СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ И МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В КРОВИ КРЫС И РЕГУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АДАПТОГЕНА ВИТАЖЕН ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Л.А.Амирян, М.А.Симонян, Г.А.Овеян, Р.Г.Бороян

*/Ереванский государственный медицинский университет им. М.Гераци,
Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА/
375025 Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: острая алкогольная интоксикация, кровь, металлопротеины, оксидативный стресс, адаптоген витажен, регулирование

Известно, что этанол вызывает оксидативный стресс гепатоцитов, сопровождающийся усилением перекисного окисления липидов (ПОЛ), накоплением внутриклеточного низкомолекулярного железа и понижением уровня супероксиддисмутазы (СОД) [22].

При острой алкогольной интоксикации (ОАИ) наблюдается усиление ПОЛ в сыворотке крови и в печеночной ткани с соответственным понижением уровня антиоксидантных систем [20]. В зависимости от количества вводимого алкоголя при ОАИ активность эндогенных антиоксидантных систем изменяется неодинаково. Так, в результате интоксикации крыс метанолом происходит повышение активности антирадикальных ферментов (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза), а также повышение уровня ПОЛ и витамина С [25,26]. При ОАИ альбумин и липопротеин сыворотки высокой плотности способны связывать образующиеся эндотоксины [15]. Коренные изменения при ОАИ вызывает совместное действие этанола с никотином: у крыс резко повышается интенсивность ПОЛ и снижается активность антирадикальных защитных систем, что способствует развитию атеросклероза [19] и рака легких [10], а также болезней печени [14,18]. Причем, при циррозе печени, вызванном алкогольной интоксикацией, заметно снижается активность СОД и каталазы не только в самой печени, но и в эритроцитах [13]. При ОАИ некоторые металлопротеины, например трансферин, претерпевают не только количественные, но и качественные изменения, характеризующиеся снижением содержания углеводов [16], а уровень микросомального цитохрома В-5 заметно возрастает [23]. Токсический эффект алкоголя при ОАИ заметно уменьшается под воздействием алоина (вод-

ного экстракта алоэна, который содержит С-гликозидное производное антрахинона) [11], синтетических препаратов антиоксидантного действия — дубинола и β-каротина [9], энтеросорбента полифепана, гепатопротекторного экстракта *salsola collina* [12] и СОД [2]. Механизм действия приведенных защитных систем против повреждающих эффектов этанола в условиях вызванного оксидативного стресса в основном состоит в уменьшении уровня активных форм кислорода (АФК), токсических вторичных продуктов окисления алкоголя. Это приводит к стимуляции синтеза ДНК, протеинов, стабилизации биомембран, предотвращению инактивации различных ферментных систем [2,12].

Положительное действие витажена при различных проявлениях оксидативного стресса (например, при спортивной нагрузке [1]) дает основание для апробации этого препарата как протективного средства при ОАИ.

Проведенные к настоящему времени исследования по выявлению патогенетических механизмов при ОАИ в основном связаны с определением состояний некоторых антиоксидантных систем (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза) и ПОЛ. Практически отсутствуют исследования, посвященные изучению изменений прооксидантных металлопротеинов различной локализации. Это создает определенные трудности при выявлении молекулярных механизмов патогенеза при ОАИ, т.к. отсутствуют данные о состоянии различного характера прооксидантных систем, основных источников продуцирования АФК. С другой стороны, необходимо учесть, что в аэробных организмах, в том числе в организмах млекопитающих, анти- и прооксидантные системы, в частности металлопротеины крови, действуют одновременно и взаимосвязанно. Для получения объективной картины становится необходимым одновременное выявление количественных сдвигов не только антиоксидантных, но и прооксидантных металлопротеинов при ОАИ в эксперименте, в том числе и в условиях действия препарата витажен, что и является целью настоящей работы.

