

УДК 616.36 – 002: 612. 354:611.36 – 018

КОРРЕКЦИЯ α -ТОКОФЕРОЛОМ НАРУШЕНИЙ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ У ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

В.М. Цыркунов (проф., д.м.н.), М.И. Бушма (ст. н. сотр., д.м.н.),
А.В. Васильев, В.У. Буко (проф., д.б.н.),
Л.Б. Заводник (доц., к.м.н.)

Гродненский государственный медицинский университет МЗ РБ
Институт биохимии НАНБ, г. Гродно

Введение крысам этанола (в желудок через зонд, 5,0 г/кг в виде 25% водного раствора, 1 раз в день, 40 дней) вызывает активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов и эндоплазматического ретикулума (ЭР) гепатоцитов, снижение антиокислительной активности, повышение уровня холестерина и общих фосфолипидов (преимущественно за счет фосфатидилэтаноламина и лизофосфатидилхолина). Кроме того, в ЭР гепатоцитов повышается содержание насыщенных и снижается – ненасыщенных (преимущественно арахидоновой) жирных кислот. Витамин Е (в/м, 50 мг/кг, 1 раз в день, 40 дней) оказывает нормализующее действие.

Аналогичные изменения и нормализующее действие витамина Е обнаружены при исследовании крови больных хроническим алкоголизмом. На основании проведенных исследований предлагается использование витамина Е для ослабления гепатотоксического действия этанола при различных вариантах алкогольного поражения печени независимо от стадии и характера процесса.

Ключевые слова: этанол, перекисное окисление липидов, фосфолипиды мембран, витамин Е.

Administration of ethanol to rats (5,0 g/kg in the form of 25 % aqueous solution into the stomach through a probe once daily within 40 days) results in POL activation in the membranes of erythrocytes and hepatocyte endoplasmic reticulum (ER), reduction of anti-oxidative activity, elevation of cholesterol and general phospholipids level (mainly due to phosphatidylethanolamine and lysophosphatidilcholine). In addition, the content of saturated fatty acids (mainly arachidonic acid) decreases in erythrocytes. Vitamin E (50 mg/kg i.m., once daily within 40 days) produces normalizing effect. Similar alterations and the normalizing effect of Vitamin E were found during examination of blood in patients with chronic alcoholism.

On the basis of the fulfilled studies the administration of vitamin E is proposed to weaken hepatotoxic effect of ethanol in any variations of the alcohol hepatic damage independently on the stage and character of the process.

Key words: ethanol, lipid peroxide oxidation, membrane phospholipids, vitamin E.

Введение

В последние годы убедительно показано, что в основе развития многих болезней лежит нарушение целостности мембранных образований клеток. Одним из важных пусковых механизмов этого процесса является атака мембран радикалами кислорода в результате стимуляции реакций ПОЛ [10, 16]. Среди факторов риска таких форм поврежденных клеток выделяют недостаточность витамина Е, алкоголизм и другие [11, 19]. Особое внимание уделяется обратимости начальных алкогольных гепато- и кардиомиопатий. Показано, что жировой гепатоз является следствием нарушения функции и структурной целостности мембран клеток пече-

ни в результате стимуляции реакций ПОЛ [15, 18]. Основными субстратами липопероксидации в этих условиях являются полиненасыщенные жирные кислоты. В результате окисление продуктов ПОЛ приводит к развитию аутолитических цепных процессов, в конечном итоге заканчивающихся гибелью клеток [20]. Одним из факторов, сдерживающих развитие этого процесса, является антирадикальный защитный биохимический механизм [14]. Установлению взаимосвязи между этими двумя процессами при начальной стадии алкогольной гепатопатии и посвящено данное исследование.

Методы исследования

Проведено 2 серии исследований.

