УДК 612.014.46:[616.36 + 615.015.45]:577

ДИНАМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТЕЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СИНДРОМЕ ОТМЕНЫ ЭТАНОЛА НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА ГИДРОХЛОРИДА

Ефременко Е.С., Чигринский Е.А., Жукова О.Ю.

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Омск, e-mail: bx-osma@mail.ru

Алкоголизм определяет возникновение огромных социальных и медицинских проблем в России. Формирование алкогольной абстиненции рассматривается в качестве важнейшего критерия зависимости от алкоголя. В этих условиях происходит активация ферментов микросомальной этанолокисляющей системы. Отрицательные молекулярные, патобиохимические последствия превращения этилового алкоголя при участии цитохрома Р450 2Е1 связаны с гиперпродукцией активированных метаболитов кислорода. В результате чего свободнорадикальные субстанции начинают оказывать свое патологическое влияние на субстраты, ферменты, регуляторные сигнальные молекулы. В статье описывается влияние применения этилметилгидроксипиридина гидрохлорида на активность каталазы и супероксиддисмутазы в ткани печени животных, подвергшихся принудительной алкоголизации с целью формирования нарушений обмена веществ, характерных для физической зависимости от алкоголя. Выявленные изменения свидетельствуют о влиянии этилметилгидроксипиридина на активность ферментов антиоксидантной защиты. Полученные данные могут явиться основой для оценки применения препаратов данной группы в лечении больных алкоголизмом.

Ключевые слова: алкоголь, алкоголизм, этанол, свободные радикалы, антиоксиданты, каталаза, супероксиддисмутаза, алкогольный абстинентный синдром, алкогольная абстиненция

DYNAMIC CHARACTERISTIC OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE ACTIVITIES IN LIVER TISSUE IN EXPERIMENTAL ETHANOL WITHDRAWAL ON THE BACKGROUND OF THE USE OF ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE HYDROCHLORIDE

Efremenko E.S., Chigrinski E.A., Zhukova O.Yu.

Federal State Funded Educational Institution for Higher Education Omsk State Medical University Ministry of Public Health, Omsk, e-mail: bx-osma@mail.ru

Alcoholism is the cause of enormous social and health problems in Russia. Alcohol abstinence is considered as the most important criterion of alcohol dependence. Negative molecular, pathobiochemical consequences of conversion of ethyl alcohol are associated with overproduction of activated oxygen metabolites. Free radicals begin to exert their pathological influence on the substrates, enzymes, regulatory signaling molecules. The article describes the impact of the application ethylmethylhydroxypyridine hydrochloride on superoxide dismutase and catalase activities in the liver tissue of ethanol-treated rats. Revealed changes suggest the influence ethylmethylhydroxypyridine on activities of enzymes of antioxidant protection. The data obtained can be the basis for assessing the use of drugs of this group in the treatment of patients with alcoholism.

Keywords: alcohol, alcoholism, ethanol, free radicals, antioxidants, catalase, superoxide dismutase, alcohol withdrawal syndrome, alcohol withdrawal

Алкоголизм определяет возникновение огромных социальных [1] и медицинских [7] проблем в России. Формирование алкогольной абстиненции рассматривается в качестве важнейшего критерия зависимости от алкоголя. Согласно данным Афанасьева В.В. (2002) в этих условиях происходит активация ферментов второстепенной, по сравнению с алкоголь/ацетальдегиддегидрогеназной системой, микросомальной этанолокисляющей системы. Отрицательные молекулярные, патобиохимические последствия превращения этилового алкоголя при участии цитохрома Р450 2Е1 связаны с гиперпродукцией активированных метаболитов кислорода, которая оценена при помощи хемилюминесцентного анализа [3]. В результате чего свободнорадикальные субстанции начинают оказывать свое патологическое влияние на субстраты, ферменты, регуляторные сигнальные молекулы.

