

## ПРОГРЕССИРОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ СЕМИДНЕВНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Жукова О.Ю., Высокогорский В.Е., Притыкина Т.В.  
*Омская государственная медицинская академия,  
Центральная научно-исследовательская  
лаборатория, Омск*

По современным представлениям сахарный диабет и алкогольное поражение печени относятся к группе свободнорадикальной патологии [Shmidt, 1992]. Развитие аллоксанового сахарного диабета связывают, главным образом, с окислением сульфгидрильных (HS-) групп [Szkudelski, 2001]. Тиолсодержащие соединения – молекулы, имеющие в своем составе HS-группы, очень широко представлены в клетке в виде небелковых (глутатион, цистеин, гомоцистеин, N-ацетилцистеин, дигидролипоевая кислота) и белковых соединений и участвуют практически во всех ключевых биохимических процессах: энергетическом обмене, рецепции, катализе и т.д. Известно также, что тяжелые металлы, среди которых особое место занимает ртуть (в связи с высокой токсичностью низких доз) обладают выраженным сродством к HS-группам и вызывают сахарный диабет. Старое название тиолов – «меркаптаны» – подчеркивает их характерную черту реагировать с соединениями ртути [Торчинский Ю.М., 1971]. В последнее время в клинической практике нередко выявляется состояние, называемое микромеркуриализмом, которое развивается в результате длительного (8-10 лет) воздействия малых концентраций ртути (на уровне ПДК) и характеризуется признаками окислительного стресса и наличием свободнорадикальной патологии. Общность патогенеза меркуриальной и аллоксановой интоксикаций позволяет считать аллоксан фактором меркуриального типа, т.е. вызывающим повреждение HS-групп также как ртуть, и использовать его для моделирования сахарного диабета с меркуриальной отягощенностью.

Мотивация к употреблению алкоголя на фоне сахарного диабета может иметь несколько оснований: стремление понизить уровень глюкозы крови за счет некоторого гипогликемического действия алкоголя при эпизодическом употреблении, получить антиоксидантное действие, благодаря свойствам самой молекулы этанола, и профилактировать атеросклероз, руководствуясь сведениями о способности алкоголя понижать уровень атерогенного холестерина крови. Однако при употреблении алкоголя на фоне окислительного стресса формируется этанол-зависимая оптимизация биохимических процессов [Фонякова О.Г., 1996; Аксенов А.В., 2004], т.е. появляется тяга к спиртным напиткам, и эпизодическое употребление перерастает в алкогольные запои, что приводит к развитию алкогольной интоксикации.

**Цель исследования:** оценить основные показатели окислительного стресса в ткани печени и сыворотке крови при алкоголизации в течение семи дней на фоне аллоксанового сахарного диабета.

## Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 37 самцах белых беспородных крыс. Сахарный диабет моделировали интраперитонеальным введением аллоксана (160мг/кг). Через 2 недели отбирали животных, имевших стойкую гипергликемию выше 11,1 ммоль/л, без кетонурии. Алкогольную интоксикацию вызывали ежедневным интраперитонеальным введением 25% этанола в дозе 2г/кг после кормления на протяжении 7 дней. Животные были разделены на 4 группы: 1 группа – крысы, получавшие инъекции 0,9% раствора NaCl (группа контроля – К, n=9), 2 группа – крысы с алкогольной интоксикацией (А, n=9), 3 группа – животные с сахарным диабетом (СД, n=10), которым также вводился 0,9% раствор NaCl вместо алкоголя, 4 группа – животные с алкогольной интоксикацией на фоне сахарного диабета (СДА, n=9). Через сутки после последнего воздействия животных декапитировали под общим эфирным наркозом. В надмитохондриальной фракции гомогенатов ткани печени исследовали активность антиоксидантных ферментов: глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) по методу D.E.Paligia, W.N.Valentine [1967], Cu,Zn-супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) [Т.В.Сирота, 1999], каталазы (КФ 1.11.1.6) [М.А.Королюк, 1988], глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) по методу Racker [1955] с небольшой модификацией, глутатионтрансферазы (КФ 2.5.1.18) по W.H.Nabig et al. [1974]; Fe<sup>2+</sup> - индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ) по Ю.А.Владимирову [1989]. Оценивали светосумму ХЛ за 3 мин (S), латентный период от момента введения ионов железа до начала медленной вспышки (τ) и амплитуду быстрой вспышки (h). В цельных гомогенатах ткани печени определяли концентрацию восстановленного глутатиона и количество доступных HS-групп на единицу белка по методу J.Sedlak, R.H.Lindsay [1968]. В сыворотке крови — активность глутатионпероксидазы, общее количество HS-групп на единицу белка и светосумму хемилюминесценции, индуцированной пероксидом водорода за 90 сек [А.К.Журавлев, М.П.Шерстнев, 1985]. Кинетику хемилюминесценции обрабатывали с помощью компьютерной системы Counter-2004. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным и гексокиназным методами, белок в пробах по методу O.H.Lowry et al. [1951]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Biostat, SPSS 11.5 и StatSoft Statistica 6.0. Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (U), нормальность распределения исключали по критерию Шапиро-Уилкса.

