программ Prism.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ результатов, представленных в таблицах 1 и 2 (см. табл.), показал, что на первые сутки отмены этанола (группа I) не было выявлено изменений в активности ферментов АОС и содержании восстановленного глутатиона. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) невелика (ТБК-РП был снижен до 49%), одновременно концентрация NOx имела тенденцию к понижению (64% p<0,1). Трансаминазные реакции в плазме крови были существенно активированы.

Таблица 1. Активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и содержание восстановленного глутатиона в печени крыс в условиях прерывистой алкоголизации.

| Показатель                      | Контроль    | I          | II          | III         | IV         | V          |
|---------------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| СОД<br>ед. активности/мин/мг б. | 462,7±135,9 | 317,9±73,6 | 211,4±49,4# | 122,2±31,1* | 357,6±91,1 | 502,1±70,6 |
| КАТ мкм/мин/мг б.<br>/мин       | 19,2± 3,7   | 17,7± 2,3  | 41,9± 9,4*  | 37,8± 6,3*  | 9,5± 1,5*  | 12,1± 1,3  |
| Глутатион<br>мкм/г ткани        | 7,3± 0,4    | 8,5± 0,9   | 8,8± 0,7#   | 10,2± 0,6*  | 7,8± 0,2   | 7,2± 0,9   |
| ГПО                             | 0,27±0,09   | 0,32±0,05  | 0,39±0,07   | 0,3±0,06    | 0,4±0,1    | 0,4±0,08   |
| ГР                              | 0,07±0,01   | 0,09±0,02  | 0,08±0,01   | 0,09±0,01   | 0,09±0,007 | 0,09±0,005 |

Примечание: Активность СОД выражена в Ед. активности/мин/мг белка, КАТ - мкмоль/мин/мг белка, ГПО и ГР - нмоль/мин/мг белка; содержание глутатиона выражено в мкмоль/г ткани.  
# - p<0,1-в сравнении с контролем; \* - p<0,05-в сравнении с контролем.

Таблица 2. Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) в печени, уровень NOx и активность АСТ, АЛТ в плазме крови крыс в условиях прерывистой алкоголизации.

| Показатель          | Контроль   | I          | II         | III         | IV         | V           |
|---------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| ТБК-РП<br>(нмоль/г) | 22,5±4,2   | 11,1±1,8*  | 8,8±0,6*   | 11,9±2,5*   | 13,9±2,3   | 15,01±2,6   |
| NOx<br>(мкмоль/мл)  | 219,6±44,6 | 139,9±7,8# | 138,7±8,6# | 139,9±10,5# | 74,7±7,9*  | 146±16,4    |
| АСТ<br>(мм/мл/мин)  | 0,23±0,02  | 0,3±0,01*  | 0,3±0,01*  | 0,3±0,01*   | 0,2±0,01   | 0,21±0,01   |
| АЛТ<br>(мм/мл/мин)  | 0,19±0,01  | 0,25±0,02* | 0,24±0,01* | 0,20±0,02   | 0,23±0,02# | 0,15±0,015* |

Примечание: # - p<0,1-в сравнении с контролем; \* - p<0,05-в сравнении с контролем.

Увеличение срока отмены этанола до трёх дней (группа II) выражалось в дисбалансе активности СОД (снижена до 46%  $p < 0,1$ ) и КАТ (она повышена более чем в два раза), и росте содержания глутатиона (на 21%  $p < 0,1$ ). При этом, как и в I группе, уровни ТБК-РП и NOx были ниже контрольных значений, а активность обеих трансаминаз увеличена.

