

УДК 577.151.121:616.092.9

ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Цейслер Ю.В.¹, Нурищенко Н.Е.¹, Мартынюк В.С.¹, Подпалова О.Н.², Шелюк О.В.¹

¹ УНЦ «Институт биологии» Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

² Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина
E-mail: yuliya.tseysler@gmail.com

Изучены показатели липидного обмена в крови крыс в условиях хронической 11-месячной алкоголизации. Показано, что начиная с двух месяцев потребления этанола, повышается содержание общих липидов (в плазме крови на 30%, в эритроцитарной массе на 65%). Для более длительных периодах алкоголизации (4-11 месяцев) уровень липидов сохранялся почти таким же, тогда как в эритроцитарной массе не отличается от контрольных значений. Содержание диеновых конъюгатов в плазме снижается, а количество кетонных производных жирнокислотных остатков липидов - увеличивается, что указывает на угнетение отдельных звеньев антиоксидантной системы, связанных с детоксикацией гидроперекисей жирных кислот, и активацию процессов свободнорадикального повреждения тканей. Достоверных изменений в содержании продуктов перекисного окисления в эритроцитарной массе ни на одном этапе алкоголизации выявлено не было.

Ключевые слова: этанол, липидный обмен, перекисное окисление липидов.

ВВЕДЕНИЕ

Алкоголизм является одной из первостепенных медико-социальных проблем современного общества. Одна сторона этой проблемы связана с тем, что алкоголизму присущи свойства наркотической зависимости, другая сторона проблемы заключается в многогранном патологическом воздействии алкогольной интоксикации на органы и системы организма человека, что исключает преодоление последствий длительного потребления алкоголя. Больные алкоголизмом умирают, как правило, не от алкогольной болезни, а от сопутствующих заболеваний и расстройств, которые развиваются в результате снижения иммунных возможностей защиты организма и его резистентности к раздражителям различной природы, и, как следствие, поражения жизненно важных органов и систем. Несмотря на то, что исследованиями влияния алкоголя на организм активно занимаются с 70-х годов прошлого века, многие аспекты этой проблемы остаются невыясненными, особенно паталогические изменения отдельных метаболических процессов, происходящих в условиях хронической пролонгированной алкогольной зависимости. Наглядным показателем патологического состояния организма является изменение уровня липидов в крови и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые часто оценивают по содержанию диеновых конъюгатов и кетонов [1], и, как показано в некоторых работах, при длительном употреблении алкоголя эти показатели могут

отклоняться от нормы [2-4]. В связи с этим целью исследования было изучение показателей липидного обмена крови хронически алкоголизированных крыс для оценки деструктивных нарушений в организме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах весом 150-200 г, получавших в течение всего эксперимента стандартный рацион, состоящий из стандартизированных кормов вивария. Алкоголизацию животных осуществляли по методике [5] в авторской модификации. Животных отбирали на основе их индивидуальной склонности к потреблению раствора этилового спирта, которая оценивалась в течение двух недель ежедневным измерением количества потребленного 5% -ного раствора алкоголя.

Экспериментальную группу составили крысы, которые, находясь в условиях свободного выбора, предпочитали раствор алкоголя с первого дня тестирования. Количество потребляемого спиртового раствора колебалось от 15 мл в сутки и выше на животное. После тестирования концентрацию этилового спирта для экспериментальных животных следующие две недели постепенно повышали от 5 до 36% с шагом в 10% и в дальнейшем не меняли. Хроническую алкоголизацию животных осуществляли в течение двух (n = 7), четырех (n = 8), шести (n = 7), восьми (n = 11) и одиннадцати (n = 12) месяцев.

Параллельно с каждой экспериментальной группой исследовали контрольную группу, в состав которой входили животные, которые демонстрировали полный отказ от потребления алкоголя и содержались в аналогичных условиях вивария в течение срока эксперимента. Декапитацию животных осуществляли в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными согласно протоколу № 36 заседания комиссии по биоэтике УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко от 19 августа 2013 г. в соответствующие сроки эксперимента (через 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев).

