УДК 612.015.11:612.6.03:612.014.46

Л.П. Козак, О.І. Терлецька, С.М. Ковальчук

Роль окисного метаболізму у формуванні адаптаційного ефекту за умов впливу етанолу та коригуючої дії імпульсного гіпоксичного тренування

Исследовали активность реакций липопероксидации, систем антиоксидантной защиты, содержание метаболитов оксида азота, стойкость эритроцитов к перекисному гемолизу у крыс в условиях влияния этанола и импульсной гипоксической тренировки. Оценивали детоксицирующую способность печени по выведению 4-аминоантипирина. Установлено, что влияние этанола сопровождается нарушениями в системе кислородзависимых метаболических реакций в различных органах и системах. Проведенные исследования подтверждают целесообразность использования импульсной гипоксической тренировки в комплексном лечении хронической алкогольной интоксикации.

ВСТУП

Вивченню біотрансформації етанолу та основних механізмів його токсичної дії присвячена низка робіт, які торкаються різних аспектів цієї проблеми. Основними факторами, які визначають токсичні ефекти алкоголю є його мембранотропна, прооксидантна дія, нагромадження відновлених форм НАД, утворення ацетальдегіду, конкуренція етанолу з іншими джерелами енергії [2, 6].

Нині стає все більше очевидним, що удосконалення методів лікування алкоголізму, крім використання традиційних детоксикаційних заходів, потребує адекватної корекції показників гомеостазу на всіх етапах розвитку інтоксикації. Одним із неспецифічних чинників є застосування багаторазово повторюваних, обмежених за потужністю імпульсно-гіпоксичних впливів, тригерних механізмів для ініціації захисних систем клітини, індукування синтезу антиоксидантних ферментів [11, 18]. За останні роки з'явилася низка доказів того, що при використанні інтервальних гіпоксичних впливів у організмі виробляються механізми посилення аеробних шляхів отримання енергії за рахунок ендогенного кисню, який вивільняється в результаті активації вільнорадикальних, перекисних та ферментативних антиоксидантних процесів [4, 20, 21, 24, 25].

Аналіз літературних даних свідчить про важливу роль оксиду азоту у формуванні захисних механізмів за гіпоксичних умов [7]. Проте не було проведено систематичних досліджень участі NO у балансі вільнорадикальних процесів та системі антиоксидантного захисту за умов впливу етанолу та дії імпульсного гіпоксичного тренування.

Метою даного дослідження було вивчення стану кисеньзалежного метаболізму та системи оксиду азоту у щурів на ранніх етапах впливу етанолу та дії на ці показники імпульсного гіпоксичного тренування (ІГТ).

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на білих щурах-самцях масою 0,18-0,22 кг, яких було розділено на чотири групи (по десять тварин у кожній): перша – контроль; друга – вплив етанолу –

© Л.П. Козак, О.І. Терлецька, С.М. Ковальчук

тварини цієї групи як єдине джерело пиття отримували 15%-й розчин етанолу впродовж 30 діб [2]; третя – вплив імпульсного гіпоксичного тренування (ІГТ); четверта – етанол та ІГТ – щурів цієї групи після тридцятидобового вживання 15%-го розчину етанолу піддавали ІГТ. Тварин попередньо тестували за критерієм чутливості до різних ефектів етанолу, використовуючи етаноліндукований сон [2]. Для експерименту використовували довгосплячих щурів з підвищеною метаболічною чутливістю до етанолу. Гіпоксичне тренування проводили в барокамері в наступному режимі: п'ятиразове "піднімання" на "висоту" 6 км по 10 хв, перерви між сеансами гіпоксії – 15 хв, тривалість тренувань – 10 діб, швидкість "піднімання" – 20 м/с [17]. Утримання, годування та евтаназія (за допомогою декапітації) лабораторних тварин проводились у відповідності з прийнятими в експериментальній практиці методиками [5].