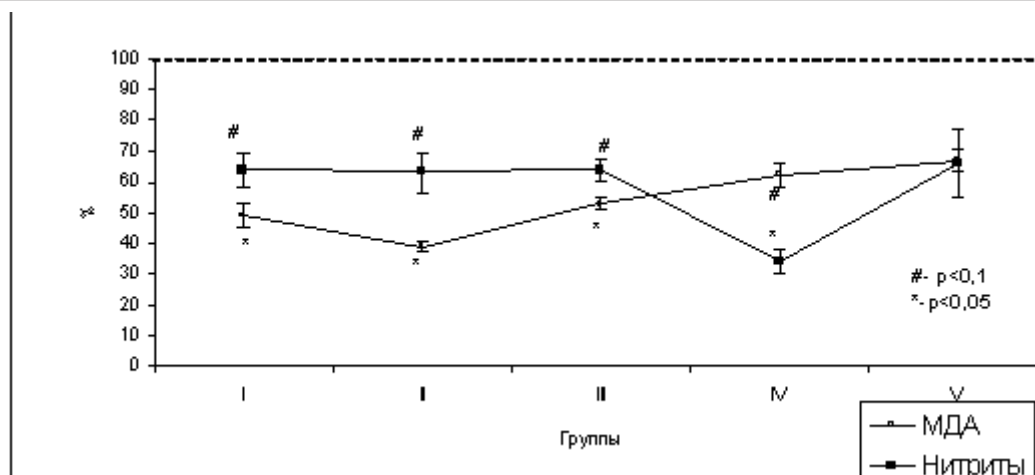
Третий день абстиненции во втором цикле смены периодов алкоголизации-отмены (группа III) характеризовался усилением дисбаланса в активности СОД/КАТ, за счёт ещё большего ингибирования СОД (до 26%). Тенденция к понижению концентрации NOx, отмеченная в предыдущих группах, сохранялась. Процессы ПОЛ были ингибированы, содержание глутатиона повышено на 40%. Необходимо обратить внимание на то, что активирована только АСТ, в то время как АЛТ на уровне контроля.

В четвёртом цикле смены периодов алкоголизации-отмены, в первые сутки абстиненции (группа IV) отмечена нормализация СОД, при этом КАТ была ингибирована до 49%. Содержание NOx было существенно ниже контрольных величин (34%). В интенсивности процессов ПОЛ, активности трансаминаз, достоверных изменений не выявлено. На этапе третьих суток отмены этанола (группа V) не выявлено никаких существенных изменений в изучаемых показателях.

Таким образом, на основе полученных результатов можно сказать, что абстиненция после первого и второго цикла алкоголизации выраженно влияла прежде всего на СОД и КАТ, практически не затрагивая ферменты системы глутатиона. Высокая активность КАТ во второй и третьей группах, может быть результатом интенсификации процессов продукции перекиси водорода не супероксиддисмутазной природы. Например, следствием активизации уратоксидазной реакции в пероксисомах, из-за повышения уровня уратов вследствие потребления этанола. При этом велика вероятность проникания этой перекиси в цитозоль, где она должна утилизироваться ГПО. Однако, в нашем случае (II, III группы), достоверного увеличения активности ГПО не отмечено (табл. 2), следовательно, можно предполагать повышение уровня  $H_2O_2$  в цитоплазме. Увеличение содержания  $H_2O_2$  способно обратимо ингибировать СОД [11], что отмечено у животных этих групп. Таким образом, повышение уровня активных форм кислорода делает высокой вероятность развития цепных реакций ПОЛ, инициируемых супероксид-анионом и перекисью водорода на 3 день абстиненции после однократного так и после двукратного повторения циклов алкоголизации/отмены.

Метаболизм этанола тесно связан с наработкой ацетальдегида (АЦ). В норме последний метаболизируется ацетальдегиддегидрогеназой до ацетата, однако, при злоупотреблении алкоголем его концентрации могут неконтролируемо повышаться. В этом случае проявляется токсические эффекты АЦ, в числе которых образование аддуктов с различными белками. В основе этого процесса лежит взаимодействие ацетальдегида с определёнными аминокислотами, в частности с лизином, в результате которого образуются комплексы ацетальдегид-белок. В случае образования комплекса с ферментом, может происходить обратимое ингибирование его каталитической активности [3]. Ингибирование каталазы, отмеченное нами в первые сутки после четырёх циклов алкоголизации (группа IV), по нашему мнению, может быть следствием накопления ацетальдегида. При увеличении периода абстиненции до 3 суток (группа V) уровень АЦ естественным образом уменьшается и каталазная активность практически нормализуется. Ингибирование каталазы, как одного из основных пероксид-утилизирующих ферментов может предполагать повышение уровня перекиси водорода в IV группе.

Так дисбаланс в активности СОД и КАТ в II-IV группах упомянутый нами выше, создаёт условия для интенсификации СРП и запуска цепных реакций ПОЛ. Но, как уже отмечалось нами ранее, в упомянутых группах уровень ТБК-РП существенно ниже контроля. Это может быть результатом действия неферментативного звена АОС. Одновременно в указанных группах снижена концентрация NOx (рис. 1).