Определение концентрации липидов в плазме крови и эритроцитарной массе крыс осуществляли фотометрическим методом [6], суть которого заключается в экстракции липидов гексан-изопропанольной смесью с последующим их переводом в гексановую фазу и выпариванием гексана. Остающиеся в бюксе липиды окисляли 2% раствором хромовой смеси при инкубации на кипящей водяной бане. К охлажденным образцам добавляли дистиллированную воду, снова охлаждали и фотометрировали на КФК-2 при длине волны $\lambda = 590$ нм. Стандартный раствор липидов содержал 25 мг холестерина и 25 мг пальмитиновой кислоты в 50 мл гексана. Расчет концентрации липидов осуществляли по формуле:

$$C_{л} = (1 \text{ мг} \times D_{зр}) / (D_{ст} \times V), \text{ мг/мл},$$

где 1 мг - содержание липидов в 1 мл стандартного раствора; $D_{зр}$ - оптическая плотность исследуемого образца при $\lambda = 590$ нм (е.о.п.); $D_{ст}$ - оптическая плотность стандартного раствора при $\lambda = 590$ нм (е.о.п.); V - объем гексанового экстракта (мл).

Активность перекисного окисления липидов определяли по содержанию его молекулярных продуктов на основе метода Z. Placer [7] в авторской модификации. Для этого отбирали по 0,4 мл плазмы крови или эритроцитарной массы и добавляли

8 мл гексан-изопропанольной смеси (соотношение 1:1) при встряхивании с последующей инкубацией в течение 30 мин. После этого добавляли по 2 мл 0,1 N HCl при интенсивном встряхивании с последующей инкубацией в течение 2 часов. После разделения реакционной смеси на две фракции с верхней фракции брали по 1 мл гексанового экстракта липидов и регистрировали спектр поглощения на BioSpek-mini (Shimadzu Corporation, Япония) в диапазоне $\lambda = 200-400$ нм. По значениям оптической плотности при длине волны $\lambda = 233$ нм определяли уровень диеновых конъюгатов, а при $\lambda = 272$ нм - уровень кетоновых производных, которые выражали в условных единицах на 1 мг липидов в гексановом экстракте по формуле:

$$\text{ПОЛ} = E / (1 \text{ мл} \times C_{\text{л}}), \text{ у. е. / мг липидов,}$$

где E – экстинция гексанового экстракта при $\lambda = 233$ нм или $\lambda = 272$ нм, $C_{\text{л}}$ - концентрация липидов в гексановом экстракте (мг / мл).

Статистическую обработку экспериментальных результатов проводили по общепринятым алгоритмам вариационной статистики [8], достоверность разницы между статистическими выборками оценивали по t-критерию Стьюдента (разницу считали достоверной при $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях длительного употребления этанола происходят изменения общего содержания липидов и продуктов ПОЛ в плазме крови. В частности, у животных наблюдалось достоверное увеличение содержания липидов в плазме крови (рис. 1), которое почти не зависело от длительности приема животными этанола. У подопытных животных оно увеличивалось на 31,2%, 30,8%, 37,4%, 34,0% и 31% по сравнению с контролем после 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев алкоголизации соответственно.

Содержание общих липидов в мембранах эритроцитов достоверно повышалось на 64,9% только в течение первых двух месяцев алкоголизации, после чего этот показатель на фоне сезонных и возрастных изменений у животных достоверно не отличался от контрольных значений.

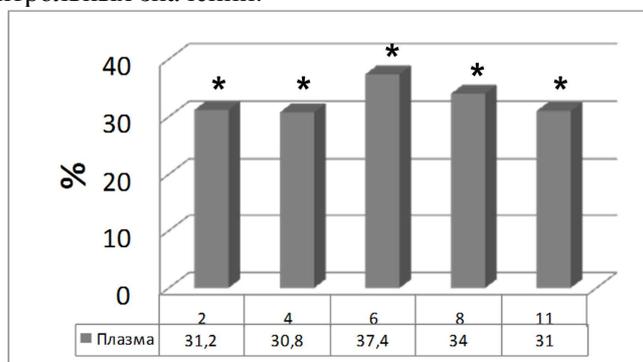


Рис. 1. Изменения содержания общих липидов в плазме крови крыс относительно контрольных значений (%) в условиях хронической алкоголизации в течение 2 (n=7), 4 (n=8), 6 (n=7), 8 (n=11) и 11 (n=12) месяцев.

*Примечание:** - достоверные изменения по сравнению с контрольной группой на уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты анализа продуктов ПОЛ в плазме крови свидетельствуют о разнонаправленном характере изменений диеновых конъюгатов и кетонных производных липидов. Так, содержание диеновых конъюгатов (ДК) почти линейно достоверно снижалось по мере алкоголизации на 7,9%, 18,8%, 22,0%, 20,6% и 19,6% относительно контроля после 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев алкоголизации соответственно ($p < 0,05$) (рис. 2). В мембранах эритроцитов достоверных различий в содержании ДК между контрольными и экспериментальными группами выявлено не было. В отличие от ДК определения содержания кетонов в плазме крови показало их увеличение на 12,5%, 28%, 40%, 15% и 9% по сравнению с контролем после 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев употребления этанола ($p < 0,05$) (рис. 3).

