

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ ВЕДУЩЕЕ ВЫСШЕЕ УЧЕБНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

УДК 577.1 (616.36:61.5.372-092.9)

**АМБРУШКЕВИЧ
Юрий Георгиевич**

**ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ ЭТАНОЛА:
РОЛЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ**

14.00.20 – токсикология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Минск 2003

Работа выполнена в ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Республики Беларусь и ГУ «Институт биохимии» НАН Беларуси

Научные руководители: доктор медицинских наук, заведующий кафедрой фармакологии ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет», профессор **Бушма М.И.**

доктор биологических наук, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет», профессор **Зиматкин С.М.**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, заведующий кафедрой химии УО «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова», профессор **Чиркин А.А.**

кандидат медицинских наук, заведующая отделом токсикологии ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» **Котеленец А.И.**

Оппонирующая организация: Национальный научный центр наркологии МЗ РФ, г. Москва

Защита состоится 30 октября в 14.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д.03.18.06. в ГВВУУ «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, проспект Дзержинского, 83, тел. (8-017)- 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГВВУУ «Белорусский государственный медицинский университет»

Автореферат разослан «___» сентября 2003 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
кандидат медицинских наук, доцент

В.И. Дорошевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. В структуре заболеваемости и смертности населения Республики Беларусь хронический алкоголизм занимает значительное место. Поскольку число больных алкоголизмом в последние годы неуклонно возрастает, вклад этой патологии будет повышаться (Козловский А.В. и соавт., 2000). Считают, что причиной смерти около 66% больных, злоупотребляющих алкоголем не менее 8 лет, является печеночная недостаточность (Угрюмов А.И., 1990). Печень является основным барьером на пути поступления этанола в организм. Поэтому у части людей, злоупотребляющих алкоголем, поражение этого органа протекает тяжело и часто приводит к смерти. Доказано, что потребление алкоголя населением коррелирует с уровнем смертности от цирроза печени (Траянова Т.Г. и соавт., 1990). Злоупотребление алкоголем наносит значительный ущерб обществу: потеря квалификации, травмы и аварии, убийства и самоубийства, временная потеря трудоспособности, рост соматической патологии и др. В этой связи медико-биологические исследования алкоголизма сегодня являются актуальными во всех развитых странах мира.

Одной из важных задач современной фундаментальной токсикологической науки является выяснение биохимических механизмов, ответственных за предрасположенность животных и человека к алкогольному поражению печени. Однако, до настоящего времени не выяснено с чем связана явно выраженная предрасположенность людей к гепатотоксическому действию этанола, в сравнении с другими, в такой же степени злоупотребляющими этанолом, людьми; почему в популяции животных, находящихся в одинаковых условиях содержания и действия этанола, регистрируются большие межиндивидуальные различия в характере и степени выраженности алкогольных поражений печени?

Широко используемое в настоящее время исследование биохимических изменений в печени в процессе алкогольной интоксикации животных является скорее следствием развившейся патологии печени, а не причиной гепатотоксичности этанола. Измерение в плазме крови людей, злоупотребляющих алкоголем, активности маркерных ферментов (аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ) и др.) с целью прогнозирования вероятности развития или усиления в последующем гепатотоксичности этанола также не обосновано. Эти показатели не являются органоспецифичными, не коррелируют с характером и степенью тяжести алкогольного поражения печени. Кроме того, их невозможно использовать для прогнозирования возможных алкогольных поражений печени у здоровых людей без признаков поражения органа.

В связи с этим изучение взаимосвязей между индивидуальными особенностями протекания биохимических процессов в печени здоровых

крыс и характером, степенью тяжести последующего алкогольного поражения печени является весьма актуальным.

Связь работы с крупными научными программами. Работа выполнена в рамках проекта № Б96-335 «Биохимические механизмы индивидуальной чувствительности к гепатотоксинам», финансируемого Белорусским республиканским Фондом фундаментальных исследований при СМ РБ (номер государственной регистрации 19972364, Постановление Совета Фонда от 17.02.1997 г.).

Цель и задачи исследования: Установить возможную роль процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты печени в предрасположенности крыс к гепатотоксичности этанола.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Изучить межиндивидуальную вариабельность интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени крыс до и после хронической интоксикации этанолом.

2. Исследовать индивидуальные особенности компонентов антиоксидантной защиты в печени крыс до и после хронической интоксикации этанолом.

3. Изучить межиндивидуальную вариабельность характера и степени поражения печени этанолом (морфологические – печень и биохимические – кровь исследования).

4. Используя методы математического моделирования выявить взаимосвязь между исходными индивидуальными особенностями протекания процессов ПОЛ, состоянием системы антиоксидантной защиты в печени и характером, степенью тяжести последующего поражения печени этанолом.

Объект и предмет исследования. В качестве объекта исследования служили печень и сыворотка крови крыс. Предметом исследования явились причины предрасположенности к алкогольному поражению печени.

Гипотеза. Предрасположенность к алкогольному поражению печени генетически предопределена и, вероятно, зависит от индивидуальных особенностей протекания реакций перекисного окисления липидов и состояния системы антиоксидантной защиты в печени до воздействия этанолом.

Методология и методы проведенного исследования. В работе использованы токсикологические, морфологические и биохимические методы исследования; методы математического моделирования.

Научная новизна и значимость полученных результатов. В результате проведенного исследования впервые установлены биохимические

факторы (маркёры) предрасположенности к алкогольному поражению печени. Показано, что крысы с исходно более высоким уровнем в печени малонового диальдегида (МДА), более активными системами его образования (аскорбат- и NADPH-зависимые пути), повышенной интенсивностью «быстрой вспышки» хемилюминесценции («БВ»ХЛ) предрасположены к алкогольному поражению печени. Кроме того, предрасполагающими факторами являются энзимопатия супероксиддисмутазы (СОД) и глутатион-S-трансфераз (GST), а также низкое содержание в печени таких антиоксидантов, как восстановленный глутатион (GSH) и ретинолы. Таким образом, предрасположенность (чувствительность) здоровых животных к этанол-индуцируемому окислительному стрессу является важным условием последующей реализации алкогольного поражения печени.

Практическая (экономическая, социальная) значимость полученных результатов.

1. Установленная природа биохимических факторов, ответственных за индивидуальную чувствительность к алкогольному поражению печени, позволяет предсказать вероятность возникновения и степень выраженности вызываемого им поражения печени, проводить целенаправленный поиск средств и способов предупреждения и своевременной коррекции его неблагоприятного действия на орган.