Материал и методы

Исследования проводились на белых крысах (180–200 г) в условиях ОАИ. Животные были разбиты на 3 группы: контрольная (К) — 8 крыс, опытная-I (ОГ-1) — 12 крыс, получавшие этанол внутривентриально (6 г/кг) после двадцатичасового голодания и ОГ-2 — 10 крыс, получавшие перорально в среднем 90–100 мг/кг препарат витажен (препарат был смешан с кормом крыс). Животные всех групп содержались в аналогичных условиях. После 30-часовой интоксикации животные были декапитированы под эфирным наркозом. Кровь каждой группы животных была исследована в отдельности, одновременно. В каждой серии исследований (всего были проведены 4 серии) из крови крыс К, ОГ-1, ОГ-2 одновременно выделялись и очищались металлопротеины антиокси-

дантного (Cu, Zn-СОД, каталаза — из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферин (ТФ) — оба фермента из сыворотки крови) и прооксидантного (супрол-супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки и цитохромы: В-5 — из растворимой фракции эритроцитов, В-558 I и В-558 II из сыворотки крови, В-558 III, В-558 IV и В'-558 IV — из мембран эритроцитов) действия путем ионно-обменной хроматографии отдиализованных против воды белковых фракций: из сыворотки, мембран (после их солубилизации неионным детергентом Тритон Х-100) и растворимой части эритроцитов на целлюлозах КМ-52, ДЕ-52 («What man», Англия) и сефадексе ДЕАЕ А-52 («Pharmacia», Швеция). Гель-фильтрацию белковых фракций проводили на биогелях Р-100 и Р-150 («Reanal», Венгрия) [3,7].

Содержание полученных металлопротеинов определяли на основании величины их характерных плотностей максимальных оптических поглощений: для ЦП при 610 нм, ТФ — 490, супрола — 430, цитохрома В-5 — 525, цитохромов В-558 I–IV и В'-558 IV (последний является сильноосновным типом эритроцитарного мембранного цитохрома В-558 нового типа [4]) — при 530 нм.

СОД-активность фракций определяли синим нитротетразолиевым методом (НТС) [17], а каталазную активность — пермаганометрией (в обоих случаях удельная активность была определена в расчете на 1 мл эритроцитов). Супероксидпродуцирующая активность супрола также была определена НТС методом путем фиксирования прироста оптического поглощения образовавшегося формазана при 558 нм (ΔА-558) в процентном соотношении [22].

Содержание продукта липидной пероксидации — малонового диальдегида (МДА) в мембранах эритроцитов и сыворотке крови определяли из расчета на 1 мл сыворотки или эритроцитов [23].

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

После 30-часовой ОАИ (ОГ-1) на фоне повышения уровня прооксидантных металлопротеинов происходит заметное снижение содержания антиоксидантных металлопротеинов (табл. 1). При этом наблюдается корреляция между приростом уровней прооксидантных металлопротеинов и липидной пероксидации в сыворотке крови и мембранах эритроцитов (содержание МДА в сыворотке крови и мембранах эритроцитов увеличивается, табл. 2).

В ОГ-2 под воздействием витагена наблюдается тенденция приближения этих показателей к контрольным, хотя содержание цитохромов В-558 I + В-558 II, В-558 III и супрола остается еще выше нормы (табл. 1). Все показатели улучшаются (по сравнению с ОГ-1) в 2–4 раза. Необходимо отметить резкое повышение уровня сывороточных цитохромов В-

558 I и В-558 II по сравнению с ОГ-1. Как показывают первоначальные данные, эти цитохромы имеют высокую резистентность к перекиси водорода, более того, цитохром В-558 II защищает некоторые биосистемы от повреждающих эффектов активного кислорода [24]. Адаптационные механизмы организма при ОАИ способствуют повышению уровня цитохромов В-558 I и В-558 II против повышенного уровня АФК, в частности, перекиси водорода.

Таблица 1

Относительные изменения уровней металлопротеинов анти- и прооксидантного действия в крови крыс, % (n=4)

Металлопротеины	ОГ-1	ОГ-2
Цитохром В-5	+31,1±1,8	+15,1±1,2
Сумма цитохромов В-558 I и В558- II	+152,8±4,1	+41,1±2,1
Цитохром В-558 III	+112,4±5,2	+38,3±4,1
Цитохром В-558 IV	+110,6±5,1	+19,2±0,4
Цитохром В'-558 IV	+25,8±1,7	+ 11,8±0,2
Супрол	+145,2±3,6 +(25,2±61)	+34,2±3,8 +(11,3±0,7)
ЦП	-44,2±1,2	-20,3±0,6
ТФ	-60,5±2,2	-26,4±0,8
СОД	-25,1±0,6	-11,6±0,3
Каталаза	-41,6±1,4	-25,4±0,9

Примечание. Данные сравнивались с контрольными показателями, которые принимались за 100%. В скобках приведены показатели O₂-продуцирующей активности супрола.