В связи с тем, что основной локализацией биотрансформации этанола являются гепатоциты, кажется важной оценка активности внутриклеточных ферментов антиоксидантной системы, которые формируют первую линию защиты от свободных ради-

калов. По мнению Хавинсона В.Х. с соавт. (2003), сопряженное функционирование пары супероксиддисмутаза/каталаза может обеспечить устранение большого количества продуктов неполного восстановления кислорода.

Вполне вероятно предположить, что исследование уровней активности одних из основных ферментов антиоксидантной системы можно рассматривать в аспекте оценки функциональных резервов организма на клеточном и тканевом уровнях [6].

Высокий тканевой уровень ферментативной активности супероксиддисмутазы выявлен Maturu P.et al. (2012) при хронической алкогольной интоксикации. Повышенная плазменная активность супероксиддисмутазы определена у пациентов в состоянии алкогольной абстиненции [2]. Другие авторы, наоборот, указывают на снижение активностей митохондриальной и цитозольной изоформ супероксиддисмутазы в период отмены этанола [9].

Каталазная активность крови пациентов, находящихся в состоянии алкогольной абстиненции либо не отличалась от данных группы сравнения [4], либо была снижена [10]. В тоже время имеются данные Schlorff E.C. et al. (1999) о дозозависимом увеличении активности каталазы при исследовании влияния этанола на активность данного фермента.

Применение синтетических антиоксидантов для воздействия на интенсивность свободнорадикальных реакций в патологии не теряет своей актуальности [5].

С целью оценки состояния первой линии ферментативной антиоксидантной защиты клеток печени при экспериментальном синдроме отмены этанола и влияния на активность данных ферментов препарата, содержащего этилметилгидроксипиридина гидрохлорид, нами было проведено исследование активности супероксиддисмутазы и каталазы в гомогенатах печени лабораторных животных.

Материалы и методы исследования

Для формирования синдрома отмены этанола использовали модель экспериментального алкоголизма, разработанную проф. А.Х. Абдрашитовым и соавт. (1983). Животным подопытной группы вводили 25% раствор этанола в дозе 8 г/кг в сутки в течение 4 дней и 4 г/кг на 5 сутки. Животным контрольной группы проводилось интрагастральное, эквиобъемное введение воды.

В эксперименте использовали 75 беспородных крыс-самцов массой 180-220 г. Животные были разделены на 5 групп: контрольную (группа К, n = 15); А1 (n = 15) – животные, подвергшиеся декапитации через 1 (одни) сутки после последнего введения алкоголя; А2 (n = 15) – животные, подвергшиеся декапитации через 2 (двое) суток после последнего введения алкоголя; А + Э1 (n = 15) – животные, подвергшиеся декапитации через 1 (одни) сутки после последнего внутримышечного введения алкоголя на фоне применения препарата «Эмоксипин» в дозе 5 мг/кг; А + Э2 (n = 15) – животные, подвергшиеся декапитации через 2 (двое) суток после последнего внутримышечного введения алкоголя на фоне применения препарата «Эмоксипин» в дозе 5 мг/кг.

