

# ВОПРОСЫ АЛКОГОЛИЗМА

## РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ КРЫС К ГЕПАТОТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ЭТАНОЛА<sup>1</sup>

М. И. Бушма, С. М. Зиматкин, Ю. Г. Амбрушкевич, Л. Ф. Легонькова,  
Л. М. Караедова, Т. В. Бушма, Т. И. Хомич, В. М. Шейбак<sup>2</sup>

Разработан новый методический подход по выявлению факторов, ответственных за предрасположенность к гепатотоксическому действию этанола. С использованием корреляционного, дисперсионного, пошагового многофакторного регрессионного и канонического анализа установлена связь между исходным состоянием системы антиоксидантной защиты в печени и характером, степенью выраженности (в последующем) её поражения этанолом. Установлено, что здоровые животные с исходно низким уровнем восстановленного глутатиона и ретинолов в печени, а также с энзимопатией цитозольной ХДНБ-глутатион-S-трансферазы и супероксиддисмутазы в большей степени предрасположены к повреждению печени этанолом.

**Ключевые слова:** этанол, гепатотоксичность, предрасположенность, антиоксидантная система

### ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени не расшифрованы биохимические механизмы, ответственные за предрасположенность человека и животных к повреждению печени этанолом.

Нами разработана экспериментальная модель для выявления органных маркеров повышенной чувствительности к гепатотоксическому действию этанола. С использованием этой модели предпринята попытка выяснения роли антиоксидантной системы печени в реализации гепатотоксического действия этилового спирта.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 112 нелинейных белых крысах-самцах с исходной массой 250 – 300 г. Животных опытной группы (94 крысы) подвергали частичной гепатэктомии (удаление центральной и левой боковой долей печени; около 65 – 70% массы) под эфирным наркозом с наложением лигатуры на основания долей [7]. Через 2 мес начинали вводить этанол (через зонд в желудок в дозе 5 г/кг в виде 30% водного раствора, 1 раз в день, 57 дней). Животных контрольной группы (16 крыс) оперировали как описано выше, а в послеоперационном периоде им вводили воду в том же объеме, что и этанол опытным животным.

В изъятых долях печени интактных крыс (до интоксикации этанолом) определяли содержание токоферолов и ретинолов, коэнзима Q [12] и восстановленного глутатиона [11]. Регистрировали активность глутатионредуктазы [2], глутатионпероксидазы [3], глутатион-S-трансфераз (GST) [5], супероксиддисму-

тазы (СОД) [8]. В кусочках печени после интоксикации этанолом регистрировали интенсивность: воспалительной и жировой инфильтрации паренхимы, вакуолизации гепатоцитов, их деструкцию и гибель общепринятыми гистологическими методами. Кроме того, в плазме крови определяли активность маркерных ферментов повреждения печени: аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТФ) [9].

Для нахождения связей между особенностями состояния компонентов антиоксидантной системы в печени, с одной стороны, и характером, степенью выраженности последующего алкогольного поражения органа, с другой стороны, использовали методы корреляционного, пошагового многофакторного регрессионного, дисперсионного и канонического анализа [1, 4].

При сравнении значений показателей антиоксидантной системы в долях печени интактных крыс, полученных при частичной гепатэктомии, с таковыми у этих же животных через 2 мес (период восстановления структуры и функции печени перед началом хронической алкогольной интоксикации), не обнаружено достоверных различий. Гистологически печень также не отличалась от интактной. Это свидетельствует о полном структурно-метаболическом восстановлении органа после частичной гепатэктомии.