Визначали вміст ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду) [19] і дієнових кон'югатів (ДК) [3]. Досліджували активність антиоксидантних ферментів: супероксиддисмутази (СОД) [12], каталази (КАТ) [9], глутатіонпероксидази (ГПО) [14], загальну антиоксидантну активність оцінювали за індексом $I_{АОА}$ [13], вміст ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) – [8], перекисну резистентность еритроцитів – [15]. Оцінку НАДФН-залежної монооксигеназної ферментативної системи печінки у лабораторних тварин за умов впливу етанолу та використанні ІГТ здійснювали за допомогою визначення ступеня деметилювання амідопірину, який визначали по виведенню основного його метаболіту – 4-аміноантипірину з сечею за методом [16]. Вміст метаболітів оксиду азоту в гомогенатах мозку визначалися спектрофотометрично за допомогою реактиву Грісса [22].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших попередніх дослідженнях було показано, що вплив 15%-го розчину етанолу впродовж 30 діб істотно змінює проходження кисеньзалежних метаболічних реакцій [23]. Встановлено, що внаслідок напруження компенсаторних процесів вміст ТБК-активних продуктів у крові тварин з хронічним впливом етанолу не відрізнявся від контролю. Використання ІГТ у групі тварин із хронічною алкогольною інтоксикацією супроводжується зменшенням у крові вмісту малонового діальдегіду (МДА), як щодо контролю, так і по відношенню до тварин, які споживали етанол як єдине джерело пиття (табл.1). Цей факт може

Таблиця 1. Зміни біохімічних показників у крові довгосплячих щурів за умов дії імпульсного гіпоксичного тренування після 30-добового вживання етанолу (M±m, n=10)

Показники	Контроль	Етанол	Імпульсне гіпоксичне тренування	Етанол та імпульсне гіпоксичне тренування
ТБК-активні продукти, мкмоль/мл	112,36±5,91	109,93±5,42	105,50±4,32	78,12±3,10*,**,***
Дієнові кон'югати, одЕ/мл	1,32±0,08	0,75±0,12*	1,13±0,09	0,89±0,05*
Загальна антиокисна активність ($I_{АОА}$)	1,34±0,04	1,32±0,05	1,54±0,08*	1,29±0,07
Каталаза, мкмольH_2O_2 · мл$^{-1}$ · год$^{-1}$	0,097±0,006	0,080±0,007	0,133±0,008*,**	0,113±0,015**
Супероксиддисмутаза, од.акт. мл·хв$^{-1}$	545,57±35,98	243,73±68,17*	646,57±26,76**	477,15±45,06**,***
Глутатіонпероксидаза, мкмольGSH·мл$^{-1}$ ·хв$^{-1}$	1,16±0,08	0,57±0,08*	1,83±0,04*,**	0,63±0,09*,**°
Ліпопротеїни низької щільності, ум.од.	7,83±0,23	8,63±0,40*	6,06±0,35*,**	6,28±0,17*,**

Примітка. Тут і в табл. 2 та 3 * P<0,05 порівняно з контролем; ** P<0,05 – з групою тварин за умов впливу етанолу; *** P<0,05 – з групою тварин за умов дії ІГТ.

Таблиця 2. Зміни біохімічних показників у печінці довгосплячих щурів за умов дії імпульсного гіпоксичного тренування після 30-добового вживання етанолу (M±m, n=10)

Показники	Контроль	Етанол	Імпульсне гіпоксичне тренування	Етанол та імпульсне гіпоксичне тренування
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	948,10±27,40	1346,78±84,60*	1252,82±78,21*	905,17±25,88**,***
Дієнові кон'югати, од.Е/г	4,4±0,87	7,9±1,05*	5,9±0,90	3,65±0,46**
Загальна антиокисна активність ($I_{АОА}$)	2,66±0,08	2,08±0,13	2,2±0,06	2,76±0,07
Каталаза, мкмоль$H_2O_2 \cdot г^{-1} \cdot год^{-1}$	128,44±10,31	108,98±8,25	114,06±6,92	163,35±3,18*, **,***
Супероксиддисмутаза, од.акт.$\cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$	660,05±58,98	553,68±38,71*	645,09±47,24	734,89±66,89**
Глутатіонпероксидаза, мкмоль$GSH \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$	2,09±0,12	1,31±0,08*	2,6±0,10	2,36±0,09**
4-аміноантипірин, %	0,23±0,04	0,26±0,08	0,21±0,05	0,43±0,10*,**,***

свідчити про адаптивну реакцію крові, спрямовану на активацію системи антиоксидантного захисту клітин. При цьому зафіксовано збільшення у крові активності СОД і КАТ відносно алкоголізованих тварин.

При дослідженні вмісту ліпопротеїнів виявлено, що практично в усіх досліджуваних групах спостерігалось їх зниження – у групі алкоголізованих тварин за умов дії ІГТ – відносно групи щурів за умов впливу етанолу та контрольного значення, у групі за умов дії ІГТ – відносно контролю. Оскільки ліпопротеїни є основною транспортною формою жирів ендогенного походження та містять у своєму складі важливі енергетичні (НЕЖК) та пластичні речовини (холестерин, фосфоліпіди), можна зробити висновок, що підсумком вищеописаної метаболічної перебудови є збільшення внеску ліпідів у енергетику організму, спрямованої на збереження гомеостазу за умов гіпоксії [18].