## Результаты исследований и обсуждение

В группе СД на момент проведения исследования (три недели течения диабета) отмечена тенденция к нормализации уровня гликемии крови и компенсации окислительного стресса: несмотря на низкий уровень восстановленного глутатиона (в 2,5 раза по сравнению с контролем), содержание общих HS-групп, активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР), каталазы ткани печени достоверно не отличалась от группы К, также как и все показатели хемилюминесценции печени; интенсивность хемилюминесценции сыворотки крови была ниже по срав-

нению с контрольной группой на 35,2% ( $p=0,009$ ) и, соответственно, более низкая активность глутатионпероксидазы сыворотки – на 32,5% ( $p=0,028$ ), тогда как содержание общих HS-групп достоверно не отличалось. Возможно, компенсация обусловлена активацией секреции инсулина, что нередко наблюдается при аллоксановом сахарном диабете. На возобновление продукции инсулина указывает и факт достоверного повышения активности супероксиддисмутазы (СОД) ткани печени в 2,2 раза по сравнению с контрольными животными ( $p<0,001$ ), так как биосинтез и время полужизни этого фермента зависит от инсулин/глюкагонового индекса.

В группе А при семидневной алкоголизации отмечался достоверно более низкий уровень глюкозы по сравнению со всеми группами [Медиана (Ме)=5,81,  $X\pm m=5,46\pm 0,34$  ммоль/л]. Однако показатели свободно-радикального окисления в ткани печени укладывались в характерную картину окислительного стресса. По данным хемилюминесценции величина  $h$ , показывающая общее содержание гидроперекисей в препарате, была выше контроля в 2,5 раза ( $p=0,001$ ), показателя  $S$ , отражающего количество образовавшихся перекисных радикалов на один ион железа (способность к развитию цепных процессов перекисления) – выше на 56,3% ( $p<0,001$ ), а показателя  $r$ , коррелирующего с антиокислительной активностью исследуемой ткани и зависящего от соотношения про- и антиоксидантов, – была ниже в 2 раза ( $p<0,001$ ). Причиной повышения содержания гидроперекисей могла стать более высокая, чем у животных контрольной группы активность СОД (на 56,8%,  $p=0,005$ ), наряду с относительно низкой активностью каталазы, соответствующей группе К. Активность ГПО участвующей, в отличие от каталазы, в утилизации не только перекиси водорода, но и гидроперекисей липидов, повышена на 28,3% ( $p=0,004$ ), т.е. в печени алкоголизованных крыс активно протекают процессы перекисного окисления липидов и мощность ГПО уже недостаточна, а своевременной адекватной активации каталазы не произошло. ГПО обезвреживает гидроперекиси с участием восстановленного глутатиона (GSH). Концентрация этого трипептида при данном сроке алкоголизации оказалась на 27,9% ниже, чем в печени животных контрольной группы ( $p<0,001$ ). Активность глутатионредуктазы, пополняющей пул GSH за счет восстановления окисленного глутатиона (GSSG), не изменилась, но увеличилось содержание доступных HS-групп (на 19,4% выше группы К,  $p=0,034$ ), которые, вероятней всего, являются белковыми. Белковые тиогруппы в неактивном состоянии спрятаны в глубине пространственной структуры или образуют -S-S- связи между отдельными фрагментами белковой молекулы, а также с низкомолекулярными тиолами. Это необходимо для предохранения их от инактивации. Увеличение количества доступных HS-групп, наряду со снижением уровня GSH, свидетельствует о существенной потере не только свободного глутатиона, но и связанного, из комплексов с белками. Кроме того, повышение доступности HS-групп может быть обусловлено развитием ацидоза в ткани печени на фоне введения алкоголя. Свободные радикалы в биологических системах выполняют различные физиологиче-

ские функции, например, выступая в качестве сигнальных молекул и факторов транскрипции, являясь индукторами синтеза интерлейкинов, что наблюдается, в частности, и при алкогольном поражении печени. Алкогольная интоксикация в течение семи дней способна вызвать токсический гепатит, в результате чего усиливается синтез белков острой фазы воспаления, богатых HS-группами. «Острофазовые» белки поступают из печени в кровь, поддерживая ее антиоксидантную емкость. В нашем случае, мы наблюдали отсутствие достоверных различий с контролем по интенсивности хемилюминесценции и активности ГПО сыворотки крови при значительном в 2,3 раза повышении содержания доступных HS-групп ( $p=0,001$ ).