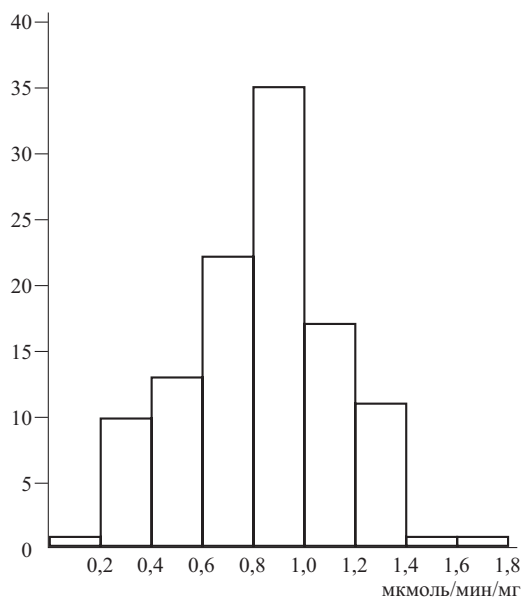
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Характеристика течения послеоперационного периода и периода алкогольной интоксикации.*

В послеоперационном периоде из 112 животных погибли 2 крысы (причины установить не удалось). Остальные животные через 2 мес не отличались от неоперированных крыс. В процессе насильственной алкоголизации у животных не увеличивалась масса тела, они становились агрессивными. Часть крыс погибла (в основном от желудочных кровотечений и/или пневмонии). Через несколько минут после введения этанола животные засыпали. Длительность сна, регистрируе-

<sup>1</sup> Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда Фундаментальных исследований при СМ РБ (грант Б96–335).

<sup>2</sup> Гродненский государственный медицинский университет МЗ РБ, Гродно, 230015, ул. М. Горького, 80. Институт биохимии НАНБ, Гродно, Республика Беларусь.



**Рис. 1.** Межиндивидуальная вариабельность активности ХДНБ-глутатион-S-трансферазы в постмикросомальной фракции печени интактных крыс.

По оси абсцисс — активность фермента (мкмоль/мин/мг), по оси ординат — количество крыс. Высота столбика отражает количество крыс, у которых активность фермента находится в диапазоне значений, занимаемых столбиком.

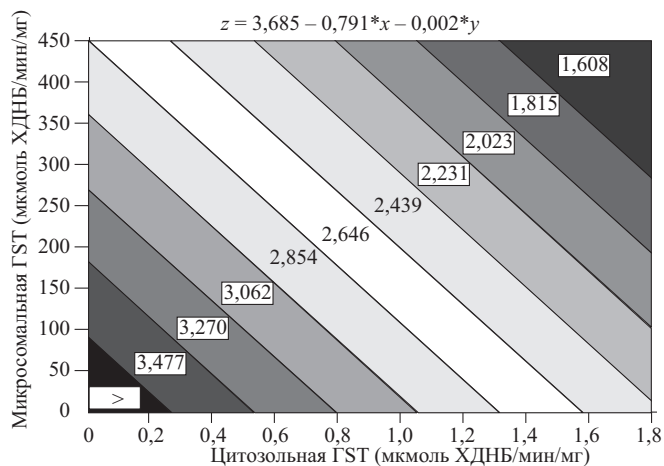
мого после 2-го, 16-го, 30-го и 44-го введений, этанола варьировала от 1 до 400 мин.

*Межиндивидуальная вариабельность содержания компонентов антиоксидантной системы в печени интактных крыс.*

В гомогенатах печени показатели варьируют в пределах следующих значений: токоферолы — 1,6 – 83,37 и ретинолы — 24,3 – 123 мкг/г массы печени; коэнзим Q — 0,03 – 14 мг/г печени\*.

Активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в постмитохондриальной фракции печени интактных крыс варьирует в диапазоне значений: 29,31 – 85,1 нмоль/мин/мг и 3,7 – 38 мкмоль/мин/мг соответственно. Активность микросомальной ХДНБ-глутатион-S-трансферазы изменяется от 35,85 до 393,23 нмоль/мин/мг. В постмикросомальной фракции она составляет 0,16 – 1,63 мкмоль/мин/мг (рис. 1). При использовании в качестве субстрата бромсульфалеина активность фермента в постмикросомальной фракции колеблется от 4,88 до 11,66 нмоль/мин/мг. Каталитическая активность СОД

\* *Примечание.* В связи с задачами исследования (выявление индивидуальных особенностей протекания биохимических процессов в печени здоровых животных и нахождение их возможных связей с характером, степенью тяжести последующего алкогольного поражения органа) мы не приводили общепринятые оценки параметров выборки. Результаты исследований представляли графически в виде гистограмм, как в качестве примера показано на рис. 1.



