

УДК 616.36+616.89-008.44.13:541.515

© Коллектив авторов, 2009.

ПРОЦЕССЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

А. А. Бабанин, Т. В. Семенова, А. Н. Захарова, Е. Н. Нестеров*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, кафедра судебной медицины с курсом права, кафедра общей химии.*

FREE RADICAL OXIDATION PROCESSES AT ALCOHOL DISEASE OF LIVER

A. A. Babanin, T. V. Semyonova, A. N. Zakharova, E. N. Nesterov

SUMMARY

One of the most important problems of modern medicine is liver damage at alcohol disease. The processes of free radical oxidation of proteins have been investigated. The results show that alcohol contributes to increase of toxic products resulting into functional impairment of liver.

ПРОЦЕСИ ВІЛЬНОРАДІКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ ПРИ АЛКОГОЛЬНОМУ ПОШКОДЖЕННІ ПЕЧІНКИ

А. А. Бабанін, Т. В. Семенова, А. Н. Захарова, Є. Н. Нестеров

РЕЗЮМЕ

Одна з важливих проблем сучасної медицини - ушкодження печінки при її алкогольної хвороби. Було вивчено стан вільнорадикальних процесів окислення білків. Отриманні результати показують, що алкоголь являється фактором підвищення рівня токсичних речовин, при цьому знижуються функціональні здібності печінки.

Ключевые слова: алкоголь, окислительная модификация белков, алкогольная болезнь печени.

Несмотря на появление в последние годы новых этиологических факторов поражения печени, одним из ведущих среди них остается алкоголь. Алкоголь является веществом, обладающим универсальным токсическим действием на различные органы, что позволяет сделать вывод о системном влиянии алкогольной интоксикации и выделить самостоятельную нозологическую единицу - алкогольную болезнь.

Выделяют несколько клинико-морфологических форм алкогольной болезни (печеночная, сердечная, мозговая, почечная) [1, 2]. Наиболее часто встречается печеночная форма алкогольной болезни, поскольку это связано со значительным участием этого органа в окислении этанола.

В настоящее время доказано, что алкогольный стеатоз, гепатит (острый и хронический), цирроз печени являются стадиями прогрессирования алкогольной гепатопатии [3, 4].

Имеющиеся в настоящее время в литературе данные свидетельствуют об усилении процессов липопероксидации, однако состояние процессов окислительной модификации белков при алкогольной болезни является практически неизученным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты были проведены на 80 нелинейных половозрелых крысах обоего пола с массой тела от 200 г до 250 г, разделенных на 4 серии. Контрольная серия – интактные животные. Первая серия опытов - группа животных, которым однократно внутрижелудочно ежедневно вводился 40%-ный этанол в дозе 0,015 мг чистого этанола на 1 г массы тела (по В.А. Кононченко) в течение 30 суток [5]. Вторая серия опытов

- группа животных, которым однократно внутрижелудочно вводился 40%-ный этанол в дозе 0,015 мг чистого этанола на 1 г массы тела в течение 90 суток. Третья серия опытов - группа животных, которым однократно внутрижелудочно вводился 40%-ный этанол в дозе 0,015 мг чистого этанола на 1 г массы тела в течение 180 суток.

Животные содержались в стандартных условиях и на стандартном рационе питания. При работе были использованы «Научно-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» [6]. Для забора крови и ткани печени крыс забивали декапитацией. Ткань печени использовали для морфологических исследований. Для проведения морфологической оценки ткани печени срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Для изучения состояния соединительнотканых элементов срезы окрашивали по методу Ван - Гизон.