Осуществлялась перфузия ткани печени охлажденным до 4 °С физиологическим раствором. Для получения гомогенатов печени использовали сахарозную среду выделения, которая содержала 0,25 М сахарозы, 0,01 М Трис, 0,01 М ЭДТА. Затем гомогенаты центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. при температуре ниже 4 °С. Надосадочная жидкость использовалась для определения активности каталазы по Королюк М.А. (1988), супероксиддисмутазы по Сирота Т.В. (1999). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью компьютерных программ AnalystSoft Inc., Statplus, версия 5 и Microsoft Excel. Оценку статистической значимости различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Метод определения активности каталазы основан на образовании окрашенного в желтый цвет комплекса неразрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония. Готовили две пробы – холостую и опытную. Для этого в две пробирки наливали по 2 мл 0,03%-ного раствора пероксида водорода. Затем в опытную пробу вносили 0,01 мл гомогената, в холостую – 0,01 мл воды. Пробы перемешивали и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. По завершении инкубации реакцию останавливали добавлением 1 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Измеряли экстинкцию опытной и холостой проб на фотоэлектроколориметре при длине волны 400 нм против дистиллированной воды. Полученные значения использовали для расчета активности фермента, которую выражали в мкат/г белка.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) проводили по методу Сирота Т.В. (1999). Принцип метода заключается в ингибировании реакции автоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии супероксиддисмутазы вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов окисления и, по-видимому, одновременным участником его последующих стадий. Об интенсивности автоокисления адреналина судят по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, опережающего по времени образование адренохрома (с максимумом поглощения при 480 нм). Измерение проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см, в которую вносили 3,0 мл бикарбонатного буфера (pH = 11), 0,05 мл 10% гомогената и 0,15 мл 5,46мМ раствора адреналина. После внесения адреналина в пробу содержимое кюветы быстро перемешивали. Изменение оптической плотности регистрировали в течение 3 минут. Аналогичным образом обрабатывали и холостую пробу, содержащую все компоненты, кроме гомогената. Для расчета активности супероксиддисмутазы использовали показатели величины поглощения холостой и опытной проб. Активность фермента выражали в ЕД/мг белка.

Результаты исследования и их обсуждение

При оценке активностей супероксиддисмутазы и каталазы в первые сутки формирования синдрома отмены этанола статистически значимых различий выявлено не было.

На 2 сутки отмены повышена на 47,5 % ($pU < 0,001$) по сравнению с данными контроля активность супероксиддисмутазы – внутриклеточного фермента, обладающего способностью, указанной J. Tainer J. et al. (1983), дисмутировать супероксидные радикалы, обрывая тем самым цепь свободнорадикальных реакций в самом начале. Нарабатываемая супероксиддисмутазой нерадикальная активная форма кислорода – пероксид водорода – подвергается детоксикации при участии каталазы и, по данным Fridovich I. et al. (1983), представляет собой гемопротеин, состоящий из четырех идентичных субъединиц, содержащих в качестве простетической группы гем с трехвалентным железом. Статистически значимых отличий в активности каталазы от данных контрольной группы не обнаружено.

При моделировании алкогольной зависимости на фоне применения «Эмоксипина» статистически значимых отличий в активностях супероксиддисмутазы и каталазы в гомогенатах печени животных не отмечается.

По Chang L. et al. (1988), большая часть интрацеллюлярной энзиматической активности Cu, Zn – зависимой супероксиддисмутазы распределена в гепатоцитах крыс между цитозолем, ядром и лизосомами. На цитоплазматическую часть приходится около 70 % количества фермента. Изменения активности, происходящие с цитозольной фракцией супероксиддисмутазы, связаны с модификацией регуляторных влияний на данный фермент.

Первым важным моментом в этом отношении является регуляция активности супероксиддисмутазы с помощью количества образующихся в клетках супероксидных анион-радикалов. В прокариотических клетках Hassan H. et al. (1977) показана возможность влияния содержания супероксида на уровень каталитической активности Mn-зависимой супероксиддисмутазы через воздействие на генетические компоненты.

Данные литературы о регуляторных воздействиях на активность супероксиддисмутазы в эукариотических клетках, связанные с уровнем супероксидных анион-радикалов, свидетельствуют о значительной аналогии с результатами, показанными на прокариотах. Исследования Giri S. et al. (1983) в условиях гипероксии и при использовании блеомицина, являющегося индуктором генерации супероксидных радикалов кислорода, выявили увеличение как количества, так и активности супероксиддисмутазы.