**Рис. 2.** Взаимосвязь между активностью цитозольной, микросомальной глутатион-S-трансферазы (GST) в печени крыс (до алкогольной интоксикации) и активностью аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в плазме крови (после алкогольной интоксикации).

Активность АсАТ отражает характер цвета и цифровые значения, представленные на шкале справа. Уравнение регрессии приведено над рисунком.

в постмитохондриальной фракции составляет 0,97 – 5,1 ЕД/мин/мг.

*Межиндивидуальная вариабельность характера и степени выраженности морфологических проявлений гепатотоксичности этанола.*

Интенсивность воспалительной инфильтрации печени и вакуолизации гепатоцитов у крыс после хронической алкогольной интоксикации варьирует от 0,2 (очень слабая выраженность) до 4,0 (очень сильная выраженность) баллов. Значения степени деструкции и гибели гепатоцитов колеблются от 0,33 (очень слабая выраженность) до 4 баллов. Жировая инфильтрация паренхимы печени характеризуется значениями 0,1 (очень слабая выраженность) – 3,0 (сильная выраженность) баллов. У одной крысы она, как и проявления вакуолизации гепатоцитов, не регистрировалась.

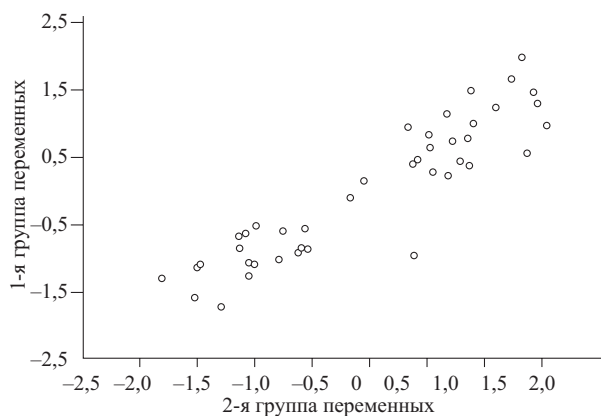
*Межиндивидуальная вариабельность выраженности биохимических проявлений гепатотоксичности этанола.*

В плазме крови крыс после хронической алкогольной интоксикации показатели варьируют: АлАТ — 0,64 – 3,66 и АсАТ — 1,65 – 3,9, ЩФ — 0,88 – 7,84 ммоль/л и ГГТФ — 6 – 50,4 мкмоль/л.

#### Математическое моделирование

*Результаты корреляционного анализа.* О корреляционной взаимосвязи между показателями, характеризующими состояние антиоксидантной защитной системы печени (до интоксикации этанолом), и характером, степенью тяжести последующего поражения печени (после воздействия этанолом) свидетельствуют данные, представленные в таблице.

Вакуолизация гепатоцитов ассоциируется со сниженным уровнем ретинолов в печени. Жировой инфильтрации паренхимы способствует низкий уровень



**Рис. 3.** Множество исследуемых животных в координатах 1-й и 2-й групп переменных.

1-я группа переменных — показатели до интоксикации этанолом; 2-я группа переменных — показатели гепатотоксичности этанола (представлены в таблице). Кружочки — индивидуальные крысы.

восстановленного глутатиона в печени. Высокая активность в плазме крови АсАТ коррелирует с энзимопатией цитозольной ХДНБ-GST. В повышение активности ЩФ в плазме существенный вклад вносит энзимопатия СОД.

*Результаты пошагового многофакторного регрессионного анализа.* На основе полученных коэффициентов корреляции построены математические модели. Установленная взаимосвязь между активностью цитозольной и микросомальной GST в печени крыс (до алкогольной интоксикации) и активностью АсАТ в плазме крови (после алкогольной интоксикации), описывается уравнением линейной множественной регрессии (рис. 2).

*Результаты дисперсионного анализа* свидетельствуют о высоких информационных качествах модели. Модель статистически значима ( $p < 0,003$ , критерий  $F = 6,88$ ).