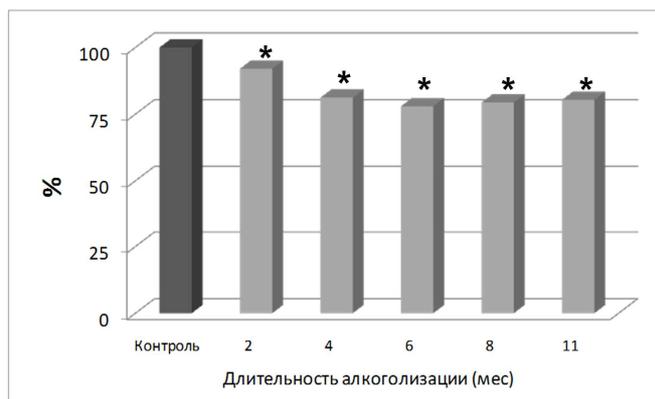


Рис. 2. Содержание диеновых конъюгатов в плазме крови крыс (%) в условиях хронической алкоголизации в течение 2 (n = 7), 4 (n = 8), 6 (n = 7), 8 (n = 11) и 11 (n = 12) месяцев относительно контроля.

Примечание: см. рис.1.

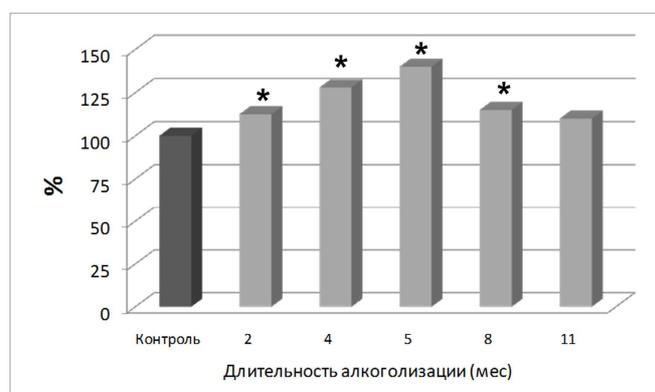


Рис. 3. Содержание кетонов в плазме крови крыс (%) в условиях хронической алкоголизации в течение 2 (n = 7), 4 (n = 8), 6 (n = 7), 8 (n = 11) и 11 (n = 12) месяцев относительно контроля.

Примечание: см. рис.1.

Что касается данного показателю в мембранах эритроцитов, то по сравнению с контролем достоверных изменений в содержании кетоновых производных обнаружено не было.

Стоит обратить внимание на то, что в оптических спектрах гексанового экстракта контрольных образцов плазмы крови, кроме максимума поглощения альдегидных и кетоновых производных $\lambda_{\text{max}} = 272$ нм, всегда наблюдался небольшой максимум при $\lambda_{\text{max}} = 375-380$ нм, однако в образцах, полученных от крыс, которые употребляли этанол, поглощение практически исчезало (рис. 4). Учитывая неполярную природу гексана, который использовался в качестве липид-экстрагирующего вещества, наиболее вероятно, что поглощение света в этой области связано с присутствием в плазме крови жирорастворимого витамина А2. Такое предположение основывается на том, что в спиртовых растворах он имеет максимум поглощения при 354 нм [9], но с увеличением неполярности растворителя максимум поглощения витаминов группы А сильно сдвигается в длинноволновую область [10]. Другие липиды и жирорастворимые витамины и гормоны не поглощают в этой области. Известно, что витамины группы А проявляют антиоксидантные свойства [11], поэтому снижение его содержания в крови у крыс, хронически употреблявших алкоголь, может дополнительно свидетельствовать о системном угнетении активности антиоксидантной системы организма. С другой стороны падения уровня витамина А в крови скорее всего связано с повреждением гепатоцитов печени, в которых в условиях нормы происходит образование витамина А путем окислительного расщепления каротинов, поступающих в организм с пищей.