Таблица 2

Относительные изменения уровня МДА в сыворотке крови и мембранах эритроцитов крыс, % (n=4)

Группа	Прирост уровня МДА	
	сыворотка крови	мембраны эритроцитов
ОГ-1	19,3±0,4	32,1±1,2
ОГ-2	5,2±0,3	12,4±0,5

Примечание. Показатели сравнивались с контрольными, которые принимались за 100%.

Иницирование процессов ПОЛ и увеличение содержания супрола в сыворотке крови, видимо, есть результат нарушения липидного обмена, что характерно для ОАИ [25]. Процессу способствуют и фосфолипидные остатки этого липопротеина сыворотки нового типа — супрола [22], который за счет продуцирования O_2^- может участвовать в процессах усиления ПОЛ. Увеличение при ОАИ уровня цитохрома В-5 [12], возможно, связано с некоторой гиподинамией животных (это неоднократно подтверждено в эксперименте). Повышение же уровня эритроцитарных цитохромов В-558 при ОАИ, возможно, связано с необходимостью в данных условиях продуцирования больших количеств O_2^- (цитохромы В-558 различных локализаций являются компонентами систем продуцирования O_2^- [19]). С другой стороны, из-за повышенной липидной перекисидации мембраны эритроцитов несколько дестабилизируются, что облегчает процесс выброса этих мембранных гемопротеинов.

Резкое уменьшение содержания ТФ при ОАИ (около 60%), видимо, связано с увеличением расхода этого белка, особенно при нарушении метаболизма железа [1]. Понижение уровня других антиоксидантных металлопротеинов в ОГ-1, возможно, связано со следующими факторами:

1. В присутствии алкоголя резко (в 15–20 раз) повышается стационарная концентрация генерированных при расщеплении перекиси водорода (липоперекисей) супероксидных радикалов [26], которые проявляют токсическое воздействие почти на все биосистемы, в частности на СОД, каталазу, ЦП, нуклеиновые кислоты, биомембраны [27].
2. Путем ферментативного дисмутирования O_2^- образуется в избытке перекись водорода, которая также способна инактивизировать СОД [26] — ключевой фермент антирадикальной защиты организма.
3. Повышение при ОАИ уровня прооксидантных металлопротеинов также вызывает увеличение уровня АФК.

Таким образом, применение витажена при ОАИ приводит к корреляции между уровнями прооксидантных металлопротеинов и МДА. Этот факт подтверждается регулирующим эффектом витажена, в состав которого входят экстракт женьшеня, витамины С и Е, микроэлементы [17], за счет чего препарат приобретает антиоксидантное свойство. Снижая уровень АФК, витажен дает организму возможность постепенно нормализовать уровень приведенных показателей.

Полученные результаты являются основанием для рекомендации использования препарата витажен при ОАИ не только в эксперименте, но и в клинике в качестве средства, предупреждающего повреждающее действие алкоголя.

Поступила 04.03.99

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՄԵՏԱԳԱՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ԵՎ ՄԱԼՈՆԱՅԻՆ
ԴԻԱԼԴԵՀԻԴԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ՎԻՏԱԺԵՆ ԳԵՂԻ
ԿԱՐԳԱՎՈՐԻՉ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒՐ ԱԼԿՈՀՈԼԱՅԻՆ ԻՆՏՈՔ-
ՍԻԿԱՅԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Լ.Ա.Ամիրյան, Մ.Ա.Սիմոնյան, Գ.Ա.Հովեյան, Ռ.Գ.Բորոյան

Էթանոլի ներորովայնային ներարկման (6գ/կգ) միջոցով առաջացված ալկոհոլային սուր ինտոքսիկացիայից 30ժ հետո դիտվում են հակա- և պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների մակարդակների փոփոխություններ: Պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների (ցիտոքրոմ- B-558 I, B-558 II, B-558 III, B-558 IV, B'-558 IV, սուպրոլ) մակարդակների բարձրացման ֆոնի վրա նկատվում է հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեինների (տրանսֆերին, ցերուլոպլազմին, Cu, Zn- ՍՕԴ, կատալազա) քանակների նվազում: Վիտաժեն հակաօքսիդանտային դեղի ազդեցության տակ այս մետաղապրոտեինների մակարդակներին բնորոշ ցուցանիշները մոտենում են ստուգիչ փորձի տվյալներին: Փորձի արդյունքները ցույց են տալիս, որ սուր ալկոհոլային ինտոքսիկացիայից առաջացած օքսիդատիվ ստրեսի ժամանակ վիտաժենի ազդեցության շնորհիվ տեղի է ունենում հակա- և պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների մակարդակների կարգավորում:

METALLOPROTEINS COTENT IN RAT BLOOD AND THE REGULATORY EFFECT
OF ADAPTOGEN VITAJEN IN ACUTE ALCOHOLIC INTOXICATION

L.A.Amiryan, M.A.Simonyan, G.A.Hoveyan, R.G.Boroyan

After 30 h. of acute alcoholic intoxication (AAI) caused by intraabdominal injection of ethanol (6g/kg), the levels of anti- and prooxidant metalloproteins, the regulators of active oxygen metabolism, changed. On the background of prooxidant metalloproteins (cytochroms B-558 I; B-558 II; B-558 III; B-558 IV; B'-558 IV; suprol) increase, a degradation of antioxidant metalloproteins (transferrin; cerrhuloplasmin; Cu, Zn- SOD; catalase) took place. Under the influence of the antioxidant preparation vitajen, a tendency of approximation of the levels of these metalloproteins to control indices is observed. This demonstrates the existence of specific for oxidative stress dislocation of anti- and prooxidant metalloproteins levels and the regulating effect of vitajen in AAI.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багдасарян Г.Г., Боролян Р.Г., Овсян Г.А., Симонян М.А. Итоги и перспективы развития современной медицины в контексте XXI века. Бишкек, 1998.
2. Симонян М.А., Амирханян Л.Т., Карагезян К.Г. Тез. докл. II Всесоюз. научн. конф. "Биоантиоксидант". Черноголовка, 1986, с. 84.
3. Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М. Биохимия, 1995, 60, с. 1977.
4. Симонян М.А., Галоян А.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. ДНАН РА, 1997, 97, с.62.
5. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М., Симонян М.А. Сб. мат. научно-практ. конф. ЦКВГ МО РА, 1999 (в печати).
6. Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М. Биохимия, 1996, 61, с.932.
7. Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобр. N341. Ереван, 1997.

8. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* ПОЛ в биомембранах. М., 1972.
9. *Миненкова Е. А., Барсель В. А., Гагарина А.Б. и др.* Хим. фармацевт. ж., 1997(10), с.15.
10. *Ashakumary L., Vijayammal P.L.* J. Appl. Toxicol., 1996, 16 (4), p. 305.
11. *Chung J.H., Chong J.C., Lee J.Y. et al.* Biochem. Pharmacol., 1996, 52, p. 1461.
12. *Denchenko E.O., Demin E.S., Lunjak N.K., Chirkin A.A.* Alcohol and Alcohol., 1997, 32, p.414.
13. *Farbiszewski R.* Roc. Acad. Med. Bialymst., 1995, 40, p. 243.
14. *Ishii H., Thurman R.G.* Alcohol. Clin. Exp. Res., 1996, 20, A162.
15. *Kitano H., Fukui H., Okamoto Y. et al.* Alcohol. Clin. Exp. Res., 1996, 20, 73A.
16. *Niemela O., Sarvajarvi K., Blave J. E., Israel Y.* Alcohol. Clin. Exp. Res., 1995, 19, p. 1203.
17. *Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 64, p.949.
18. *Pratico D., Iulano L., Basili S., Ferro D. et al.* J. Invest. Med., 1998, 46, p. 51.
19. *Puddey I.B., Croft K.* Addict. Biol., 1997, 2, p. 269.
20. *Rosnovska M., Langer D., Cendrovski W.* Psychiatr. Pol., 1995, 29, p. 539.
21. *Salonen J., Kauhanen J., Yla-Herttula S.* Alcohol and Alcohol., 1997, 32, p.334.
22. *Sergent O, Morel I., Chevanne M., Cillard J.* Biochem. Mol. Biol. Int., 1995, 35, p. 575.
23. *Simonetti P., Cervato G., Brusamolino A. et al.* Alcohol., 1996, 13, p. 41.
24. *Simonian M.A, Nalbandian R.M* Biochem. Biophys. Acta, 1979, p. 279.
25. *Skrzydewska E.* Roc. Akad. Med. Bialimst., 1996, 41, p. 397.
26. *Sokolovska V.V., Petrov S.A.* Fiziol. Zh., 1995, 41, p. 112.
27. *Tsan M.F.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1997, 214, p. 107.