*Результаты канонического анализа* подтвердили наличие сильной прямой статистически значимой корреляционной связи между показателями до интоксикации (1-я группа переменных) и показателями после интоксикации (2-я группа переменных; см. таблицу). Канонический коэффициент корреляции  $r$  равен 0,92 (уровень значимости  $p = 0,0002$ ). Эта сильная прямая связь между первыми каноническими переменными для первой и второй групп хорошо просматривается по компактному положению вытянутого вправо вверх поля точек в координатах нормированных значений первых канонических переменных для 1-й (вертикальная ось) и 2-й (горизонтальная ось) групп наблюдавшихся переменных (рис. 3). Это свидетельствует о том, что показатели до интоксикации значимо связаны с показателями после интоксикации (набор показателей представлен в таблице). Судя по коэффициентам для первой канонической переменной 1-й группы (показатели до интоксикации), наибольшее влияние на нее имеет глутатионредуктаза. На первую канониче-

скую переменную 2-й группы (показатели после интоксикации) наибольшее влияние имеют ЩФ и ГТТФ.

Таким образом, в данной работе предложена оригинальная экспериментальная модель для выявления органных маркеров предрасположенности к гепатотоксичности этанола. Результаты исследования свидетельствуют о важной роли врожденного сниженного функционального состояния неферментной и ферментной систем антиоксидантной защиты клеток печени крыс (до воздействия этанолом), как фактора предрасположенности к последующему алкогольному поражению печени у носителей этих неблагоприятных признаков.

Результаты исследования согласуются с литературными данными. Показано, что интоксикация крыс этанолом сопровождается развитием окислительного стресса. При этом в печени и плазме, синхронно с повышением содержания малонового диальдегида, снижается активность СОД и содержание восстановленного глутатиона. Коэффициент соотношения: глутатионредуктаза/глутатионпероксидаза, восстановленный/окисленный глутатион значительно снижаются. Выявленные нарушения усугубляются с увеличением дозы этанола [6, 10]. Авторы считают, что вышеприведенные показатели могут быть маркерами степени выраженности алкогольиндуцированного окислительного стресса.

Предполагается, что стимуляция этанолом ПОЛ приводит к истощению антиоксидантной системы вследствие чрезмерного “расходования” ее компонентов в реакциях обезвреживания образующихся перекисей. В условиях наследственной неполноценности антиоксидантной системы, повреждающее действие этанола на печень (как установлено нами) особенно выражено.

Предложенный подход может быть использован для поиска других маркеров предрасположенности к алкогольному поражению печени, также как и маркеров предрасположенности к повреждениям печени, вызываемыми другими факторами.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлена выраженная межиндивидуальная вариабельность характера и степени гепатотоксичности этанола у крыс.
2. Поражение печени этанолом генетически предопределено и в значительной степени обусловлено индивидуальными особенностями протекания биохимических процессов в органе до воздействия этанолом.
3. К повреждению печени этанолом особенно предрасположены крысы с исходно низким уровнем восстановленного глутатиона и ретинолов в печени, а также с энзимопатией цитозольной 1-хлор-2,4-динитробензол-глутатион-S-трансферазы и супероксиддисмутазы.

## Корреляционные взаимосвязи между показателями, характеризующими степень алкогольного поражения печени крыс и состоянием антиоксидантной системы в органе (до воздействия этанола)