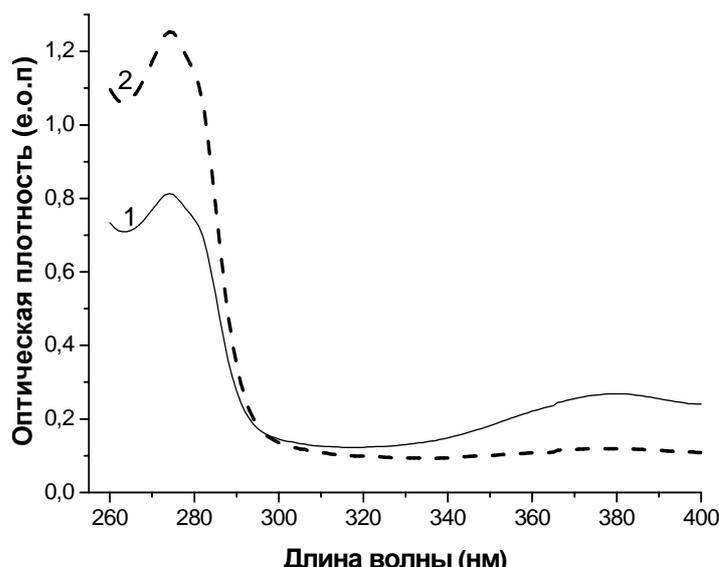


Рис. 4. Типичные спектры поглощения гексанового экстракта плазмы крови крыс в ближнем ультрафиолетовом диапазоне.

Примечания: 1 - контроль, 2 - употребление этанола в течение 8 месяцев. Диапазон поглощения кетоновых и альдегидных групп - 273-280 нм, максимум поглощения 377-380 нм, гипотетически соответствует витамина А.

Повышение содержания общих липидов в плазме крови алкоголизованных животных свидетельствует о достоверных изменениях липидного обмена в организме вследствие активации обмена жиров и/или замедления их катаболизма. Практически одинаковое увеличение содержания липидов в плазме крови животных с разной продолжительностью алкоголизации приблизительно на 30% может быть объяснено тем, что организм не может адаптироваться и откорректировать процессы липидного обмена даже при длительном употреблении этанола. С другой стороны, фазное повышение содержания общих липидов в эритроцитарных мембранах животных после их двухмесячной алкоголизации вероятно может свидетельствовать об определенной неспецифической адаптационной реакции системы крови животных к этанолу, дальнейшее развитие которой приводит к частичной нормализации структурно-функционального состояния эритроцитарных мембран.

Противоположная направленность изменений содержания ДК и кетоновых производных липидов в плазме крови в условиях пролонгированной алкоголизации, на наш взгляд, свидетельствует о том, что в тканях, в зависимости от длительности употребления этанола, подавляется активность отдельных глутатион-зависимых звеньев антиоксидантной системы. Такое подавление приводит к активации процессов ПОЛ и ускорению деградации первичных продуктов перекисного окисления - ДК, в свою очередь способствует накоплению более окисленных продуктов - кетонов и альдегидов. Известно [12], что повышенное содержание в плазме кетоновых производных липидов характерно для многих патологических состояний - острое и хроническое воспаление, различные виды интоксикации, сахарный диабет, голодание, тяжелая физическая нагрузка и др. Получается, что выявленный в наших исследованиях факт повышения уровня кетонов на фоне снижения содержания ДК может свидетельствовать о постепенном снижении работы антиоксидантной системы и усилении свободнорадикального окисления липидов в условиях пролонгированной алкоголизации крыс. Общеизвестно [13], что повышение проницаемости мембран нервных волокон и саркоплазматического ретикула миоцитов под влиянием ПОЛ тормозит передачу двигательных нервных импульсов и тем самым снижает сократительные возможности мышц. Одновременно с этим свободно радикальное повреждение митохондриальных мембран снижает эффективность окислительного фосфорилирования, что ведет к уменьшению энергетического энергообеспечения мышечной ткани. Повышение проницаемости оболочки мышечных клеток может привести к потере мышечными клетками многих важных метаболитов и ферментов, в частности креатинкиназы, что показано в более ранних работах [14]. Таким образом, в масштабе всего организма активация ПОЛ сказывается на возможностях аэробного энергообеспечения, на сократительной способности мышц и, следовательно, на работоспособности организма в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что у крыс в условиях пролонгированной 11-месячной алкоголизации происходит активация свободнорадикального окисления липидов и снижение активности отдельных звеньев антиоксидантной системы. Одновременно с этим угнетение

антиоксидантной системы приводит к образованию более окисленных продуктов ПОЛ. Устойчивые системные нарушения обмена липидов, которые проявляются в виде повышенного содержания общих липидов и активации их свободно радикального окисления, развиваются относительно быстро, а затем сохраняются и усиливаются в течение всего периода употребления алкоголя. Такие изменения могут объяснить комплекс сложных и многосторонних системных нарушений на уровне функционирования отдельно взятых систем организма и их регуляции в условиях хронического влияния алкоголя.