В группе СДА достоверной нормализации гликемии не наблюдалось, уровень глюкозы крови был на 47,4% выше, чем у животных группы А ( $p=0,024$ ). Амплитуда быстрой вспышки ХЛ ниже на 49% ( $p=0,047$ ), но выше, чем при сахарном диабете без алкогольной интоксикации на 46% ( $p=0,016$ ). Активность СОД повышена по сравнению с группой К на 66,7% ( $p<0,001$ ), но относительно ниже, чем в группе СД на 23,9% ( $p=0,007$ ), с группой А достоверных различий нет. Активность каталазы ниже, чем при алкогольной интоксикации на 12,3% ( $p=0,027$ ), а повышение активности ГПО печени выражено в меньшей степени. Дискоординация ферментов первой (СОД) и второй (каталаза, ГПО) линий защиты должна логично приводить к увеличению содержания гидроперекисей, чего в данном случае не наблюдается. Известно, что генерация пероксида водорода и метаболизм этанола в целом приводят к закислению среды, индуцируя диссоциацию железа из ферритина, депо которого находится в печени. В присутствии свободных ионов металлов пероксиды подвергаются распаду некаталитическим путем с образованием наиболее активного и опасного гидроксильного радикала  $\cdot OH$ . Участие ионов металлов переменной валентности в разветвлении цепей перекисного окисления липидов сопровождается увеличением показателя  $S$  хемилюминесценции, что и было зафиксировано при исследовании надмитохондриальной жидкости гомогенатов печени в группе СДА: на 77,6% по сравнению с контролем ( $p<0,001$ ), 53,8% по сравнению с группой СД ( $p=0,003$ ), 13,7% в отношении А ( $p=0,038$ ). Сокращение длительности латентного периода в 1,9 раза по сравнению с К ( $p<0,001$ ) также как в группе А отмечено одновременно со снижением уровня GSH на 36,8% по сравнению с контрольными животными ( $p<0,001$ ). Тем не менее, содержание GSH в печени крыс, алкоголизованных на фоне сахарного диабета, превышало уровень этого трипептида у крыс группы СД на 56,4% ( $p=0,009$ ), активность ГР не отличалась, а содержание доступных HS-групп печени было достоверно ниже всех групп сравнения. Такая ситуация возможна при смещении равновесия в сторону низкомолекулярных тиолов из-за окисления или распада высокомолекулярных, что вполне вероятно в результате атаки  $\cdot OH$  радикала. Инактивация антиоксидантных и антиоксидических ферментов, в активном центре которых играют важную роль HS-группы, приводит к усугублению состояния. Так, уже отмеча-

лась низкая активность каталазы, кроме того, выявлено достоверное снижение активности глутатион-трансферазы: на 32,6% ( $p=0,001$ ) по сравнению с К, 25,8% ( $p=0,001$ ) – группой А и 26,2% ( $p<0,001$ ) – группой СД. В сыворотке крови активность ГПО достоверно не отличалась, содержание доступных HS-групп возросло аналогично животным группы А, но в более выраженной степени (выше контроля в 3,1 раза,  $p<0,001$ ; выше СД в 3,7 раза,  $p<0,001$ ; выше А на 35,1%,  $p=0,005$ ). Вместе с тем, интенсивность хемилюминесценции сыворотки крови была значительно выше всех групп сравнения (по отношению к группам К и А на 35,1%,  $p=0,005$ ; СД – в 2,1 раза,  $p=0,002$ ). Такой парадокс вполне объясним, если принять во внимание прогрессирующее окислительное стресса в печени: ацидоз и преобладание низкомолекулярных тиолов, а также повреждение высокомолекулярных биологически важных соединений ткани печени ·ОН радикалом и присутствие в достаточном количестве ионов свободных металлов на фоне дефицита инсулина. К белкам острой фазы воспаления, поступающим в кровь, присоединяются низкомолекулярные тиолы, в частности GSH. Кроме того, из поврежденной печени выходят металлы переменной валентности, ацидоз распространяется за рамки пораженного органа. В таких условиях тиолы крови превращаются в тиольные радикалы, становясь прооксидантами. Окислительный стресс приобретает системный характер.