При оценке эффектов этилового спирта на гепатоциты Harrison-Findik D. et al. (2013) установлено, что он может вызывать, по крайней мере, двукратное усиление продукции супероксида. В свою очередь, эксперименты Wheeler M. (2001) со сверхэкспрессией митохондриальной Mn-зависимой супероксиддисмутазы выявили уменьшение образования аддуктов гидроксиэтильного радикала, предупреждение повышения активности аланиновой аминотрансферазы в крови при моделировании действия этанола на печеночную ткань.

Второй важной составляющей, согласно Salo D. et al. (1980), которая определяет внутриклеточную супероксиддисмутазную активность, является принцип обратной связи, заложенный в основание регуляции реакции дисмутации супероксида. Исходя из этого принципа, можно предполагать эффективную инактивацию пероксида водорода под влиянием каталазы печени.

Увеличения активности каталазы при моделировании алкогольной абстиненции ни вне применения модификаторов свободнорадикальных процессов, ни в условиях их использования не происходит. Однако, предполагающие моменты к этому присутствуют. Минорная каталазная система биотрансформации избыточного количества экзогенного этанола, по мнению Manzo-Avalos S. et al. (2010), должна быть активирована в условиях формирования физической зависимости от алкоголя, проявить свое действие и окислить при участии пероксида водорода избыток внешнего субстрата – этилового спирта.

Вполне вероятно, что в этом случае пероксидазное влияние восполняется функционированием глутатионпероксидазы. Это может объяснить отсутствие статистически значимых различий активности каталазы при исследовании гомогенатов печени при моделировании алкогольной зависимости. Повышение активности супероксиддисмутазы ткани печени может быть обусловлено ее защитным действием на другие ферменты антиоксидантной защиты.

Следующим возможным фактором изменения активности супероксиддисмутазы могут явиться изменения в ре-

гуляторных воздействиях через антиоксидант-респонсивный элемент. Похожие на данный элемент последовательности обнаружены, по информации Ferro D. et al. (2015), уже у простейших в промоторных областях генетического материала. В организме крыс Wang F. (2014) показано наличие в мРНК антиоксидант-чувствительных регионов. Ляхович В.В. (2006) указывает на то, что супероксиддисмутаза-1 человека относится к белкам, активация которых происходит через антиоксидант-респонсивный элемент. По результатам исследований, проведенных Han K. et al. (2016) сигнальные пути регуляции активности супероксиддисмутазы посредством антиоксидант-чувствительного элемента оказались включены в общий план защитной антоксидантной функции при алкогольной патологии.

Обязательным параметром, определяющим регуляцию активности супероксиддисмутазы, является наличие, состояние транспорта, обмена меди в организме. Включение ионов меди при трансляции белка супероксиддисмутазы сопряжено с функционированием путей, которые критическим образом зависят от активности медь-переносящих АТФ-аз: ATP7A, ATP7B. По сообщению Linz R. et al. (2007) данные АТФ-азы обеспечивают контроль за внутриклеточным содержанием меди, удалением избытка этих ионов во внеклеточное пространство. Ozumi K. et al. (2012) показано, что получение ионов меди данными белками определено действием медь-зависимого фактора транскрипции Atox1 (Antioxidant1)

Плазменный уровень меди и церулоплазмина, по данным Uhlikova E. et al. (2008), снижен у больных алкоголизмом. Однако тканевой уровень ионов меди в печени отмечался Rodríguez-Moreno F. et al. (1997) повышенным у пациентов с алкоголь-индуцированными поражениями печени. В исследованиях Gonzalez-Reimers E. et al. (1998) не наблюдалось изменений в обменен меди при исследовании влияния алкоголя на различные ткани и биологические жидкости у животных.

Другим аспектом изменения активности супероксиддисмутазы является регуляция функционирования данного фермента при помощи эндокринных факторов желез внутренней секреции. Nelson D. et al. (1975) показана способность кортикостероидов активировать продукцию супероксидных анион-радикалов в печени крыс. Cvijić G. et al. (1995) указывают, что глюкокортикоиды в гипоталамусе крыс снижают активность супероксиддисмутазы.