Для оценки степени тяжести и объема алкогольных поражений печени при проведении морфологических исследований в различных сериях определяли тип алкогольного повреждения и условную степень его тяжести (0, 1, 2). За нулевую степень принимали полное отсутствие того или иного вида повреждения. К первой степени (слабо выраженные изменения) относили те случаи, в которых дистрофические изменения ограничивались отдельными очагами вакуолизации в единичных полях зрения, а портальные инфильтраты встречались не более одного в некоторых полях зрения; при этом дисциркуляторные изменения заключались в полнокровии междольковых вен (но не синусоидов). Вторая степень

(умеренные и значительно выраженные изменения) характеризовалась диффузной вакуолизацией гепатоцитов в большей части долек или во всех дольках в поле зрения, наличием портальных инфильтратов в каждом поле зрения, а также диффузной гиперемией синусоидов и междольковых сосудов.

Сыворотку крови для биохимических исследований получали из цельной крови центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут.

Изучение спонтанной окислительной модификации белков сыворотки крови проводилось по методу Левина в модификации Дубининой Е.Е. [7, 8, 9]. Молекулы средней массы определяли по методу Габриэлян Н.И. в модификации Брасюк Д.Л. [10, 11].

Полученные данные обрабатывались статистически, методом дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биотрансформация этанола, поступающего в организм, осуществляется посредством нескольких ферментативных систем. Ферментативные системы окисления алкоголя достаточно хорошо изучены и, в целом, их можно свести к следующему: основная роль в окислении этанола принадлежит ферменту алкогольдегидрогеназе (АДГ), которая определяет скорость катаболизма этанола и превращает алкоголь в ацетальдегид. В настоящий момент выделяют две фракции АДГ, конвертирующих этанол в ацетальдегид: желудочная фракция АДГ и печеночная фракция АДГ. Печеночная фракция АДГ является цитозольным никотинамиддинуклеотидом (НАД) зависимым ферментом и окисляет различные биогенные алкоголи, в т.ч. и этанол, если его тканевая концентрация не превышает 10 ммоль/л.

При хроническом употреблении алкоголя в высоких дозах, окисление алкоголя наряду с алкогольдегидрогеназой, также осуществляется минорной системой микросомального окисления, которая способна участвовать в реализации токсических эффектов, связанных с тем, что при окислении ацетальдегида этой системой продуцируются активные формы кислорода, инициирующие реакции свободно-радикального окисления. Таким образом, в процессах утилизации алкоголя, активные формы кислорода (АФК) образуются в результате катаболизма этанола минорной системой микросомального окисления.

Супероксидные анионы или АФК, к которым относятся супероксид анион-радикал $\bullet\text{O}_2^-$, перекись водорода H_2O_2 , гидроксил радикал $\text{OH}\bullet$, инициируют процессы свободнорадикального окисления. Интенсификация процессов свободнорадикального окисления, является одной из причин вызываемых алкоголем повреждений, сопровождаемых накоплением в печени и крови высокотоксичных продуктов перекисного окисления, что снижает функциональные возможности печени и приводит к развитию функциональных и структурных нарушений, в т.ч. и в дру-

гих тканях и органах.

С целью изучения процессов окислительной модификации белков (ОМБ) были проведены исследования по определению карбонильных соединений, образующихся в состоянии окислительного стресса, вызванного действием этанола. Исследования проводились на спектрофотометре СФ - 2000 при длине волны 363 нм. Установлено, что уровень содержания карбонильных соединений в белках сыворотки крови значительно увеличивается по сравнению с контролем. Результаты исследований в экспериментах по моделированию поражения печени посредством алкоголя представлены на рис. 1.

Как показали исследования, превышение карбонильных продуктов в первой серии составило 4,65 раза, во второй серии - в 4,65 раза, а в третьей серии превышение токсичных карбонильных продуктов окислительной модификации белков составило 4,75 раз по сравнению с контрольной группой.

Повышенному содержанию продуктов окислительной модификации белков сопутствовало увеличение содержания пептидов средней массы (ПСМ). Регистрация полученных результатов производилось на длине волны 254 нм. Увеличение содержания ПСМ в 1-й серии составляло 1,61 раза, во 2-й серии 1,61 и в 3-й серии 1,69 раза по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

Наряду с биохимическими показателями оксидантного стресса, проводилась морфологическая оценка состояния ткани печени.