Исследование проведено при поддержке Гранта Президента Украины для одаренной молодежи 2014 г.

Список литературы

1. Медицинские лабораторные технологии. Справочник; [Под ред. А.И. Карпищенко]. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 600 с.
2. Говорил А.В. Изменения сывороточных липидов при алкогольном поражении сердца / А.В. Говорил, А.И. Герасимович, А.П. Филев // Алкогольная болезнь. – М.: - 1997. - № 9. – С. 112-115.
3. Crabb D.W. Alcohol and lipid metabolism / D.W. Crabb, S. Liangpunsakul // Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2006. – Vol. 21. – P. S56–S60.
4. Lussier-Cacan S. Impact of alcohol intake on measures of lipid metabolism depends on context defined by gender, body mass index, cigarette smoking, and apolipoprotein E genotype / S. Lussier-Cacan, A. Bolduc, M. Xhignesse, T. Niyonsega, C.F. Sing // ArteriosclerThrombVasc Biol. – 2002. – Vol. 22. - P. 824-831.
5. Бардина Л.Р. Метаболическая адаптация к алкоголю у крыс, различающихся по предпочтению этанола воде / Л.Р. Бардина, В.И. Сатановская // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Том 45, № 2. – С. 117–122.
6. Биохимические методы исследования в клинике; [Под ред. Покровского А.А.] – М.: Медицина, 1969. – С. 287-288.
7. Placer Z. Lipoperoxidationssysteme im biologischen / Material 2. Mitt. Bestimmung der Lipoperoxidation im Säugetierorganismus. Food // Nahrung. - 1968. - Vol. 12. - P. 679-684.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. - М.: Практика, 1998. - 459 с.
9. Beate R. Vitamin A Bound to Cellular Retinol-binding Protein as Ultraviolet Filter in the Eye Lens of the Gecko *Lygodactylus picturatus* / R. Beate, A. Reinout, W. De Jong Wilfiend // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271 – P. 10437-10440.
10. Мокшина Н.Я. Фотометрическое определение витамина А и провитамина А при совместном присутствии / Н.Я. Мокшина, В.Ю. Хохлов, Ю.В. Шляхина, В.Ф. Селеменов // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2003. – вып. 2. – С. 53-55.
11. Maxwell Simon R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies / Simon R.J. Maxwell // Drugs. – 1995. – Vol. 49(3). – P. 345-361.
12. Campbell M.K. Biochemistry / M.K. Campbell, S.O. Farrell. - 5th. - Cengage Learning, 2006. — P. 579.
13. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах : сборник / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев, А.В. Козлов. - ВИНТИ. Итоги науки и техники. Сер.: Биофизика. - М., 1991. - № 29. - 249 с.
14. Цейслер Ю.В. АТРазна активність актоміозину скелетних м'язів та маркери ушкодження тканин у крові щурів в умовах тривалої хронічної алкоголізації / Ю.В. Цейслер, О.М. Подпалова, Н.є. Нурищенко, В.С. Мартинюк // Український біохімічний журнал. – 2014. - Т. 86, № 5.- С. 56-64.

THE INDICATORS OF LIPID METABOLISM IN RATS UNDER CHRONIC PROLONGED ALCOHOL ABUSE

Yu. V. Tseyslyer¹, N.E. Nurishchenko¹, V.S. Martyniuk¹, O.M. Podpalova²,

O.V. Shelyuk¹

¹ ESC «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kiev, Ukraine

² Bogomolets National medical university, Kiev, Ukraine

E-mail: yuliya.tseysler@gmail.com

Purpose. Alcoholism is one of the primary medical and social problems of modern civilization. Patients die due to not alcohol directly but from related diseases and disorders that develop as a result of destruction of immune capacity and resistance of the organism to stimuli of different nature, as well as injury to vital organs and systems. The level of blood lipids and lipid peroxidation products is adequate indicator of the pathological state of the organism. So, assessment of destructive disorders in the organism based on indices of blood lipid metabolism in rats, chronically alcoholized, was the purpose of the study.