2. С целью предотвращения возможного развития алкогольного поражения печени (особенно у лиц, злоупотребляющих этанолом) рекомендуется потребление пищевых продуктов с высоким содержанием антиоксидантов, особенно ретинола (печень) и глутатиона (печень, мозг), а также избегать продуктов, содержащих перекиси (например, жиры после длительного хранения или многократной температурной обработки).

3. В связи с тем, что врожденные особенности метаболизма в интактной печени (повышенная активность системы ПОЛ и сниженный защитный антиоксидантный потенциал) могут передаваться по наследству, к группе риска развития алкогольного поражения печени можно отнести людей, близкие родственники которых страдали данной патологией. Эти люди, особенно злоупотребляющие этанолом, должны быть взяты на диспансерный учет.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Интенсивность процессов ПОЛ, содержание и активность компонентов антиоксидантной системы в печени крыс подвержены существенной межиндивидуальной вариабельности, что играет решающую роль в реализации гепатотоксического действия этанола.

2. Установлены значительные межиндивидуальные различия в характере и степени выраженности алкогольного поражения печени, что связано с различной чувствительностью органа к алкоголю.

3. Крысы с исходно более интенсивными процессами ПОЛ (повышенный уровень МДА, более активные системы его образования в аскорбат- и NADPH-зависимых путях; высокая интенсивность «БВ»ХЛ) и низким антиоксидантным потенциалом (энзимопатии СОД и GST; низкий уровень в печени GSH и ретинолов) предрасположены к алкогольному поражению печени.

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в выполнении исследований по всем разделам диссертации, включая выдвижение идеи, освоение методических подходов, организацию и проведение экспериментальных исследований, математическое моделирование, аналитический обзор литературы, обобщение и анализ результатов исследований. Экспериментальная часть выполнена соискателем на базе ЦНИЛа Гродненского государственного медицинского университета и Института биохимии НАНБ (совместно с к.б.н. Легоньковой Л.Ф.). Научные руководители оказывали консультативную помощь в разработке моделей, при постановке целей и задач исследования, обсуждении и трактовке полученных результатов.

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований, включенные в диссертацию, докладывались на: 1-ом съезде Белорусского общества физиологов (Минск, 2001); конгрессе Европейского общества по биомедицинским исследованиям алкоголизма (Франция, Париж, 2001); 6-ом конгрессе Международного общества по изучению ксенобиотиков (Германия, Мюнхен, 2001); 48-ом Международном симпозиуме «Лекарственный метаболизм: регуляция и значение» (Дания, Копенгаген, 2001); 5-ом Международном симпозиуме гепатологов Беларуси (Беларусь, Гродно, 2002); 1-ой Российско-Белорусской конференции по медицинским и социально-психологическим проблемам алкогольной и наркотической зависимости (Беларусь, Витебск, 2002); конференции, посвященной 45-летию кафедры нормальной анатомии ГГМУ.

Опубликованность результатов. Результаты диссертации отражены в 18 публикациях (4 статьи в научных журналах, 2 статьи в рецензируемых сборниках трудов, 12 тезисов докладов и выступлений на международных, республиканских конференциях, съездах, симпозиумах и конгрессах. Общее количество страниц опубликованных материалов – 50.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из общей характеристики работы, аналитического обзора литературы по теме,

описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения (7 глав), заключения и списка литературы, включающего 161 источник. Работа изложена на 56 страницах машинописного текста (исключая: иллюстрации, таблицы и список использованных источников).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Обзор литературы представлен анализом научных публикаций, посвященных проблеме токсического воздействия алкоголя на печень. Проведенный анализ показал, что в настоящее время достаточно хорошо изучены механизмы развития алкогольного поражения печени, роль ферментных систем метаболизма этанола и ацетальдегида в гепатотоксичности этанола. Однако, причины явно выраженной предрасположенности к возникновению алкогольного поражения печени одних людей и относительная устойчивость других, до настоящего времени не установлены.

Объекты и методы исследования. Исследования проведены на 120 нелинейных белых крысах-самцах с исходной массой 250-300 г. Животных разделили на 3 группы:

1-я группа (№№ 9-56; 65-112). Крыс наркотизировали диэтиловым эфиром и подвергали частичной гепатэктомии по *Higgins G. M., et al.* (1931). Изъятые доли печени разделяли на 3 части. Первую (небольшую) часть фиксировали в формалине для последующего морфологического изучения. Вторая (больше первой) часть служила для определения содержания восстановленного глутатиона, каротинов, витаминов Е, А и убихинона. Из третьей (основной) части печени получали гомогенат в гомогенизаторе типа Поттера-Эльвегейма с тефлоновым пестиком. Из гомогената выделяли микросомальную и цитозольную фракции дифференциальным центрифугированием постмитохондриального супернатанта на центрифуге VAC-602 (ГДР, Janetzki) (*Sato C. et al.*, 1981). В полученных субклеточных фракциях гепатоцитов определяли содержание диеновых конъюгатов и кетотриеновых кетонов, МДА; интенсивность «БВ»ХЛ; активность каталазы и GST, глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), СОД; антиокислительную активность (АОА).

Результаты исследования вышеприведенных показателей заносили в «биохимический паспорт» каждого животного.

Через 2 месяца после операции частичной гепатэктомии (период регенерации печени) начинали вводить этанол (через зонд, в желудок, 5 г/кг в виде 30% водного раствора, 1 раз в день, 57 дней). После декапитации животных в печени повторно изучали вышеуказанные показатели, а также

оценивали характер и степень выраженности алкогольной гепатопатии. С этой целью в кусочках печени визуально оценивали выраженность основных микроскопических признаков алкогольного поражения печени: алкогольный гепатит (воспалительная инфильтрация, очаговая и диффузная лейкоцитарная и гистиоцитарная инфильтрация); гепатоз (вакуольная дистрофия гепатоцитов, деструкция и гибель гепатоцитов - глубокие дистрофические изменения цитоплазмы, повреждение ядра). По окрашенным на липиды гистохимическим препаратам, оценивали степень жировой инфильтрации паренхимы печени (жировая дистрофия гепатоцитов, количество и размеры жировых включений в их цитоплазму). Выраженность признаков поражения печени оценивали в баллах: 0,5 - очень слабая выраженность признака; 1 - слабая выраженность; 2 - средняя выраженность; 3 - сильная выраженность; 4 - очень сильная выраженность признака. Дополнительно в сыворотке крови исследовали активность печеночных маркерных ферментов (АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы (ЩФ), γ -глутамилтрансферазы (ГГТФ)) для косвенной оценки степени повреждения печени этанолом.

2-я группа (№№ 1-8; 113-120). Крыс подвергали частичной гепатэктомии. Печень исследовали аналогично животным 1-ой группы. Через 2 месяца крысам начинали вводить воду в объеме, равном объему этанола 1-ой группы животных (через зонд, в желудок, 1 раз в день, 57 дней). После декапитации печень этих животных служила контролем для оценки характера и степени выраженности алкогольной гепатопатии у животных 1-ой группы.