I серия. Опыты проведены на 27 беспородных крысах-самках с исходной массой 120-140 г. Хроническую алкогольную гепатопатию воспроизводили путем ежедневного внутривенного введения 25% водного раствора этанола в дозе 5,0 г/кг массы тела в течение 40 дней. Для усиления гепатотоксичности алкоголя на всем протяжении опыта назначали *ad libitum* рацион, обеднённый незаменимыми жирными кислотами [21]. С этой целью использовали гранулированный корм следующего состава: белки – 10%, углеводы – 65 %, жиры (говяжий) – 16%, клетчатка – 6%. Минеральные соли и витамины добавляли согласно существующим рекомендациям с учетом потребности животных. С целью коррекции возможных алкогольных поражений печени назначали природный антиоксидант – α -токоферол (в/мышечно, на стерильном оливковом масле, 1 раз в день в дозе 50 мг/кг). Оценку гепатопротективных свойств витамина Е производили в сравнении с контрольными (этанол внутрь + оливковое масло в/мышечно) и интактными (вода внутрь + оливковое масло в/мышечно) животными. Забор исследуемого материала производили после декапитации животных, спустя 20 часов с момента последнего кормления.

II серия. Под наблюдением находилось 23 больных хроническим алкоголизмом 2 стадии (17 мужчин и 6 женщин) в возрасте 32-57 лет, находящихся на стационарном лечении в наркологическом диспансере в течение 6 месяцев. При поступлении у них был диагностирован алкогольный жировой гепатоз. К моменту исследования, на фоне полного исключения употребления алкоголя и проводимого противоалкогольного лечения, признаки жирового гепатоза при объективном осмотре выявлены лишь у 7 больных. Витамин Е больным назначали в/мышечно, 1 раз в день в виде 10% масляного раствора, по 1 мл в течение 14 дней. За неделю до введения препарата и в период лечения других лекарственных средств больные не принимали. Для контроля исследовали кровь 10 здоровых доноров аналогичного возраста и пола.

Для оценки степени тяжести алкогольного поражения печени и определения защитного действия витамина Е у животных и человека изучали 2 группы показателей: традиционные и характеризующие состояние процессов ПОЛ. Первая группа показате-

телей включала: определение содержания в сыворотке крови билирубина, активности АлАТ, щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), алкогольдегидрогеназы (АДГ), уровень тимоловой пробы и морфологическое исследование печени, подтвердившие наличие жирового гепатоза. Вторая группа показателей включала: 1) хемилюминесцентное исследование (первичные продукты ПОЛ) плазмы крови и мембран эритроцитов и эндоплазматической сети гепатоцитов; 2) содержание малонового диальдегида (МДА; конечные продукты ПОЛ) в эритроцитах; 3) антикоксидительную активность (АОА) плазмы крови, мембран эритроцитов [4, 5]; активность глутатион-S-трансферазы с сульфобромфталеином в качестве субстрата [13]. Кроме того, исследовали липидный компонент плазмы крови и мембран эритроцитов, который в значительной степени определялся интенсивностью реакций ПОЛ: содержание общих липидов [12, 17], фосфолипидов [6], холестерина [7]. Фракционирование фосфолипидов производили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле [9], жирнокислотный состав липидов определяли методом газовой хроматографии [3, 8]. Результаты исследований обработали общепринятыми методами вариационной статистики с использованием критерия t-Стрьюдента [1]. Динамика изменений показателей больных до и после лечения проанализирована методом существенности разности для спаренных выборок, позволяющим оценить направленность изменения значения отдельно для каждого индивидуума, сравнивая ее с нулевой гипотезой без нахождения средней ошибки [2].

Результаты и обсуждение

Установлено, что длительное (40 дней) ежедневное введение крысам этанола (в желудок, через зонд в виде 25% раствора в дозе 5,0 г/кг массы тела) не оказывает влияния на содержание первичных продуктов ПОЛ (интенсивность хемилюминесценции) в плазме крови (табл. 1). Однако в мембранах эритроцитов этот показатель под влиянием этанола возрастает на 67,3%. Аналогичные изменения наблюдаются и в содержании конечного продукта ПОЛ – МДА (увеличение на 73,3 %), что согласуется с падением АОА на 65,5 % (табл. 1).