Показатели до интоксикации этанолом	Показатели после интоксикации этанолом							
	Печень				Плазма			
	Воспалительная инфильтрация	Вакуолизация гепатоцитов	Деструкция и гибель гепатоцитов	Жировая инфильтрация паренхимы	Аланинамино-трансфераза	Аспаратамино-трансфераза	Щелочная фосфатаза	γ-Глютамил-трансфераза
Токоферолы	+ 0,16	+ 0,08	- 0,02	+ 0,03	- 0,22	- 0,16	- 0,09	+ 0,35
Ретинолы	- 0,21	- <b>0,70</b>	- 0,27	- 0,09	+ 0,22	+ 0,31	+ 0,11	+ 0,08
Коэнзим Q	- 0,11	+ 0,01	- 0,39	+ 0,09	+ 0,12	+ 0,30	+ 0,17	- 0,23
Восстановленный глутатион	- 0,27	- 0,27	+ 0,02	- <b>0,71</b>	+ 0,02	- 0,46	+ 0,34	- 0,02
Глутатионредуктаза	+ 0,33	+ 0,31	+ 0,10	+ 0,32	+ 0,38	+ 0,29	+ 0,06	+ 0,19
Глутатионпероксидаза	+ 0,18	+ 0,32	+ 0,02	+ 0,30	+ 0,32	+ 0,31	+ 0,15	+ 0,10
ХДНБ-глутатион-S-трансфераза (микросомы)	- 0,35	- 0,39	- 0,25	- 0,41	- 0,26	- 0,42	+ 0,37	+ 0,03
ХДНБ-глутатион-S-трансфераза (цитозоль)	+ 0,06	- 0,33	+ 0,33	- 0,15	- 0,48	- <b>0,69</b>	+ 0,32	- 0,20
БСЛ-глутатион-S-трансфераза (цитозоль)	- 0,29	+ 0,33	- 0,23	+ 0,24	- 0,20	- 0,25	+ 0,06	- 0,10
Супероксиддисмутаза	- 0,09	+ 0,18	- 0,32	+ 0,38	- 0,14	- 0,05	- <b>0,61</b>	+ 0,30

Примечание. ХДНБ — 1-хлор-2,4-динитробензол; БСЛ — бромсульфолеин. Выделены показатели наиболее тесных корреляционных взаимосвязей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. Афифи, С. Эйзен, *Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ*, Москва, Мир (1982).
2. А. Н. Герасимов, Л. А. Королев, А. С. Брусов, *Вопр. мед. химии*, **22**(1), 89 – 94 (1976).
3. В. М. Моин, *Лаб. дело*, № 12, 724 – 727 (1986).
4. В. Ю. Урбах, *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*, Москва, Медицина (1975).
5. W. H. Habig, M. I. Pabst, and W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **249**(22), 7130 – 7139 (1974).
6. K. Husain and S. M. Somani, *J. Appl. Toxicol.*, **17**(3), 189 – 194 (1997).
7. G. M. Higgins and R. M. Anderson, *Arch. Path.*, **12**(2), 186 – 202 (1931).
8. V. A. Kostyuk and A. I. Potapovich, *Biochem. International*, **19**(5), 1117 – 1124 (1989).
9. J. P. Persijn and W. Van der Slik, *J. Clin. Chem. Biochem.*, **14**, 421 – 427 (1976).
10. E. C. Schlorff, K. Husain, and S. M. Somani, *Alcohol.*, **17**(2), 97 – 105 (1999).
11. G. Sedlak and R. H. Lindsay, *Anal. Biochem.*, **25**(1), 192 – 205 (1968).
12. S. L. Taylor, *Lipids.*, **11**(7), 350 – 358 (1976).

Поступила 22.05.01

## THE EFFECT OF THE LIVER ANTIOXIDANT SYSTEM ON THE SUSCEPTIBILITY OF RATS TO ETHANOL HEPATOTOXICITY

M. I. Bushma, S. M. Zimatkin, Yu. G. Ambrushkevich, L. F. Legon'kova, L. M. Karaedova, T. V. Bushma, T. I. Khomich, and V. M. Sheibak

Grodno State Medical University, M. Gor'kogo Str., 80, Grodno, 230015 Belarus

A new methodological approach capable of revealing factors responsible for the susceptibility of rat liver to ethanol hepatotoxicity has been developed. Using the correlation, dispersion, iteration, multifactor regression, and canonical analyses, a relation was established between the initial state of the liver antioxidant system and the character and degree of the subsequent ethanol-induced damage. In particular, it was found that intact animals with initially low level of reduced glutathione and retinols in the liver, as well as those with enzymopathy of cytosol HDNB-glutathione-S-transferase, are more susceptible to the ethanol liver damage.