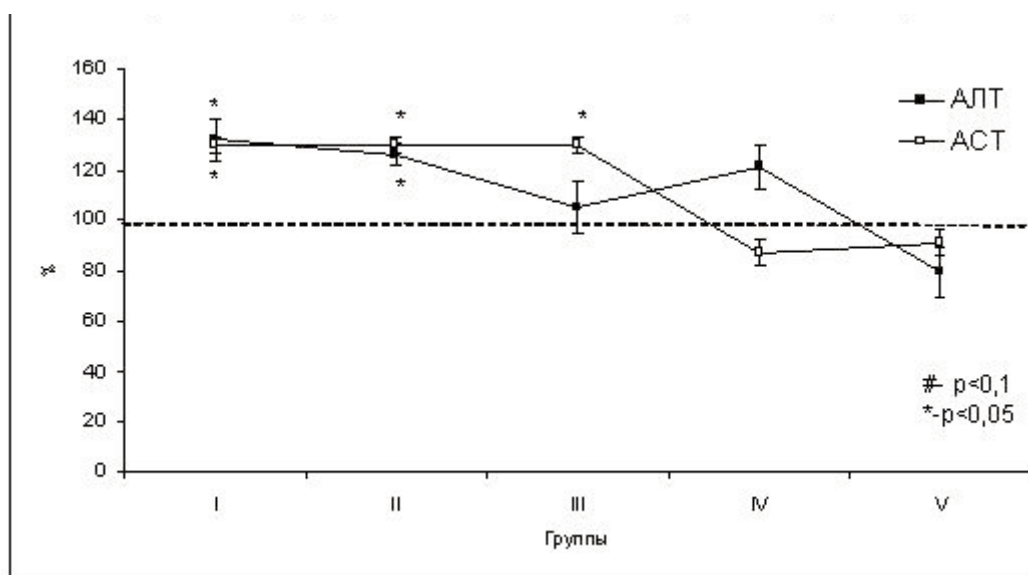


**Рисунок 1.**

Уровень NOx в плазме крови и ТБК-РП в печени крыс в условиях прерывистой алкоголизации (в % к контролю).

Показано, что влияние этанола на NO-синтазную систему зависит от вида алкогольной интоксикации. При острой алкогольной интоксикации уровень NO снижается, тогда как хроническое потребление этанола стимулирует синтез оксида азота [12]. При этом в числе прочих причин снижения его уровня может быть и участие NO в антиоксидантных процессах. Отмечена его способность к терминции цепных реакций ПОЛ индуцируемых, как известно, активными формами кислорода. В этом случае NO реагирует с промежуточными продуктами реакций ПОЛ, с образованием более стабильных алкил нитритов, с продукцией которых происходит обрыв цепи реакций ПОЛ [13].

Однако, несмотря на выраженное ингибирование реакций ПОЛ, в I-III группах отмечена ферментемия АСТ и в I-II АЛТ, которая является следствием повреждения целостности липидного бислоя мембран (см. рис. 2).



**Рисунок 2.**

Активность АСТ и АЛТ в плазме крови крыс в условиях прерывистой алкоголизации (в % к контролю).



Особый интерес представляет то, что, по мнению некоторых исследователей, активация трансфераз (особенно АЛТ) происходит только на 2-3 стадиях алкоголизма (по классификации А.А.Портнова [14]) для которых характерна наиболее выраженная соматическая патология [5]. Таким образом, можно говорить о функциональных нарушениях клеток печени на этапе 1-3 суток абстиненции после одного и 3 суток после двух циклов алкоголизации. Активация данных реакций в плазме крови - свидетельство повреждения целостности клеточных мембран и выхода этих цитозольных ферментов в кровяное русло. Однако, как уже упоминалось выше, процессы ПОЛ в этих группах ингибированы. Таким образом, существует другой деструктивный фактор способный нарушать целостность клеточной стенки. По нашему мнению, этим фактором может быть этанол. Хорошо описана способность этанола встраиваться в клеточную мембрану, и тем самым, изменять её свойства: увеличивать ригидность, проницаемость, функциональную активность мембранных белков [15]. Обращаясь к результатам таблицы 2, легко заметить, что, начиная с III экспериментальной группы (т.е. через три дня абстиненции после двух циклов алкоголизация/абстиненция) наблюдаются признаки некоей адаптации. Активирована только АСТ, а АЛТ на уровне контрольных значений. Ещё более выражены процессы адаптации после четырёх циклов алкоголизации/отмены (IV и V группы), где обе трансаманзные реакции нормализованы.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Обобщая всё сказанное выше можно отметить следующее:

Патохимические изменения АОС в условиях смены циклов алкоголизация/абстиненция реализуются в дисбалансе СОД/КАТ, отмеченном в I-VI группах. Однако в упомянутых группах процессы ПОЛ ингибированы. Причиной этого может быть антиоксидантное действие окиси азота.