При изучении липидного компонента мембран эритроцитов опытных крыс установлено, что эта-

Таблица 1. Влияние этанола (отдельно и в комбинации с α -токоферолом) на процессы ПОЛ и липидный состав крови и гепатоцитов крыс

Показатель	Контроль	Этанол	Этанол + α -токоферол
Сыворотка крови			
«БВ» ХЛ, имп/с	11,8 ± 1,88	14,2 ± 1,16	11,2 ± 1,66
Мембраны эритроцитов			
«БВ» ХЛ, имп/с	102,4 ± 7,54	171,3 ± 10,42*	159,5 ± 10,19*
МДА, ммоль/мин/мг белка	43,4 ± 2,69	75,2 ± 4,12*	61,5 ± 3,50* **
АОА, %	41,5 ± 3,93	16,4 ± 2,04*	32,3 ± 3,07* **
ОЛ, мг/100 мг сух. м-н	28,3 ± 1,43	32,8 ± 1,81	32,6 ± 1,73
Х, мг/100 мг сух. м-н	5,3 ± 0,45	9,5 ± 0,87*	7,6 ± 0,58* **
ФЛ, мг/100 мг сух. м-н	9,7 ± 0,71	11,7 ± 0,98	10,4 ± 1,04
Х/ФЛ	0,54 ± 0,05	0,80 ± 0,07*	0,72 ± 0,07*
Фракции ФЛ, %: ФХ,	38,2 ± 2,21	32,6 ± 2,28	37,2 ± 2,35
ФЭА,	26,1 ± 1,53	37,3 ± 2,46*	35,7 ± 2,44*
СМ,	12,3 ± 0,86	12,1 ± 0,79	13,2 ± 0,83
КЛ,	7,5 ± 0,51	6,5 ± 0,45	7,7 ± 0,48
ЛФХ	5,1 ± 0,32	11,4 ± 0,53*	5,5 ± 0,36**
Мембраны эндоплазматического ретикулума гепатоцитов			
«БВ» ХЛ, имп/с	87,8 ± 10,70	104,1 ± 17,20	55,5 ± 7,90* **
tu, с	42,8 ± 5,10	34,4 ± 2,90	85,4 ± 7,05* **
Жирные кислоты: С _{16:0} ,	22,0 ± 0,91	23,4 ± 1,02	21,5 ± 1,12
С _{18:0} ,	37,3 ± 1,65	37,8 ± 2,18	38,9 ± 0,72
С _{18:1} ,	8,0 ± 0,84	11,3 ± 0,52*	10,4 ± 0,78*
С _{20:4}	14,1 ± 0,54	9,3 ± 0,43*	10,8 ± 0,48* **
Цитозоль гепатоцитов			
Глютатион-S-трансфераза, ммоль/мин/мг белка	8,87 ± 1,62	12,38 ± 1,80	9,49 ± 0,65

Примечание. Здесь и в табл. 2: «БВ» ХЛ – быстрая вспышка хемилюминесценции, МДА – малоновый диальдегид, АОА – антиокислительная активность, ОЛ – общие липиды, Х – холестерол, ФЛ – фосфолипиды, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭА – фосфатидилэтанолламин, СМ – сфингомиелин, КЛ – кардиолипид, ЛФХ – лизофосфатидилхолин.

* - $P < 0,05$ в сравнении с контролем, ** - $P < 0,05$ – в сравнении с животными, получавшими этанол.

нол вызывает выраженные изменения этого показателя. Содержание холестерина повышается на 79,3%, а общих липидов и фосфолипидов имело тенденцию к росту на 15,9; и 20,6%, соответственно. Путем фракционирования общих фосфолипидов установлено, что их увеличение обусловлено преимущественно за счет фосфатидилэтанолламина (ФЭА) и лизофосфатидилхолина (ЛФХ) соответственно на 42,9 и 123,5. Соотношение холестерин/фосфолипиды при этом увеличивается на 48,2%.