3-я группа (№№ 57-64). Операцию частичной гепатэктомии и биохимические исследования в печени этих животных не проводили. Крысам вводили этанол как указано выше. Животные этой группы были необходимы для сравнения характера и степени реакции гепатэктомизированной (1-ая группа) и интактной (3-я группа) печени крыс на длительное введение этанола.

Математическое моделирование. Для выявления степени достоверности различий изучаемых показателей в печени и плазме крови крыс до и после интоксикации этанолом между животными-обладателями минимальных и максимальных значений показателей был использован t-критерий Стьюдента для независимых выборок (Вальвачев Н.И., Римжа М.И., 1989). Для нахождения взаимосвязей между биохимическими показателями в печени животных до воздействия этанолом и характером, степенью последующего алкогольного поражения печени у этих животных, использовали методы корреляционного, пошагового многофакторного регрессионного, дисперсионного и канонического анализов (Афифи А., Эйзен С., 1982., Урбах В.Ю., 1975).

Корреляционный анализ. Позволяет судить о наличии корреляционных связей, степени взаимосвязи, достоверности линейной связи. О степени взаимосвязи показателей судили по величине коэффициента корреляции. Слабые корреляционные связи ($r < 0.4$) не принимали во внимание. Сильные корреляционные связи ($r > 0.6$) свидетельствуют о наличии зависимости линейного типа. Небольшая величина коэффициента ($0.4 < r < 0.6$) свидетельствует о наличии более сложных зависимостей нелинейного типа. Знак коэффициента корреляции указывает на прямую (“+”) или обратную (“-“) взаимосвязь.

Пошаговый многофакторный регрессионный анализ. Данные регрессионного анализа более тонко описывают взаимосвязь между изучаемыми показателями и дают возможность количественного оценивания изучаемого параметра. Результатом пошагового многофакторного регрессионного анализа явился набор наиболее информативных биохимических показателей в печени крыс до алкогольной интоксикации, являющихся биомаркерами предрасположенности к алкогольному поражению печени.

Дисперсионный анализ. Для оценки качества прогностических моделей требовалось исследовать уравнения регрессии методом дисперсионного анализа.

Канонический анализ. Каноническая корреляция используется для изучения связей между двумя различными множествами переменных. Коэффициент этой корреляции является мерой зависимости групп показателей.

Статистическую обработку полученного в опытах материала, оценивание параметров распределения по эмпирическим данным, их графическое представление проводили с помощью пакета прикладных программ для биомедицинских исследований на персональном компьютере PC Pentium.

Результаты исследований и их обсуждение.

Общая характеристика течения алкогольной интоксикации. Длительное внутрижелудочное введение воды частично гепатэктомированным крысам сопровождалось незначительным увеличением массы тела, что, по-видимому, связано с тем, что опыты проводились на старых (медленно растущих животных), а также наполнением желудка водой, что приводило к снижению потребления корма. Получавшие этанол крысы не прибывали в массе, что можно объяснить снотворным действием этанола, поражением ЖКТ с нарушением процессов пищеварения и усвоения компонентов кормов.

В процессе интоксикации этанолом часть животных погибла: по техническим причинам (аспирация этанола и асфиксия) и от пневмоний и желудочных кровотечений. В развитии пневмоний, по-видимому, играет фактор переохлаждения (расширение сосудов и усиление теплоотдачи, особенно в период этанолиндукцируемого сна). Кроме того, оно может быть связано с известным иммунодепрессивным действием этанола. Развитие язв ЖКТ, скорее всего, явилось следствием прямого повреждения этанолом слизистой оболочки ЖКТ.

После введения этанола развивалось угнетение животных, переходящее в сон как следствие угнетения им ЦНС. По этому показателю выявлена выраженная вариабельность: у части животных сон не развился; у части крыс выявлено его выраженное снотворное действие («коротко-» и «долгоспящие» животные), что согласуется с литературными данными (Chumakova O.V., Liopo A.V., 1996).

Межиндивидуальная вариабельность показателей, характеризующих интенсивность процессов ПОЛ в печени крыс до и после хронической алкогольной интоксикации. Изучение показателей, характеризующих интенсивность процессов ПОЛ в печени крыс до и после хронической алкогольной интоксикации, выявило значительную межиндивидуальную вариабельность, что свидетельствует о существенных различиях между животными. В порядке возрастания вариабельности эти показатели у интактных животных располагаются в следующем ряду: диеновые конъюгаты (2,3)* < NADPH-зависимое ПОЛ (3,0) < кетотриеновые кетоны (3,3) < МДА = аскорбатзависимое ПОЛ (4,0) < «БВ»ХЛ (8,7).

После введения этанола изучаемые показатели по признаку их вариабельности расположились в следующем возрастающем ряду: NADPH-зависимое ПОЛ (2,8) < МДА (2,9) < аскорбатзависимое ПОЛ (3,0) < диеновые конъюгаты (5,0) < «БВ»ХЛ (24,0).

Выявленная межиндивидуальная вариабельность показателей, характеризующих состояние систем ПОЛ в печени крыс до воздействия этанолом, является одним из проявлений «биохимической индивидуальности» животных. Как будет показано в последующем, она внесет существенный вклад в развитие феномена вариабельности характера и степени поражения печени этанолом.

Межиндивидуальная вариабельность показателей, характеризующих эффективность системы антиоксидантной защиты в печени крыс до и после хронической алкогольной интоксикации. Изучение показателей, характеризующих эффективность системы антиоксидантной защиты в печени крыс до и после хронической алкогольной интоксикации, выявило значительную межиндивидуальную вариабельность. В порядке возрастания вариабельности показатели у интактных животных располагаются в следующем ряду: каталаза (2,6)* < ГР (2,9) < ретинолы (5,1) < СОД = GST (5,3) < цитозольная ХДНБ-GST (10,2) < ГП (10,3) < микросомальная ХДНБ-GST (11,0) < цитозольная БСЛ-GST (11,7) < АОА (13,3) < каротины (14,5) < токоферолы (52,1).

После введения этанола изучаемые показатели по признаку их вариабельности располагались в следующем ряду: ГР (2,0) < цитозольная

*Примечание. Здесь и в последующем в скобках приведена разница между максимальным и минимальным значениями показателя (количество раз).

БСЛ-GST (2,5) < каталаза (3,1) < СОД (3,5) < цитозольная ХДНБ-GST (3,6) < ГП (4,3) < GSH (5,4) < микросомальная ХДНБ-GST (5,5) < коэнзим Q (5,6) < ретинолы (13,7) < АОА (30,5) < токоферолы (41,4).