В результате морфологического исследования выявлено, что алкогольная интоксикация у крыс, вызванная 30-суточным внутрижелудочным введением этанола, способствовала развитию диффузной жировой дистрофии гепатоцитов, более выраженной в центральных частях долек печени. Отмечались также дисциркуляторные изменения в виде расширения синусоидов, стаза и гемагглютинации (сладж). В перипортальной зоне встречались единичные лимфогистиоцитарные инфильтраты, содержащие небольшое количество лейкоцитов.

При 90 суточной алкогольной интоксикации определялись более выраженные патологические изменения в ткани печени: наряду с сохранявшейся и нараставшей жировой дистрофией, появлялись признаки баллонной дистрофии. При этом имели место повреждения ядер гепатоцитов в виде изменения карิโอлеммы, конденсации хроматина. Синусоиды были расширены, в их просвете содержалось большое количество эритроцитов с признаками гемолиза. Усиливалась гистиолимфоцитарная инфильтрация, увеличивалось содержание лейкоцитов, что свидетельствует о воспалительном процессе и развитии алкогольного гепатита, также определялись очаги фиброза печеночной ткани.

В третьей серии опытов (180-суточная алкоголизация) усиливалась диффузная вакуолизация гепа-

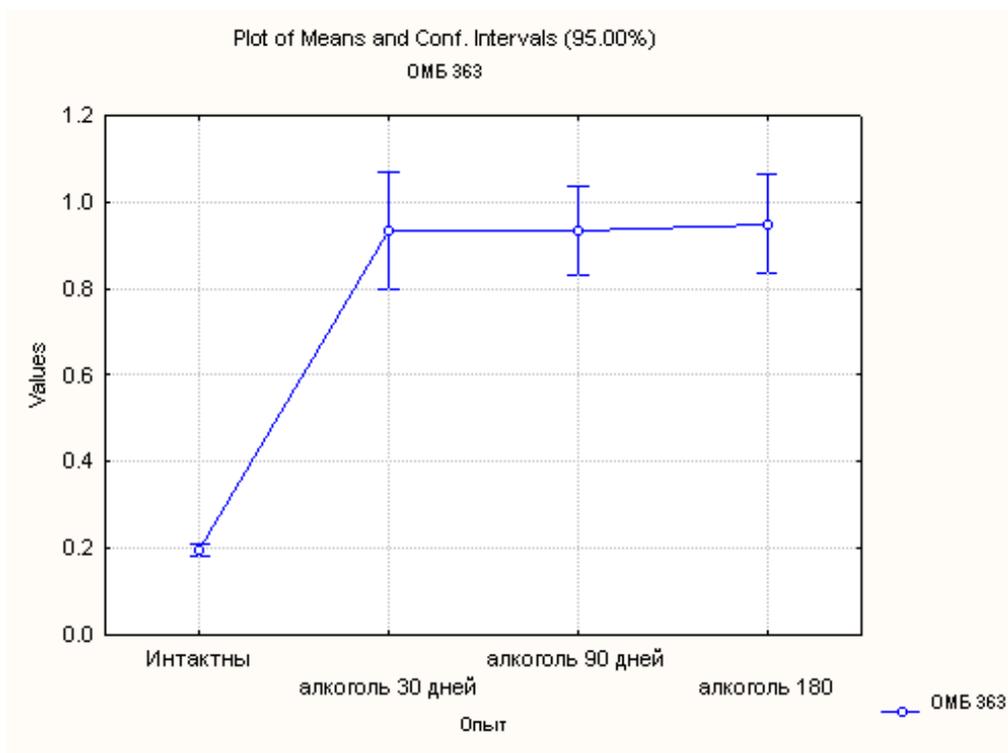


Рис. 1. Состояние процессов ОМБ при поражении печени алкоголем в различные сроки алкогольной интоксикации.