Таким образом, при алкоголизации на фоне аллоксанового сахарного диабета в течение семи дней на первый план выходит нарушение наиболее слабого звена изучаемой патологии - тиол-дисульфидного обмена, т.е. сохраняется и усиливается меркуриальный характер нарушений, прогрессирует окислительный стресс, приобретая системный характер и утяжеляя течение сахарного диабета.

### **БИОРЕЦЕПЦИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ И БИОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ РЕФЛЕКСЫ – ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГИСТОГЕНЕЗА**

Зозуля Г.Г., Леоненко И.Г.,

Смирнов А.В., Фирсов Г.М., Акимова С.А.

*Волгоградский государственный медицинский  
университет, Волгоградская государственная  
сельскохозяйственная академия,  
Волгоград*

Аспекты истории в науке не менее важны, чем в жизни общества. Гистология, будучи частью биологии, не менее связана с физиологией, чем с анатомией. Однако, если преподавание микроскопической анатомии (частной гистологии) ведется давно, то изучению и преподаванию микроскопической физиологии принадлежит будущее. Приоритет в этом направлении принадлежит нашей стране, ибо со времен И.М.Сеченова и С.П.Боткина наша страна прочно стояла на позициях нервизма. Развивая далее роль нервной системы в регуляции целостного организма, И.П.Павлов считал, что будущее физиологии принад-

лежит физиологии клетки. Его последователи и ученики (К.М.Быков, В.Н.Черниговский) не только продолжили идеи о кортиковисцеральных взаимоотношениях, но и при изучении интероцептивных рефлексов вышли на передовые рубежи в изучении интероцепции тканей (В.Н.Черниговский, 1960).

Немалая заслуга в изучении интероцепции кровеносных сосудов и тканей принадлежит и Волгоградскому гос. мед. Университету. С 1952 года заведующими кафедрой нормальной физиологии становится коллега и последователь В.В.Парина и В.Н.Черниговского И.Н.Давыдов. На кафедре под руководством профессора И.Н.Давыдова разворачиваются широкие исследования по интероцепции кровеносных сосудов и тканей вплоть до 1969 года. Современные исследования сотрудников кафедр нормальной физиологии, гистологии вместе с кафедрами биологии и фармакологии, на которой в этот период и в последующем развернулись широкие исследования по фармакоцепции (Г.В.Ковалев, В.И.Петров, И.Н.Тюренков), позволили с клеточного перейти на качественно иной биомембранный уровень исследований. Универсальной физиологической моделью для перехода на новый биомембранный уровень исследований явились не только работы по гормоно- и фармакоцепции широко появившиеся в мировой литературе, но и концепция биорецепции (Г.Г. Зозуля, 1980), возникшая на базе интероцепции тканей, когда объектом исследований по гистологии (Н.П.Лукашенко, Ю.К.Богоявленский) и физиологии становился ларвоциста тканевого биогельминта эхинококка.

Первое определение концепции биорецепции появилось в научной литературе в 70-80 годы прошлого столетия и явилось оно своеобразным решением биологической задачи в результате бурного развития цитологии и генетики в этот период. Мы характеризовали биорецепцию как генетически детерминированный интегративный рефлексорный процесс, направленный на гомеостаз биологической системы. Эта концепция отражает не только филогенетический аспект, но и показывает неразрывную диалектическую связь биологии и экологии на различных уровнях интеграции в естествознании. Последующее развитие концепции биорецепции и изучение связанных с ней биологических реципрокных биорецептивных рефлексов (рефлексы Давыдова-Богоявленского-Зозуля) связано с контактами различных специалистов, среди которых Москве, Волгограду, С-Петербургу принадлежит ведущая роль. Кафедра гистологии Волгоградского государственного медицинского университета в интеграции с другими кафедрами стала морфологической базой изучения биоцепторов, главнейших структур биологических реципрокных биорецептивных рефлексов. Материалом для исследований на кафедре гистологии и эмбриологии служили не только ларвоцисты эхинококка (альвеококка) и принадлежащие к ним ткани промежуточных хозяев, полученные на мясокомбинатах г. Волгограда и Волгоградской области, от больных оперированных по поводу эхинококкоза в клиниках г. Волгограда, но и органы и ткани экспериментальных животных различных возрастных групп и животных