Выявленная межиндивидуальная вариабельность показателей, характеризующих эффективность системы антиоксидантной защиты в печени крыс до воздействия этанолом, также является одним из проявлений «биохимической индивидуальности» животных.

Межиндивидуальная вариабельность выраженности морфологических (в печени) и биохимических (в крови) изменений у крыс после хронической алкогольной интоксикации. Результаты микроскопической оценки печени крыс, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации, свидетельствуют о существенных различиях между животными, как в характере, так и степени алкогольного поражения печени. В порядке возрастания вариабельности показатели располагаются в следующем ряду: деструкция и гибель гепатоцитов (12,1)* < воспалительная инфильтрация паренхимы печени = вакуолизация гепатоцитов (20,0) < жировая инфильтрация паренхимы печени (30,0).

Вариабельность биохимических показателей в сыворотке крови, характеризующих степень алкогольного поражения печени, располагается в следующем ряду: АсАТ (2,4)* < АлАТ (6,0) < ГГТФ (8,4) < ЩФ (17,8).

Выявленная межиндивидуальная вариабельность характера и степени выраженности поражения печени этанолом является важнейшим итогом проведенной работы. В последующем, с помощью методов математического моделирования будет установлена взаимосвязь между поражением печени этанолом и состоянием системы ПОЛ и антиоксидантной защиты в печени животных до хронической алкогольной интоксикации.

Математическое моделирование предрасположенности крыс к алкогольному поражению печени. Установлено, что изучаемые биохимические показатели в печени интактных животных-носителей их минимальных значений ($<M-2\sigma$) достоверно отличаются ($p < 0,05$) от соответствующих показателей животных-носителей максимальных значений ($>M+2\sigma$). Это свидетельствует о существенной гетерогенности интактных крыс по изучаемым показателям. Аналогичная закономерность была выявлена при изучении показателей, характеризующих поражение печени этанолом. Это также свидетельствует о том, что характер и степень тяжести поражения печени этанолом статистически значимо различаются.

Корреляционный анализ выявил взаимосвязь между некоторыми биохимическими показателями в образцах печени крыс, полученных во время операции частичной гепатэктомии (до воздействия этанолом) и характером, степенью последующего поражения печени (после воздействия этанолом) (табл. 1).

Таблица 1. Корреляционные взаимосвязи между показателями, характеризующими степень алкогольного поражения печени (после хронической алкогольной интоксикации) и показателями в печени этих крыс до хронической алкогольной интоксикации

Показатели до хронической алкогольной интоксикации	Показатели после алкоголизации							
	Печень				Кровь			
	Вакуолизация Гепатоцитов	Жировая инфильтрация паренхимы	Воспалительная инфильтрация	Деструкция и гибель гепатоцитов	АЛТ	АсАТ	ЩФ	ГГТФ
1. Диеновые конъюгаты	-0,34	-0,28	-0,30	+0,14	+0,09	-0,33	-0,08	+0,13
2. Кетотриеновые кетоны	+0,21	+0,35	+0,29	+0,25	-0,23	-0,01	-0,30	+0,06
3. МДА	+0,39	+0,34	+0,42	+0,52	-0,03	-0,08	-0,38	+0,02
4. NADPH-зависимое ПОЛ	-0,39	-0,22	+0,20	+0,41	-0,35	-0,38	-0,26	-0,03
5. Аскорбатзависимое ПОЛ	-0,26	-0,11	+0,001	+0,45	-0,32	-0,35	-0,26	+0,01
6. "БВ"ХЛ	-0,11	-0,06	+0,22	+0,15	-0,32	-0,39	+0,37	+0,61*
7. Каталаза	-0,24	-0,13	-0,05	-0,03	+0,02	-0,16	+0,31	-0,10
8. Микросомальная ХДНБ GST	-0,39	-0,41	-0,35	-0,25	-0,26	-0,42	+0,37	+0,03
9. Цитозольная ХДНБ GST	-0,33	-0,15	+0,06	+0,33	-0,48	-0,69*	+0,32	-0,20
10. Цитозольная БСЛ GST	+0,33	+0,24	-0,29	-0,23	-0,20	-0,25	+0,06	-0,10
11. ГП	+0,32	+0,30	+0,18	+0,02	+0,32	+0,31	+0,15	+0,10
12. ГР	+0,31	+0,32	+0,33	+0,10	+0,38	+0,29	+0,06	+0,19
13. СОД	+0,18	+0,38	-0,09	-0,32	-0,14	+0,30	-0,61*	+0,05
14. АОА	+0,001	+0,10	+0,12	-0,001	+0,15	+0,10	+0,32	-0,05
15. GSH	-0,27	-0,71*	-0,27	+0,02	+0,02	-0,46	+0,34	-0,02
16. Токоферолы	+0,08	+0,03	+0,16	-0,02	-0,22	-0,16	-0,09	+0,35
17. Ретинолы	-0,70*	-0,09	-0,21	-0,27	+0,22	+0,31	+0,11	+0,08
18. Каротины	-0,12	+0,23	+0,16	+0,32	-0,36	-0,35	-0,34	+0,07

Примечание. * - Зависимость линейного типа. Жирным шрифтом выделена зависимость нелинейного типа.

Установлено, что вакуолизация гепатоцитов особенно преобладает у крыс с исходно низким уровнем ретинолов в печени.

Жировая инфильтрация паренхимы печени более выражена у крыс с исходно низкой активностью микросомальной GST, а также низким уровнем в печени GSH.

Воспалительная инфильтрация паренхимы печени ассоциируется с исходно повышенным уровнем МДА в печени.

Развитию деструкции и гибели гепатоцитов способствует исходно более высокий уровень МДА в печени и повышенная активность систем его наработки (NADPH- и аскорбат- зависимые пути).

Активность АлАТ в сыворотке крови крыс после хронической алкогольной интоксикации повышена у животных с исходно низкой активностью цитозольной ХДНБ- GST.

Крысы с высокой активностью АсАТ в сыворотке крови после хронической алкогольной интоксикации имели исходно сниженную активность ХДНБ- GST в микросомальной и цитозольной фракции печени и низкий уровень GSH.

Повышенная активность ЩФ в сыворотке крови крыс к концу хронической алкоголизации регистрировалась у животных с энзимопатией СОД до воздействия этанолом.

Высокая активность ГГТФ в сыворотке крови крыс с интоксикацией этанолом ассоциируется с исходно более высокой интенсивностью “БВ” ХЛ в печени этих животных (табл. 1).