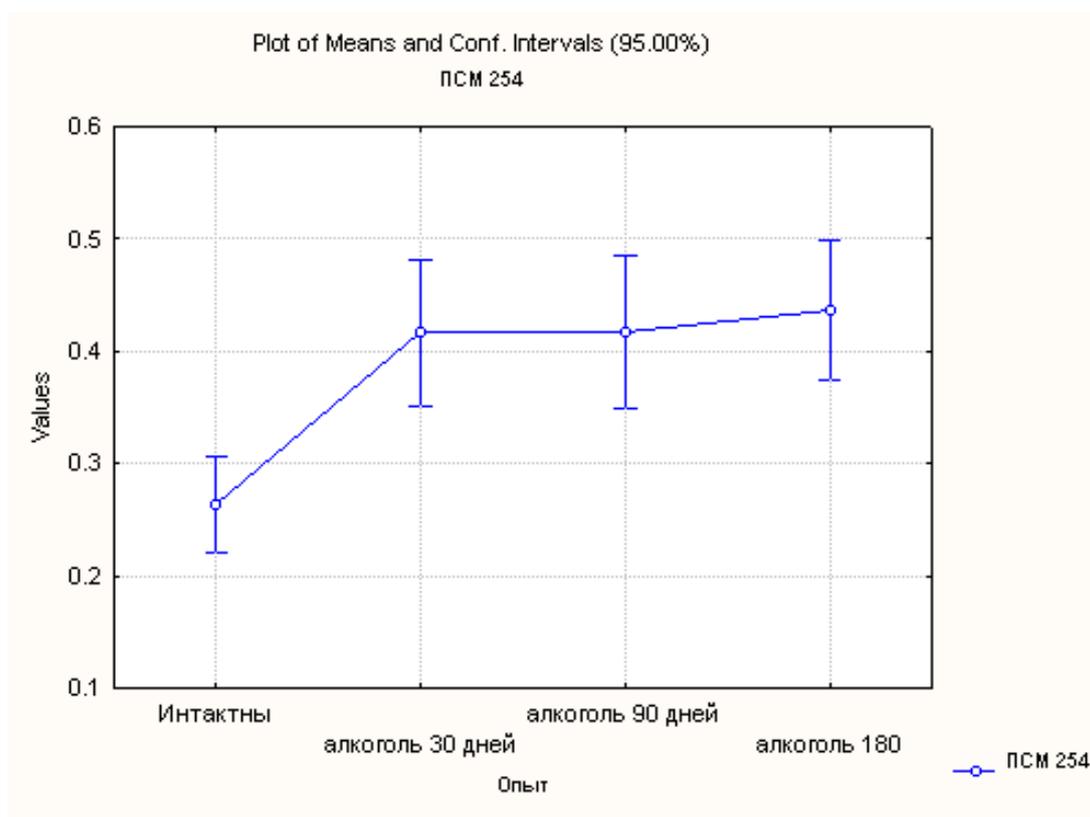


Рис. 2. Содержание ПСМ при алкогольном поражении печени в различные сроки алкогольной интоксикации.

тоцитов. В портальных трактах имелись гистиолимфоцитарные инфильтраты, в том числе вокруг желчных протоков, значительные по площади, в некоторых срезах – плазморрагии стенок артерий, иногда центральных вен, а также выраженный фиброз и гиалиноз стромы портальных трактов.

Таким образом, установлено, что наиболее ха-

рактерные повреждения печени разной интенсивности и объема можно разделить на три типа: а) дисциркуляторные - гиперемия синусоидов и центральных венул; б) альтеративные изменения в виде жировой и гидропической дистрофии гепатоцитов; в) мононуклеарные инфильтраты портальных трактов и перипортальной области.