Результаты Gavan N. et al. (1997) и Zlatković J. et al. (2011), соответственно, свидетельствуют о том, что в коже и в печеночной ткани происходит активация супероксидисмутазы под влиянием гормонов коры надпочечников.

Известно, что и в условиях избыточного потребления алкоголя и в условиях абстинентного синдрома происходят изменения в работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, что выражается в увеличении концентрации циркулирующих в крови глюкокортикоидных гормонов [8]. Биологическую целесообразность этого Stephens M. et al. (2012) определяют в связи с ролью глюкокортикоидов в функционировании системы «подкрепления», в протекании когнитивных процессов, с нарушениями которых, во многом, связано возникновение рецидивов алкогольной болезни

Влияние низкого уровня тиреоидных гормонов, по данным Pereira B. et al. (1994) коррелирует с уменьшением активности как митохондриальной, так и цитозольной изоформ супероксиддисмутазы. Учитывая результаты Moreno F. et al. (1980), о том, что в высоких концентрациях гормоны щитовидной железы увеличивают активность микросомальной этанол-окисляющей системы, можно предполагать их вовлеченность в метаболические изменения, происходящие при хронической алкогольной интоксикации.

Механизм действия антиоксидантов группы гидроксипиридинов исследователи объясняют их антиметаболическим эффектом в отношении производных витамина В6. С этим эффектом связано их подавляющее влияние на метаболизм аминокислот и нуклеотидов и возникающие возможности компенсации в плане временного фактора для репарации свободнорадикально-поврежденных биомолекул [5].

Выводы

Данные об активности супероксиддисмутазы в ткани печени могут свидетельствовать о том, что:

- увеличение активности супероксиддисмутазы в период формирования отмены этанола может носить адаптивный характер;
- вероятен эффект «Эмоксипина» в отношении связывания супероксидных анион-радикалов при моделировании алкогольной зависимости.

Список литературы

1. Беляева Т.К. Социальные причины и последствия алкоголизма у сельского населения России / Т.К. Беляе-

ва, А.Г. Пухова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 6-2. – С. 322-325.

2. Бохан Н.А. Антиоксидантные ферменты крови больных алкоголизмом при микроволновой резонансной терапии // Наркология. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 82-84.

3. Ефременко Е.С. Железо-индуцированная хемилюминесценция и обмен глутатиона при экспериментальном синдроме отмены этанола / Е.С. Ефременко, В.Е. Высокогорский // Омский научный вестник. – 2006. – № S3-2 (37). – С. 127-131.

4. Ефременко Е.С. Свободнорадикальное окисление при развитии алкогольной абстиненции: автореф. дисс. канд. мед. наук. – Челябинск, 2006. – 23 с.

5. Кольтовер В.К. Антиоксидантная биомедицина: от химии свободных радикалов к системно-биологическим механизмам // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2010. – № 1. – С. 37-43.

6. Курзанов А.Н. Методологические аспекты оценки функциональных резервов организма // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2-0. – С. 153.

7. Лещенко Я.А. Заболеваемость и смертность населения Восточной Сибири в связи с употреблением алкоголя / Я.А. Лещенко, А.В. Боева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 3-1. – С. 77-82.

8. The importance of glucocorticoids in alcohol dependence and neurotoxicity / A.K. Rose [et al.] // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2010. – V. 34. – Issue 12. – P. 2011–2018.

9. Ribiere C. Liver superoxide dismutases and catalase during ethanol inhalation and withdrawal / C. Ribiere // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1983. – V. 18. – P. 263–266.

10. Parthasarathy R., Kattimani S., Sridhar M. Oxidative stress during alcohol withdrawal and its relationship with withdrawal severity / R. Parthasarathy, S. Kattimani, M. Sridhar // Indian J. Psychol. Med. – 2015. – V. 37. – Issue 2. – P. 175–180.