Пошаговый многофакторный регрессионный анализ. Степень выраженности деструкции и гибели гепатоцитов под влиянием длительного введения этанола в большей степени проявляется у крыс с исходно высоким уровнем в печени МДА и более активными системами его образования в NADPH - (рис.1А) и аскорбат-зависимом (рис. 1Б) путях. Взаимосвязь этих показателей описывается уравнениями нелинейной множественной регрессии.

Взаимосвязь между активностью цитозольной и микросомальной GST в печени крыс (до алкогольной интоксикации) и активностью АсАТ в крови (после алкогольной интоксикации) описывается уравнением линейной множественной регрессии (рис. 2).

Дисперсионный анализ. Результаты дисперсионного анализа свидетельствуют о высоких информационных качествах моделей. Модели статистически значимы ($p < 0,003$, критерий $F = 6,88$).

Канонический анализ. Результаты канонического анализа подтвердили наличие сильной прямой статистически значимой корреляционной связи между показателями до интоксикации (1-ая группа переменных) и показателями после интоксикации (2-ая группа переменных) (рис. 3). Эта сильная прямая связь хорошо просматривается по компактному положению вытянутому вправо вверх полю точек в координатах нормированных

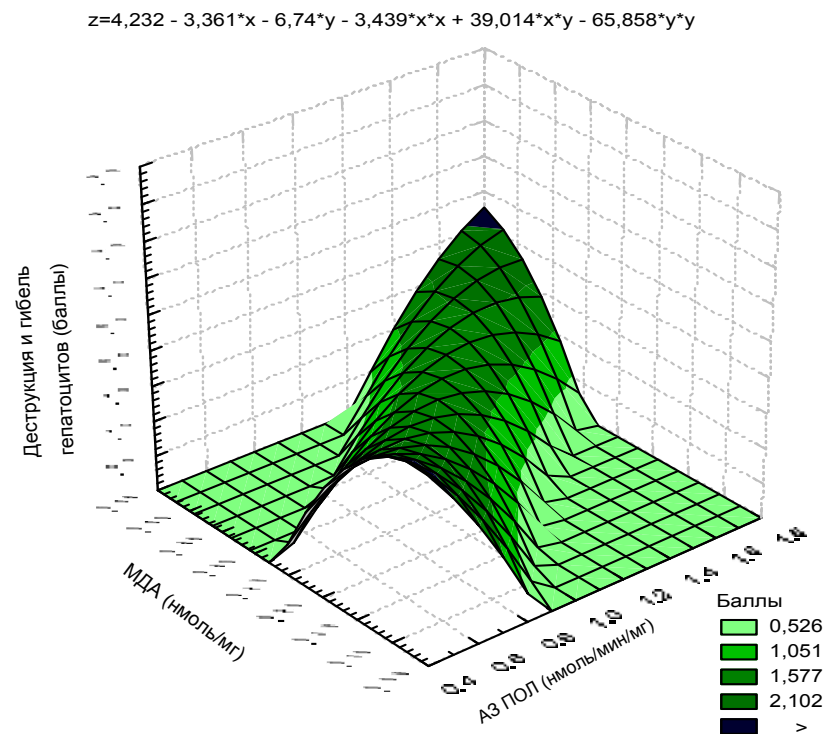
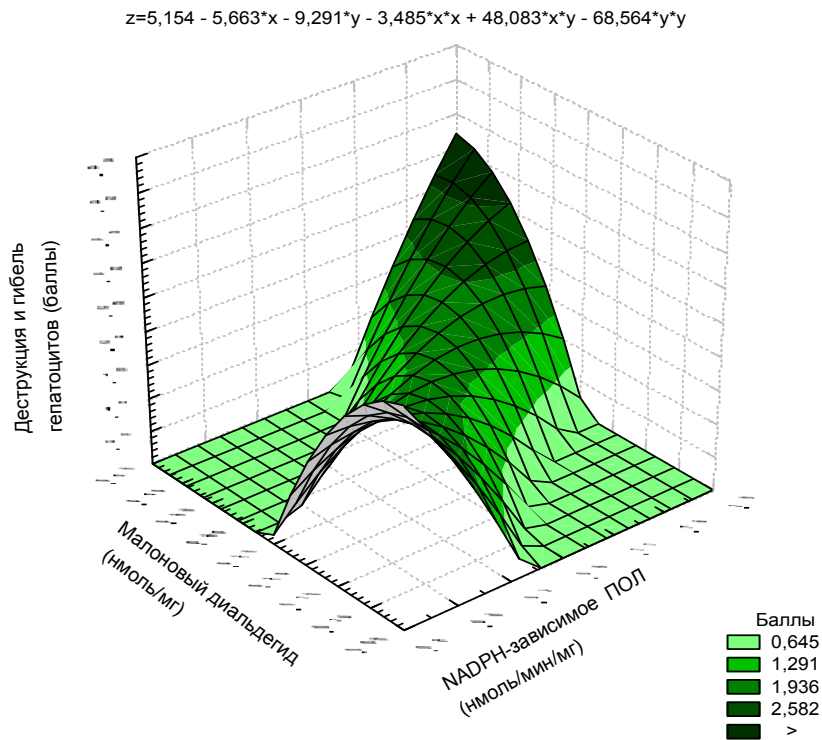


Рис. 1. Взаимосвязь между активностью NADPH-зависимого ПОЛ (А) и аскорбатзависимого ПОЛ (Б), содержанием МДА в печени крыс (до алкогольной интоксикации) и выраженностью деструкции и гибели гепатоцитов после алкогольной интоксикации

Примечание. Выраженность деструкции и гибели гепатоцитов отражает интенсивность окрашивания и цифровые значения, представленные на шкале справа. Уравнение регрессии представлено над рисунком.