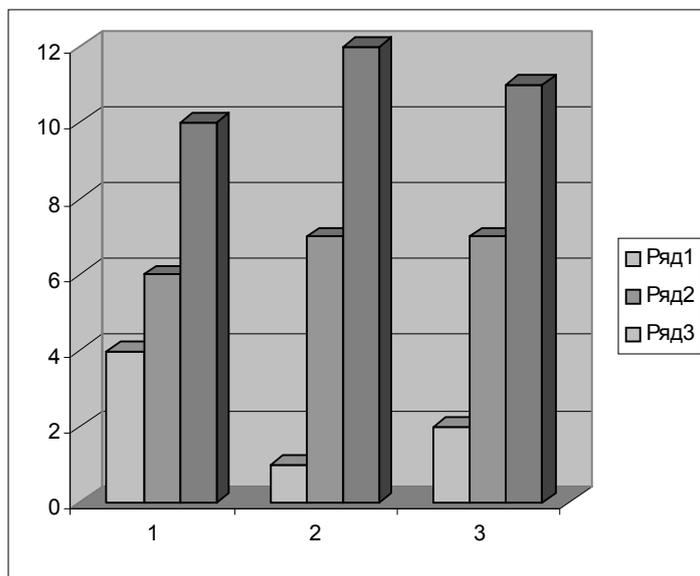


Рис. 3. Дисциркуляторные нарушения в печени крыс при различных сроках алкогольной интоксикации, где: 1 – первая серия алкогольной интоксикации (30 суток), 2 – вторая серия алкогольной интоксикации (90 суток), 3 – третья серия алкогольной интоксикации (180 суток); ряд 1 – 0 степень тяжести, ряд 2 – 1 степень тяжести, ряд 3 – 2 степень тяжести.

В сравниваемых сериях методом полукочественного анализа подсчитывалось число животных с одинаковой степенью тяжести того или иного типа повреждения.

Как видно на рис. 3, наименее интенсивный характер дисциркуляторных нарушений отмечался в группе 30-суточной алкоголизации, на сроке 90 су-

ток сосудистая гиперемия достигает максимальных значений и остается стабильно высокой при сроке 180 суточной алкогольной интоксикации.

Такая же тенденция сохраняется и для показателей альтеративных изменений (рис. 4), что вероятно отражает нарастающий характер метаболических нарушений в печени.

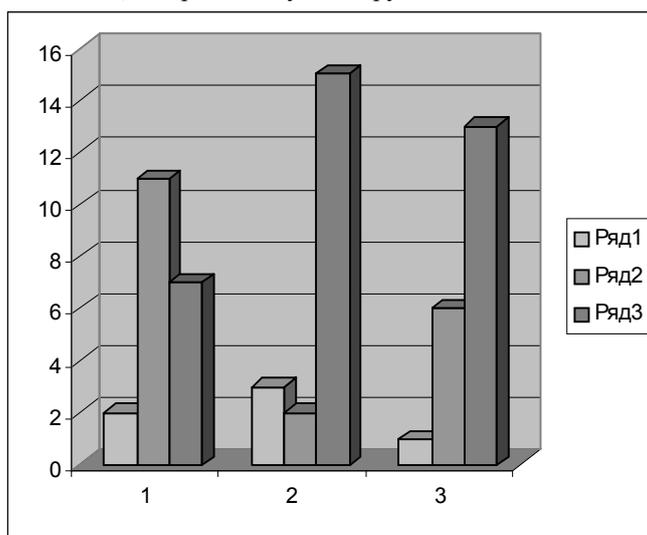


Рис. 4. Альтеративные изменения в печени крыс при различных сроках алкогольной интоксикации, где: 1 – первая серия алкогольной интоксикации (30 суток), 2 – вторая серия алкогольной интоксикации (90 суток), 3 – третья серия алкогольной интоксикации (180 суток); ряд 1 – 0 степень тяжести, ряд 2 – 1 степень тяжести, ряд 3 – 2 степень тяжести.

Динамика изменений воспалительного компонента представлена на рис. 5. Количество гистиолимфоцитарных инфильтратов неуклонно возрастает с длительностью алкогольной интоксикации и дости-

гает наибольшего уровня к 180 суткам алкоголизации, что свидетельствует о прогрессировании воспалительной реакции.