Скорость реакций ПОЛ в мембранах эндоплазматической сети гепатоцитов также несколько активировалась. Содержание первичных продуктов ПОЛ и скорость нарастания вспышки хемилюминесценции под влиянием этанола увеличивались. При изучении жирнокислотного состава мембранных обнаружено увеличение содержания насыщенных и снижение ненасыщенных

жирных кислот, преимущественно арахидоновой (на 34%).

Назначение α -токоферола (в/мышечно, 50 мг/кг, 1 раз в день, 40 дней) животным, получившим этанол, оказывало нормализующее действие на изучаемые показатели. Содержание конечных продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов в сравнении с получившими этанол животными под влиянием витамина снизилось на 18,2%, в то время как АОА возростала на 97%. Увеличение содержания холестерина в мембранах эритроцитов у животных, получивших этанол + витамин Е, было менее выражено. Соотношение отдельных фракций фосфолипидов приближалось к интактным животным, хотя содержание фосфатидилэтанолламина и соотношение холестерол/фосфолипиды сохранялось на более высоком уровне, чем

у контрольных животных.

Благоприятные сдвиги вызвал α -токоферол и в мембранах эндоплазматического ретикулума гепатоцитов. Вызванное этанолом увеличение содержания первичных продуктов ПОЛ не только нормализовалось, но и снизилось ниже контрольных величин. Отмечается резкое (в 2,5 раза) преобладание антиоксидантных компонентов над веществами с прооксидантными свойствами (tu). Содержание ненасыщенных жирных кислот в мембранах микросом возрастало.

Таким образом назначение α -токоферола животным одновременно с этанолом позволило во многом ослабить гепатотоксический эффект этанола путем активации антиоксидантной системы организма и стабилизации структурной целостности мембранных образований эритроцитов и гепатоцитов.

Результаты исследования процессов ПОЛ у больных хроническим алкоголизмом, при наличии у них жирового гепатоза в стадии обратного развития, представлены в таблице 2. Как видно из данных таблицы, у больных жировым гепатозом традиционные методы исследования свидетельствуют об отсутствии нарушений со стороны печени, несмотря на сохраняющуюся у 7 больных гепатомегалию после проведенного в течение 6 месяцев лечения хронического алкоголизма. Однако практически у всех больных выявлена активация процессов ПОЛ, проявившаяся резким усилением свободнорадикальных процессов в плазме крови (увеличение на 482%) и снижением АОА на 63,5%. Более стабильными были показатели ПОЛ и АОА мембран эритроцитов. Липидограмма мембран эритроцитов характеризуется увеличением общих липидов и холестерина, а со стороны фосфолипидов отмечено увеличение содержания лизофосфатидилхолина, параллельно со снижением фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (Табл. 2).

Назначение витамина Е (в/мышечно, 1 мл 10% раствора 1 раз в день в течение 14 дней) приводило к заметной нормализации многих показателей. Так отмечено восстановление активности ГГТП, ЩФ, резкое снижение интенсивности процесса ПОЛ одновременно с увеличением АОА липидов плазмы и мембран эритроцитов. Показатели липидограммы, включая фракции фосфолипидов, полностью нормализовались

Таблица 2. Маркерные показатели структурно-функционального состояния печени, активность процессов ПОЛ и показатели липидограммы крови у здоровых людей и больных алкогольным жировым гепатозом.

Показатели	Здоровые люди	Больные алкогольным жировым гепатозом
Плазма крови		
ЩФ, ЕД/л сыворотки	88,4 ± 7,86	138,3 ± 5,24*
«БВ» ХЛ, имп/с	33,3 ± 2,80	193,9 ± 2,15*
АОА, %	74,2 ± 1,68	27,16 ± 2,04*
Мембраны эритроцитов		
«БВ» ХЛ, имп/с	114,5 ± 4,50	122,7 ± 5,58
АОА, %	54,4 ± 2,07	53,0 ± 1,25
Фракции ФЛ: ЛФХ	8,4 ± 0,27	13,1 ± 0,48

Примечание. * - P<0,05 в сравнении со здоровыми.