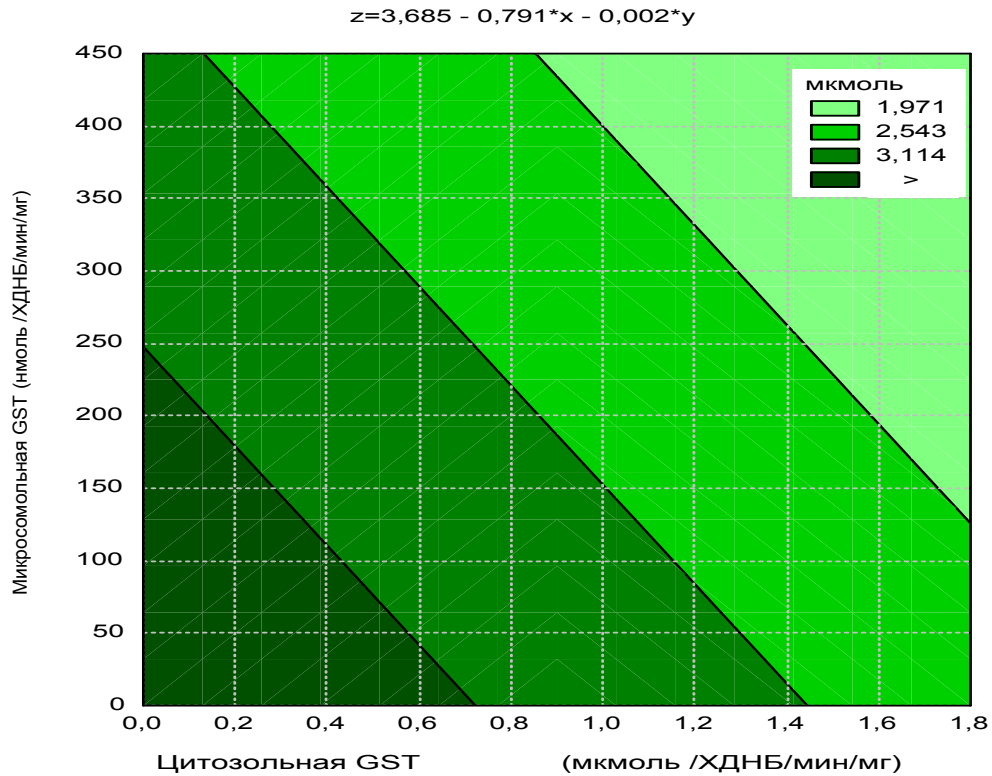


Рис. 2. Взаимосвязь между активностью цитозольной , микросомальной GST в печени крыс (до алкогольной интоксикации) и активностью АсАТ в сыворотке крови (после алкогольной интоксикации)

Примечание. Активность АсАТ отражает характер цвета и цифровые значения, представленные на шкале справа. Уравнение регрессии приведено над рисунком.

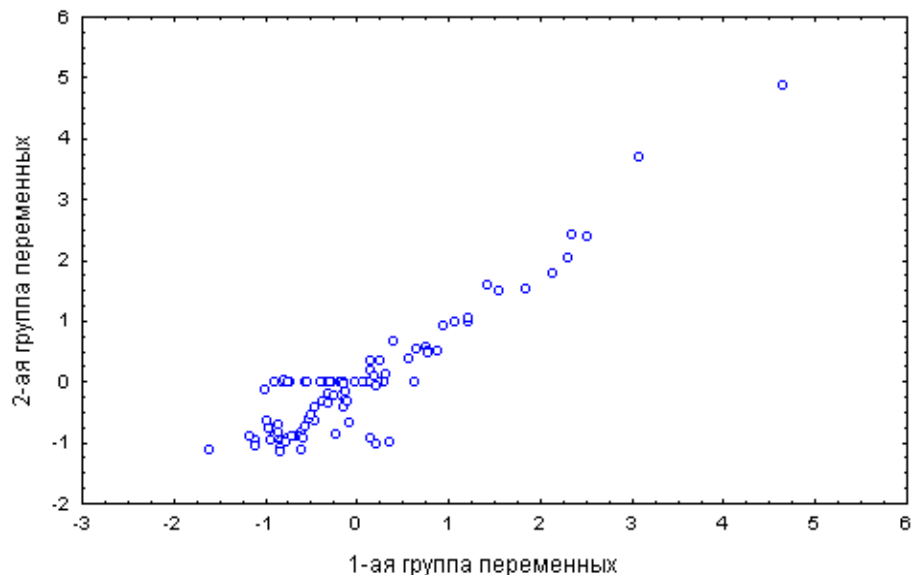


Рис. 3. Множество исследуемых животных в координатах 1-ой и 2-ой групп переменных

Примечание. 1-ая группа переменных – показатели до интоксикации этанолом; 2-ая группа переменных – показатели гепатотоксичности этанола. Точками обозначены индивидуальные крысы.

значений первых канонических переменных для 1-ой (горизонтальная ось) и 2-ой (вертикальная ось) групп наблюдавшихся переменных. Это означает, что алкогольное поражение печени у крыс значимо связано с представленными в таблице 1 исходными биохимическими показателями в печени. Рассчитанный квадрат канонического r (0,92; $p=0,0002$) свидетельствует о том, что в 92% случаев предрасположенность к алкогольному поражению печени, судя по данным морфологических (печень) и биохимических (кровь) исследований обусловлена состоянием изученных исходных показателей в печени, приведенных в таблице 1. Только в 8 % случаев алкогольное поражение печени обусловлено влиянием случайных неучтенных факторов невыясненной природы.

Таким образом, результаты математического моделирования свидетельствуют о существовании тесной взаимосвязи между особенностями протекания свободнорадикальных реакций, состоянием системы антиоксидантной защиты в печени крыс (до хронической алкогольной интоксикации) и характером, степенью выраженности, в последующем, алкогольного поражения печени. Установлено, что врожденно повышенная активность системы ПОЛ и сниженная активность системы антиоксидантной защиты в печени предрасполагают к алкогольному поражению печени. По значимости показатели располагаются в следующем убывающем ряду: 1) система ПОЛ – МДА > аскорбатзависимое ПОЛ > NADPH-зависимое ПОЛ > «БВ» ХЛ; 2) система антиоксидантной защиты – GSH > цитозольная ХДНБ-GST > микросомальная ХДНБ-GST > ретинолы > СОД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования подтверждают выдвинутую в начале работы гипотезу о том, что предрасположенность к алкогольному поражению печени генетически предопределена и зависит, в частности, от индивидуальных особенностей протекания реакций перекисного окисления липидов и состояния системы антиоксидантной защиты в печени до воздействия этанолом. Эти данные в обобщенном виде представлены в таблице 2.

Как видно из данных таблицы 2, факторами, предрасполагающими к развитию алкогольного поражения печени у крыс являются исходно (до алкогольной интоксикации) повышенная активность системы ПОЛ (высокое содержание МДА и активизированные реакции его образования в аскорбат- и NADPH-зависимых путях, более высокие значения «БВ»ХЛ). Особенно неблагоприятным является параллельное ослабление системы антиоксидантной защиты печени этих животных (низкие активности GST и СОД, сниженный уровень GSH и ретинолов) (табл. 2).