Несмотря на снижение интенсивности реакций ПОЛ, прерывистая алкоголизация вызывает нарушение функциональных свойств мембран клеток печени. Это проявляется выраженным повышением аланиновой и аспарагиновой трансфераз в плазме крови у животных I-III групп. По нашему мнению, данные процессы обусловлены повреждением мембран непосредственно этанолом.

Однако уже на третьи сутки абстиненции после двух циклов алкоголизации/абстиненции (III группа) проявляются первые признаки адаптации (нормализация АЛТ). Адаптационные процессы нарастают с увеличением числа периодов алкоголизации/абстиненции. После суток отмены этанола (IV группа) отмечается регенерация мембран (АСТ и АЛТ в норме), нормализация СОД. К третьим суткам абстиненции (V группа) все изучаемые показатели были на уровне контрольных значений.

Таким образом, мы полагаем, что состояние АОС в условиях прерывистой алкоголизации обусловлено действием периферических регуляторных механизмов, связанных с колебаниями уровня АФК, продуктов метаболизма этанола.

Полученные результаты дают основание для более детальных исследований связи между колебаниями уровней АФК, оксида азота, продуктов метаболизма этанола в печени, индуцированных прерывистой алкоголизацией, и функциональной активностью АОС в целом и отдельных её составляющих, в частности. Понимание механизмов периферической регуляции АОС может быть использовано для грамотной коррекции антиоксидантного статуса печени при прерывистой алкогольной интоксикации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Горюшкин И.И. (2004) Актуальные проблемы современной науки, том 1, с. 167-168.
2. Sun A.Y., Ingelman-Sundberg M., Neve E. (2001) Alcoholism: Clinical and Experimental Research, **25**, 237-243.
3. Tuma D.J., Casey C.A. (2003) Alcohol Research & Health, **27**, 285-290.
4. Marklund, Norderson, Back, Normal (1984) J. Gerontol., **36**, 405-409.
5. Кругликова А., Штутман Ц.М. (1976) Укр. биохим. ж., **48**, 223-228.
6. Хотимченко С.А., Алексеева И.А., Гвоздева Л.Т. и др. (1987) Теоретические и клинические аспекты науки о питании. Методы оценки обеспеченности населения витаминами, сб. научных трудов, том 8, Москва. с. 107-109.
7. Колб В.Г., Камышников В. (1976) Клиническая биохимия. Минск. с.78-83.
8. Sedlak J., Lindsay R. (1968) Anal. Biochem., **25**, 192-205.
9. Olikava M., Olusa N. (1980) Anal. Biochem., **95**, 351-358.
10. Huizenga J.R., Jansen P.L. (1995) Clin Chem., **41**, 892-896.
11. Di Guiseppe J., Fridovich I. (1980) Arch. Biochem and Biophys., **203**, 45-150.
12. Michael L. Adams, Theodore J. Cicero (1998) Alcohol, **16**, 153-158.
13. Bloodsworth A., O'Donnell V.B., Freeman B.A. (2000) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **20**, 1707-1715.
14. Портнов А.А. (1962) Алкоголизм. Особенности развития и течения (Клинический аспект проблемы). Москва.
15. Molina P.E., Hoek J.B., Nelson S., Guidot D.M., Lang Ch.H., Wands J.R., Crawford J.M. (2003) Alcoholism: Clinical and Experimental Research, **27**, 563-575.

Поступила: 04. 03. 2005.

### INTERRUPTED ALCOHOL TREATMENT AND LIVER: FREE RADICAL HOMEOSTASIS, NITRIC OXIDE, ADAPTIVE MECHANISMS

**D.A. Miskevich, A.N. Borodinsky, N.E. Petushok, O.V. Konovalenko, V.V. Lelevich**

Department of Regulation of Metabolism, Institute of Biochemistry, BLK-50, Grodno, 230017 Belarus; tel.: +375 0152 337835; e-mail: dr.mengel@aport2000.ru

Alcohol administration can result in liver damage. Reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and their interaction are crucial factors in this process. The aim of work was to investigate free radical state and mechanisms of adaptation of the antioxidant system (AOS) to stress, caused by interrupted alcohol intake. Repeated cycles of alcoholization caused an imbalance between production and utilization of various ROS. This imbalance was due to impairments in the system superoxide dismutase/catalase. Nevertheless, in most experimental groups there was clear reduction of lipid peroxidation (LPO) products evaluated by thiobarbituric acid reactive substances. This might be attributed to the antioxidant effect of NO. However, there was an increased level of transaminases in blood plasma. After 28 days of this experimental scheme all the parameters studied normalized.

**Key words:** interrupted alcohol intoxication, nitric oxide, reactive oxygen species, liver.