Таблица 3. Динамика показателей структурно-функционального состояния печени, активность процессов ПОЛ и показатели липидограммы крови больных алкогольным жировым гепатозом до и после лечения витамином Е.

Показатели	До лечения	После лечения витамином Е
Общий билирубин, Мкмоль/ ч.л. сыворотки	5,38	6,80*
АлАТ, моль/ ч.л. сыворотки	0,16	0,15
Тимоловая проба, ЕД	2,67	2,25
ГГТП, ЕД/л сыворотки	36,4	47,0*
АДГ, ЕД/л сыворотки	0,53	0,60
ЩФ, ЕД/л сыворотки	138,3	114,2*
«БВ» ХЛ, имп/с	193,9	49,6*
АОА, %	27,16	36,10*
«БВ» ХЛ, имп/с	122,7	115,3*
АОА, %	53,0	55,6*
МДА, нмоль/мг белка	41,86	38,56*
ОЛ, мг/100 мг сух. м-н	24,67	26,08
Х, мг/100 мг сух. м-н	3,79	3,74
ФЛ, мг/100 мг сух. м-н	5,25	5,26
Х/ФЛ	0,72	0,71
Фракции ФЛ: ФХ,	34,9	37,2
ФЭА,	20,2	21,1
СМ,	21,1	20,9
КЛ,	11,1	10,9
ЛФХ	13,1	9,88*

Примечание. * - P<0,05 в сравнении с больными до лечения. Статическая обработка произведена методом существенности разности для спаренных выборок [2]. Сух. м-н - сухих мембран.

(Табл. 3).

Таким образом, проведенные исследования позволили патогенетически обосновать использование витамина Е как на начальных стадиях алкогольного поражения печени при формировании жирового гепатоза (табл. 1), так и на стадии алкогольного поражения печени (табл. 3), когда процесс клинически не проявляется, но находится в актив-

ной фазе за счет сохранения свободно-радикальных процессов. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что при полном отказе от употребления алкоголя на стадии жирового гепатоза через 6 месяцев не происходит полного восстановления структурно-функциональной целостности клеточных мембран. Сохраняющийся при этом патологический процесс переходит из стадии жировой дистрофии в хронический, эволюцию которого предстоит изучить в последующем. Установлена последовательность вовлечения различных мембранных структур в процесс липопероксидации, вызванный алкоголем. Антирадикальный эффект витамина Е, проявившийся в торможении ПОЛ и активации АОА позволяет рекомендовать его использование при любых вариантах алкогольного поражения печени независимо от стадии и характера процесса в печени.

Выводы

1. Этанол (в желудок через зонд, 5,0 г/кг в виде 25% водного раствора, 1 раз в день, 40 дней) активизирует в печени и эритроцитах крыс процессы ПОЛ, повышает уровень холестерина и фосфолипидов.
2. У больных хроническим алкоголизмом выявлены нарушения процессов перекисного окисления липидов, сочетающиеся с дисбалансом структуры эритроцитарной мембраны на фоне гепатопатологии.
3. Витамин Е как в экспериментальных, так и в клинических условиях оказывает нормализующее действие.