Таблица 2. Роль систем ПОЛ и антиоксидантной защиты печени в предрасположенности крыс к алкогольному поражению печени

Показатели в печени до интоксикации этанолом	Способствуют развитию гепатотоксичности этанола	Препятствуют развитию гепатотоксичности этанола
1. Система ПОЛ		
1.1. МДА	✓	
1.2. Аскорбатзависимое ПОЛ	✓	
1.3. NADPH-зависимое ПОЛ	✓	
1.4. “БВ”ХЛ	✓	
2. Система антиоксидантной защиты печени		
2.1. GSH		✓
2.2. Цитозольная ХДНБ-GST		✓
2.3. Микросомальная ХДНБ-GST		✓
2.4. Ретинолы		✓
2.5. СОД		✓

На основе полученных данных можно сделать следующие **выводы:**

1. Существуют значительные межиндивидуальные различия между крысами, как в активности системы ПОЛ, так и системы антиоксидантной защиты гепатоцитов, являющихся проявлением «биохимической индивидуальности» животных [1-6].

2. Поражение печени этанолом в популяции крыс широко варьирует как в количественном, так и в качественном (вакуольная и жировая дистрофия, воспалительная инфильтрация паренхимы, деструкция и гибель гепатоцитов) плане [1-6, 17].

3. Выявлена тесная взаимосвязь между активностью процессов ПОЛ, содержанием и активностью компонентов системы антиоксидантной защиты в печени до введения этанола и характером, степенью последующего алкогольного поражения печени крыс [1-16, 18].

4. К алкогольному поражению печени предрасположены крысы с исходно активизированными процессами ПОЛ (повышенный уровень в печени МДА и более активные системы его генерации в аскорбат- и NADPH-зависимых путях, высокая интенсивность “БВ”ХЛ) и пониженной активностью системы антиоксидантной защиты печени (энзимопатия глутатионтрансфераз и СОД, низкий уровень GSH и ретинолов) [1-16, 18].

5. Предложенный экспериментальный подход может быть использован для выяснения органных биомаркеров предрасположенности к поражению печени, вызванному любыми другими гепатотоксинами [1, 2, 6, 17].

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

СТАТЬИ

1. Бушма М.И., Амбрушкевич Ю.Г., Зиматкин С.М., Бушма К.М. Особенности протекания процессов перекисного окисления липидов и биотрансформации этанола: роль в предрасположенности крыс к развитию гепатотоксичности этанола. // Здоровье и окружающая среда: сб. научных трудов к 75-летию НИИ санитарии и гигиены. /Под ред. С.М. Соколова, В.Г. Цыганкова. – Минск, 2002. – Т. 1. - С. 172 - 179.
2. Бушма М.И., Зиматкин С.М., Амбрушкевич Ю.Г., Бушма Т.В. Межиндивидуальная вариабельность показателей антиоксидантной системы печени как фактор предрасположенности крыс к гепатотоксичности этанола // Здоровье и окружающая среда: сб. научных трудов к 75-летию НИИ санитарии и гигиены. /Под ред. С.М. Соколова, В.Г. Цыганкова. – Минск, 2002. – Т. 1. - С. 165- 172.
3. Бушма М.И., Зиматкин С.М., Амбрушкевич Ю.Г. и др. Биомаркеры предрасположенности к гепатотоксичности этанола // Токсикологический вестник. – 2002, № 5. – С. 23-27.
4. Бушма М.И., Зиматкин С.М., Амбрушкевич Ю.Г. и др. Роль антиоксидантной системы печени в предрасположенности крыс к гепатотоксичности // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66, № 1. – С. 60-63.
5. Бушма М.И., Амбрушкевич Ю.Г., Зиматкин С.М. и др. Системы ПОЛ и биотрансформации этанола в печени как маркеры предрасположенности к гепатотоксичности этанола // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 12. – С. 693-696.
6. Бушма М.И., Зиматкин С.М., Амбрушкевич Ю.Г. и др. Экспериментальный анализ факторов биологической предрасположенности к гепатотоксичности этанола. // Наркология. – 2002, № 6. – С.12-15.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

7. Амбрушкевич Ю.Г., Бушма М.И. Биохимические механизмы, ответственные за развитие гепатотоксичности этанола. // Достижения медицинской науки Беларуси. – Минск, 2001. – Вып. VI. – С.156-157.
8. Амбрушкевич Ю.Г. Взаимосвязь между морфологическими проявлениями алкогольной гепатопатии и индивидуальными особенностями системы перекисного окисления липидов в печени крыс // Аспекты клинической анатомии и вопросы конституциональной, возрастной и экспериментальной морфологии: Сб. науч. тр. / Под ред. Е.С. Околокулака. – Гродно, 2003. – С. 15-17.

9. Амбрушкевич Ю.Г. Взаимосвязь между особенностями биохимического гомеостаза в печени крыс и их чувствительностью к гепатотоксичности этанола. // Материалы I-ой Российско-Белорусской конференции «Медицинские и социально-психологические проблемы алкогольной и наркотической зависимости. – Витебск, 2002. - С. 3-4.
10. Амбрушкевич Ю.Г., Бушма М.И., Зиматкин С.М. и др. Система перекисного окисления липидов печени как фактор предрасположенности к гепатотоксичности этанола // Материалы X съезда Белорусского общества физиологов. - Минск, 2001. - С. 3.
11. Амбрушкевич Ю.Г. Сниженный антиоксидантный потенциал печени, как фактор, предрасположенности к развитию гепатотоксичности этанола крыс // Аспекты клинической анатомии и вопросы конституциональной, возрастной и экспериментальной морфологии: Сб. науч. тр. / Под ред. Е.С. Околокулака. – Гродно, 2003. – С.17-18.
12. Бушма М.И., Амбрушкевич Ю.Г., Зиматкин С.М. и др. Биомаркеры предрасположенности к гепатотоксичности этанола. // Материалы 5-го международного симпозиума гепатологов Беларуси. – Гродно, 2002. – С. 95.
13. Бушма М.И., Амбрушкевич Ю.Г., Зиматкин С.М. и др. Предрасположенность крыс к гепатотоксичности этанола: роль антиоксидантной системы // Материалы X съезда Белорусского общества физиологов. - Минск, 2001. - С. 20.
14. Бушма Т.В., Амбрушкевич Ю.Г., Бушма М.И. Математическое моделирование предрасположенности к гепатотоксичности этанола. // Материалы X съезда Белорусского общества физиологов. - Минск, 2001. - С. 21.
15. Ambrushkevich Yuriy G., Bushma Mikhail I., Sheibak Vladimir M. The relationship between the systems of xenobiotic biotransformation, free radical oxidation and antioxidant defense in rats exposed to the chronic alcohol intoxication. //J. Alcohol and alcoholism. – 2001. – Vol. 36, № 5. – P. 496.
16. Bushma M.I., Ambrushkevich Y.G., Zimatkin S.M. et al. Antioxidant system of the liver as a retention` factor in the development of ethanol hepatotoxicity // Benzon symposium № 48 drug metabolism: regulation and importance. – Copenhagen, Denmark, 2001. – P. 34.
17. Bushma T.V., Ambrushkevich Y.G., Zimatkin S.M. and Bushma K.M. Role of the system of peroxide oxidation of lipids in predisposition of rats to ethanol hepatotoxicity. // J. Drug metabolism reviews. – 2001. – Vol. 33, № 1. – P.233.
18. Bushma T., Zimatkin S., Ambrushkevich Y., Bushma M. Biomarkers of predisposition to ethanol hepatotoxicity. // J. Alcohol and alcoholism. – 2001. – Vol. 36, № 5. – P. 493.