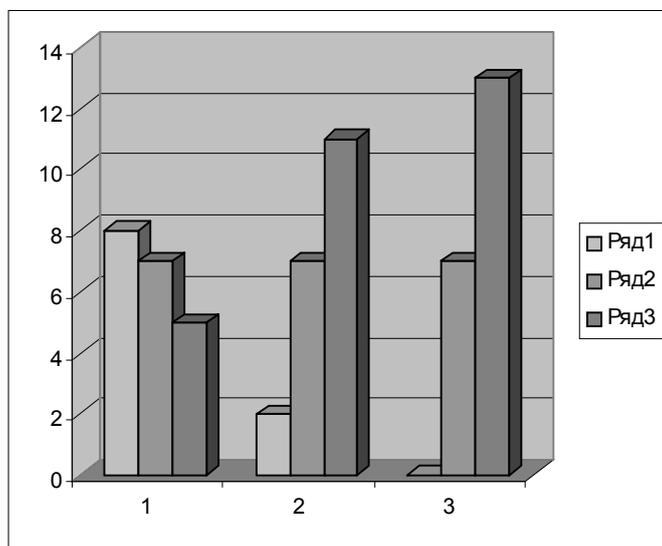


Рис. 5. Гистиолимфоцитарные инфильтраты в печени крыс на различных сроках алкогольной интоксикации, где: 1 – первая серия алкогольной интоксикации (30 суток), 2 – вторая серия алкогольной интоксикации (90 суток), 3 – третья серия алкогольной интоксикации (180 суток); ряд 1 – 0 степень тяжести, ряд 2 – 1 степень тяжести, ряд 3 – 2 степень тяжести.

Таким образом, на экспериментальных моделях хронического поражения печени у крыс, вызванного введением алкоголя, выявлено статистически значимое увеличение содержания в сыворотке крови продуктов окислительной модификации белков при всех сроках алкогольной интоксикации. Сравнивая биохимические и морфологические изменения в сыворотке крови и ткани печени животных установлено, что выраженность и глубина морфологических изменений в печени коррелирует с динамикой содержания продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови животных под влиянием алкогольной интоксикации на различных сроках.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о значительном участии продуктов свободно-радикальных процессов в развитии патологических изменений в клетках печени, приводящих к различным формам алкогольной болезни от алкогольного стеатоза до цирроза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев П.Я., Яковенко И.Н. Алкогольная болезнь печени // Московский мед. журнал. – 1998. – № 5. – С. 13-15.
2. Schellenberg F., Well J. // Alcohol and alcoholism. – 1987. – Suppl. P. 625-629.
3. Маколкин В.И. Патогенез и эволюция поражения внутренних органов при хроническом алкоголизме // Тер. архив. – М. Мед. – 1987. – № 2. – С. 3-6.
4. Серов В.В. Лапшиш К.И. Морфологическая диаг-

ностика заболеваний печени // М. Мед. – 1989. – 336 с.

5. Кононяченко В.А., Фролов В.А., Дворников В.С., Могилевский В.М. Клинико-экспериментальные исследования реакции сердечно-сосудистой системы на алкоголь в зависимости от режима его употребления // Кардиология. – 1983. – № 7. – С. 102-103.

6. Кожемякин Ю.М. та соавт. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними // Київ. – 2002. – 155 с.

7. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al. Meth. Enzymol. – 1990. – V.186. – P. 464-478.

8. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед. химии. – 1995. – № 1. – С. 24-26.

9. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В. и др. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) // Вопр. мед. химии. – 2000. – № 4. – С. 1-11.

10. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лаб. дело. – 1984. – № 3. – С. 138-140.

11. Брасюк Д.Л. Модификация метода определения молекул средней массы // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 1. – С. 18.

12. Гуляева Н.В., Ерин А.Н. Роль свободнорадикальных процессов в развитии нейродегенеративных заболеваний // Нейрохимия. – 1995. – т. 12. Вып. 2. – С. 3-14.