Литература

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Гомедиздат, 1963. – 152 с.
2. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. – М.: Медицина, 1967. – С. 98-101.
3. Буко В.У., Сатановская В.И., Островский Ю.М. Жирнокислотный состав печени крыс с различной алкогольной мотивацией после острой и хронической интоксикации этанолом. // Докл. АН БССР. – 1986, № 2. – С. 1129-1132.
4. Владимиров Ю.А., Аргаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Медицина, 1972. – 252 с.
5. Владимиров Ю.А., Шаров А.П., Малюгин Э.Ф. О роли ионов железа в хемиллюминесценции липидов // Биофизика. – 1973. - № 1. – С. 148-152.
6. Кейтс М. Техника липидологии. – М., 1975. – 322 с.
7. Прохорова М.И., Тупикова З.Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. – Л., 1965. – 220 с.
8. Симованьян Э.М., Ахимова Е.К. Липидный состав мембран и сыворотки крови при менингококковой инфекции у детей // Вопр. мед. химии. – 1984, № 2. – С. 28-33.
9. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. – М., 1965. – 508 с.
10. Bolchoz L.J., Morrow J.D., Jollow D.J., McMillan D.C. Primaquine-induced hemolytic anemia: effect of 6-methoxy-8-

hydroxylaminoquinoline on rat erythrocyte sulfhydryl status, membrane lipids, cytoskeletal proteins and morphology // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2002. – Vol. 303, № 1. – P. 141-148.

11. Demeilliers C., Mousonneuve C., Grodet A., Mansouri A., Nguyen R., Tinel M., Letteron P., Deggott C., Feldmann G., Pessayre D., Fromenty B. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 123, № 4. – P. 1278-1290.
12. Folch J.B., Lees M., Stanley C. A simple methods for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, № 1. - P. 497-509.
13. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferases – the first euzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249, № 22. – P. 7130-7139
14. Henrion-Caude A., Flamant C., Roussey M., Housset C., Flahault A., Fryer A.A., Chadelat K., Strange R.C., Clement A. Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism // Hepatology. – 2002. – Vol. 36, № 4, pt 1. – P. 913-917.
15. Mottazan E., Stewart S.F., Rolla R., Vay D., Cipriani V., Moretti M., Vidali M., Sartori M., Rigamonti C., Day C. P., Albano E. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 32, № 1. – P.38-45.
16. Roig R., Cascon E., Arola L., Blade C., Salvado M.J. Procyanidins protect Fao cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – Vol. 1572, № 1. – P. 25-30.
17. Ruszkowski M. Nefelometryczna micrometoda okreslenia posiomia lipidow calcowitych w surowicy // Polsky tyg. Lek. – 1957. – Vol. 12, № 27. – S. 1038-1039.
18. Serafin A., Rosello-Catafau J., Prats N., Xaus C., Gelepi E., Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepetic ischemia-reperfusion injury in the rat // Am.J. Pathol. – 2002. – Vol. 161, № 2. – P. 587-601.
19. Shvedova A.A., Kisin E., Murray A., Goldsmith T., Reynolds J.S., Castranova V., Fraser D.G., Kommineni C. Metal working fluids: sub-chronic effects on pulmonary functions in B6C3F1 mice given vitamin E deficient and sufficient diets // Toxicology. – 2002. – Vol. 177, № 2-3. – P. 285-297.
20. Wu D., Cederbaum A.I. Cyclosporine A protects against arachidonic acid toxicity in rat hepatocytes: role of CYP2E1 and mitochondria // Hepatology. – 2002. – Vol. 35, № 6. – P. 1420-1430.
21. Yamanaka W.K., Clemans I.W., Hutchinson M.L. Essential fatty acids deficiency in humans // Progr. Lipid. Res. – 1981. – V. 19. – P. 187-215.

Resume

CORRECTION OF DISTURBANCES OF LIPID PEROXIDE OXIDATION PROCESS BY α -TOCOPHEROL IN ANUMALS AND HUMAN BEINGS WITH ALCOHOL HEPATIC DAMAGES

V.M. Tsyrukunov, M.I. Buhma, A.V. Vasilyev,

V.U. Buko, L.B. Zavodnik

Grodno State Medical University

Institute of Biochemistry NAS of Belarus, Grodno

The manifestations of oxidative stress induced by ethanol in rats and in patients suffering from chronic alcoholism (an increased activity of the lipids peroxidation processes in membranes of erythrocytes and hepatocytes) are significantly attenuated by vitamin E.