РЕЗЮМЕ
Амбрушкевич Юрий Георгиевич

Роль процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы печени в предрасположенности к гепатотоксичности этанола

Ключевые слова: печень, этанол, гепатотоксичность, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система печени.

Объект исследования: печень и сыворотка крови крыс.

Предмет исследования: причины предрасположенности к алкогольному поражению печени

Цель работы: установление возможной роли процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты печени в предрасположенности крыс к гепатотоксичности этанола.

Методы исследования: токсикологические, морфологические и биохимические; методы математического моделирования.

Полученные результаты. На основе впервые предложенной экспериментальной модели для выявления органных маркеров предрасположенности к гепатотоксичности этанола доказано, что крысы с исходно более высоким уровнем в печени малонового диальдегида, более активными системами его образования (аскорбат- и NADPH- зависимые пути), повышенной интенсивностью «быстрой вспышки» хемилюминесценции предрасположены к алкогольным поражениям печени. Отягощающим обстоятельством является энзимопатия ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы и глутатионтрансферазы, а также низкое содержание в печени: восстановленного глутатиона и ретинолов.

Научная новизна: впервые установлена природа ранее неизвестных факторов (маркеров) предрасположенности к алкогольному поражению печени. Доказано, что предрасположенность (повышенная чувствительность) здоровых животных к этанолиндуцируемому окислительному стрессу является важным условием последующей реализации гепатотоксичности этанола.

Рекомендации по использованию: 1. Разработанный методический подход может быть использован для изучения причин различной индивидуальной чувствительности к другим гепатотоксинам.

2. Потребление пищевых продуктов, содержащих в больших количествах ретинолы и глутатион, может ослабить проявления алкогольной гепатопатии.

Область применения: экспериментальная и клиническая токсикология, экспериментальная медицина.

РЭЗІЮМЕ
Амбрушкевіч Юрый Георгіевіч

Роля працэсаў перакіснага акіслення ліпідаў і антыаксідантнай сістэмы печані ў схільнасці да гепататаксічнасці этанолу.

Ключавыя словы: печань, этанол, гепататаксічнасць, перакіснае акісленне ліпідаў, антыаксідантная сістэма печані.

Аб’ект даследавання: печань і сыватка крыві пацукоў.

Прадмет даследавання: прычыны схільнасці да алкагольнага паражэння печані.

Мэта работы: устанаўленне магчымай ролі працэсаў перакіснага акіслення ліпідаў і антыаксідантнай абароны печані ў схільнасці пацукоў да гепататаксічнасці этанолу.

Метады даследавання: таксікалагічныя, марфалагічныя і біяхімічныя; матэматычнага мадэліравання.

Атрыманыя вынікі. На аснове ўпершыню прапанаванай эксперыментальнай мадэлі для выяўлення органнага маркераў схільнасці да гепататаксічнасці этанолу даказана, што пацукі з генетычна больш высокім узроўнем у печані малонавага дыяльдэгіду, больш актыўнымі сістэмамі яго ўтварэння (аскарбат- і NADPH-залежныя шляхі), павышанай інтэнсіўнасцю “хуткай успышкі” хемілюмінесцэнцыі схільны да алкагольных паражэнняў печані. Абцяжарваючай акалічнасцю з’яўляецца энзімапатыя ферментаў антыаксідантнай сістэмы: супераксіддысмутазы і глутатіянтрансферазы, а таксама нізкае ўтрыманне ў печані адноўленага глутатіёна і рэцінолаў.

Навуковая навізна: упершыню ўстаноўлена прырода раней невядомых фактараў (маркераў) схільнасці да алкагольнага паражэння печані. Даказана, што схільнасць (павышаная адчувальнасць) здаровых жывёл да этаналіндуцыруемага акісляльнага стрэсу з’яўляецца важнай умовай наступнай рэалізацыі гепататаксічнасці этанолу.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: 1. Распрацаваны метадычны падыход можа быць выкарыстаны для вывучэння прычын рознай індывідуальнай адчувальнасці да іншых гепататаксінаў.

2. Ужыванне харчовых прадуктаў, якія ўтрымліваюць у вялікіх колькасцях рэцінолы і глутатіён, можа аслабіць праяўленне алкагольнай гепатапатыі.

Галіна прымянення: эксперыментальная і клінічная таксікалогія, эксперыментальная медыцына.

SUMMARY

Ambrushkevich Yuri Georgievich

The Role of the Lipid Peroxide Oxidation Processes and Antioxidant Hepatic System in Predisposition to Ethanol Hepatotoxicity.

Key words: liver, ethanol, hepatotoxicity, lipid peroxide oxidation, hepatic antioxidant system.

Object of the study: liver, rat blood serum.

Subject of the study: causes of predisposition to alcohol damage of the liver.

Aim of the study: the determination of a possible role of lipid peroxide oxidation, protection of the liver in predisposition of rats to ethanol hepatotoxicity.

Methods of the study: toxicological, morphological and biochemical; the methods of mathematical modeling.

Obtained results: On the basis of the first proposed experimental model for the determination of the organ markers of predisposition to ethanol hepatotoxicity it has been proved that rats with genetically higher level of malon dialdehyde in the liver, more active systems of its formation (ascorbat - and NADPH - dependent ways), increased intensivity of «a rapid flash» of chemoluminescence are predisposed to alcohol damage of the liver. Enzymopathy of antioxidant system enzymes such as superoxiddismutase and glutathionetransferase and low content of restored glutathione and retinol in the liver are an aggravating circumstance.

Scientific novelty: the nature of earlierunknown markers of predisposition to the alcohol damage of the liver has been first determined. It has been proved that predisposition (increased sensetivity) of healthy animals to ethanol-induced oxidant stress is an important condition of the subsequent realization of ethanol hepatotoxicity.

Recommendations for employment:

1. The elaborated methodological approach may be employed for studying the causes of different individual sensetivity to other hepatotoxins.
2. The consumption of food products containing retinol and glutathion in large quantities may reduce the manifestations of alcohol hepatopathy.

The area of employment: experimental and clinical toxicology, experimental medicine.