Methods. Not-breed white male rats weighing 150-200 g were used in this experiment. The animals were selected on the basis of their individual propensity to consume ethanol solution, which was estimated in two weeks daily by measuring the amount of consumed a 5% solution of alcohol. The experimental group consisted of rats that prefer alcohol solution from the first day of testing. After testing the concentration of ethyl alcohol in experimental animals following two weeks gradually increased from 5 to 36% in increments of 10% and did not change in the future. Chronic alcoholism animals was performed for two, four and six, eight and eleven months. In the control group were animals that showed a complete rejection of alcohol consumption. The assesment of the concentration of lipids in the blood plasma and red blood cells of rats was carried out by the photometric method. The level of lipid peroxidation was revealed using spectrophotometric method proposed by Z. Placer in the our modification.

Results. The level of total lipid was increased after two months of alcohol consumption (in blood plasma by 30% and in erythrocyte mass by 65%). For longer periods of alcoholization (4-11 months) the lipid levels remained almost the same, whereas in erythrocyte mass does not differ from control values. The level of diene conjugates in the blood plasma was reduced and the amount of ketone derivatives of fatty acid residues was increases that indicates on inhibition of the some components of the antioxidant system that control detoxification of hydroperoxides of fatty acids and also on activation of free radical damage of tissues. There were no significant changes of lipid peroxidation level in erythrocyte mass during any stage of alcoholization.

Conclusions: Activation of free radical oxidation of lipids and decreased of activity of individual links of the antioxidant system occurs in rats with long-term 11-month alcohol abuse. Sustained systemic lipid metabolism disturbances, which manifest themselves as increased total lipid content and activation of their free radical damage develop relatively quickly and then this changes are stored throughout the period of drinking.

Keywords: ethanol, lipid metabolism, lipid peroxidation.

References

1. Medical laboratory technology. B.R. / Ed. A.I. Karpishchenko., **2**, 600 p. (St. Petersburg: Intermedika, 2002).
2. Govoril A.V., Gerasimov A.I., Filev A.P. Changes in serum lipids in alcoholic heart lesion, *Alcoholic disease*, **9**, 112-115 (1997).
3. Crabb D.W., Liangpunsakul S. Alcohol and lipid metabolism, *J Gastroenterol Hepatol*, **21**, S56-S60 (2006).
4. Lussier-Cacan S., Bolduc A., Xhignesse M., Niyonsega T., Sing C.F. Impact of alcohol intake on measures of lipid metabolism depends on context defined by gender, body mass index, cigarette smoking, and apolipoprotein E genotype, *ArteriosclerThrombVasc Biol*, **22**, 824-831 (2002).
5. Bardina L.R., Satanov'ska V.I. Metabolic adaptation to alcohol in rats that differ in ethanol preference water, *Problems of Medical Chemistry*, **45**, 117-122 (1999).
6. Biochemical research methods in clinic / Ed. Pokrovsky A.A., P. 287-288 (Meditsina, 1969).
7. Placer Z. Lipoperoxidationssysteme im biologischen / Material 2. Mitt. Bestimmung der Lipoperoxidationim Säugetierorganismus. *Food*, **12**, 679-684. (Nahrung, 1968).
8. Glantz S. *Biomedical Statistics*, 459 p (Praktika, 1998).
9. Beate R., Reinout A., De Jong Wilfiend W. Vitamin A Bound to Cellular Retinol-binding Protein as Ultraviolet Filter in the Eye Lens of the Gecko *Lygodactylus picturatus*, *J Biol Chem*, **271**, (18): 10437-40 (1996).
10. Mokshina N.Ya., Khokhlov V.Yu., Shlyakhina Yu.V., Selemenev V.F. Photometric determination of vitamin A and provitamin A co-presence, *Bulletin VGU. Series «Chemistry. Biology. Pharmacy»*, **2**, 53-55 (2003).
11. Maxwell Simon R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies, *Drugs*, **49(3)**, 345-361 (1996).
12. Campbell M.K., Farrell S.O. *Biochemistry*. - 5th, 579 p (Cengage Learning, 2006).
13. Vladimirov Y.A., Azizov O.A., Deev A.I., Kozlov A.V. *Free radicals in living systems: collection*, 249 p (VINITI. Results of science and technology. Series: Biophysics, 1991).
14. Tseyslyer Yu.V., Podpalova O.M., Nurishchenko N.E., Martyniuk V.S. Actomyosin ATPase activity of skeletal muscles and the markers of tissue damage in the blood of rats under prolonged chronic alcoholization, *Ukr. Biochem. J.*, **86**, N 5, 56-64 (2014).

Поступила в редакцию 21.10.2014 г.