Встановлено, що адаптація до ІГТ у інтактних щурів призвела до збільшення в крові активності СОД на 18,5 %, ГПО – на 57,8, КАТ – на 37,1 % відносно контролю при практично не зміненому щодо контрольних значень вмісті продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). У доповнення до ферментативних механізмів антиоксидантного захисту у крові, у адаптованих тварин активуються і неферментативні компоненти – $I_{АОА}$ збільшується на 17,6 %. Адитивність взаємодії ферментативних та неферментативних антиоксидантних систем забезпечує стійкість організму до дії етанолу.

Вплив 15%-го розчину етанолу впродовж 30 діб у гомогенатах печінки виявляється у зниженні активності СОД (на 16,1 %), ГПО (на 37,3 %) та достовірному підвищенні концентрації МДА та ДК, які відносно контрольного значення становлять 42,1 та 79,5 % відповідно (табл. 2).

При адаптації до ІГТ у печінці, на відміну від мозку, відстежені більш значні зміни активності ферментів – активність каталази збільшена на 27 % відносно контролю та на 50 % – відносно алкоголізованих тварин. Підвищення активності КАТ та ГПО у гомогенаті печінки алкоголізованих тварин з використанням ІГТ на тлі відсутності збільшення концентрації продуктів ПОЛ може мати захисний ефект.

Виявлене нами (табл.3) збільшення вмісту ДК та МДА в гомогенатах мозку щурів із хронічним впливом етанолу спричинене підвищенням вмісту активних метаболітів кисню внаслідок інтенсифікації в цих клітинах окисних процесів. Клітинам мозку властива висока чутливість до перекисних процесів, яка може бути зумовлена

нижчою, порівняно з іншими органами, активністю антиоксидантного захисту, високим вмістом субстратів, які легко піддаються окисненню (поліненасичені жирні кислоти, біогенні аміни тощо), високим споживанням кисню. Водночас відмічено достовірне зменшення активності важливого ферменту антиоксидантного захисту – каталази. Активність СОД за цих умов залишалася майже на рівні контролю. Інтегративний індекс антиоксидантної активності тканини мозку був знижений на 34,5 % відносно контролю. Також відзначали зниження на 16,5 % активності глутатіонпероксидази.

Застосування ІГТ у алкоголізованих тварин супроводжувалося зменшенням вмісту МДА на 25 % порівняно з моделлю впливу етанолу, хоча при цьому і перевищував на 12,2 % аналогічний показник у контролі. Водночас достовірно зменшилася (на 46,5 %), порівняно з тваринами з хронічним впливом етанолу, концентрація ДК. На тлі зазначених змін позитивним є достовірне підвищення індексу антиокисної активності, а також збільшення активності антиоксидантних ферментів СОД, ГПО та каталази відносно щурів за умов впливу етанолу, що свідчило про утворення в тканині мозку перекису водню та гідроперекисів ліпідів, які індукують збільшення активності цих ферментів. Отже, під дією ІГТ у тварин після 30-добового вживання етанолу спостерігалася чітка тенденція до нормалізації процесів ПОЛ у гомогенатах мозку.

Адаптація до імпульсного гіпоксичного тренування супроводжується збільшенням концентрації метаболітів NO на 25 % відносно алкоголізованих тварин, що, можливо, відбувається внаслідок посилення синтезу оксиду азоту або звільнення додаткового NO з депо. Наші результати узгоджуються з літературними даними, які вказують, що при адаптації до періодичної гіпоксії в організмі відбуваються процеси, які лежать в основі посилення продукування та депонування NO [7].

При вивченні вмісту екскретованого з сечею метаболіту антипірину – 4-аміноантипірину, було виявлено, що під впливом етанолу через 24 год відбувається пригнічення метаболізму амідопірину, що проявляється у зниженні екскреції 4-аміноантипірину на 8,7 %. При застосуванні ІГТ у алкоголізованих тварин виведення з сечею 4-аміноантипірину значною мірою посилювалося порівняно з контрольною групою та становило 0,43 % ± 0,07 % ($P<0,05$). Враховуючи достовірне посилення екскреції амінопохідного метаболіту амідопірину, можна стверджувати спроможність ІГТ виявляти індукуючий ефект відносно ферментів монооксигеназної системи печінки.

Дослідження стану перекисної резистентності еритроцитів як інтегративного показника

Таблиця 3. Зміни біохімічних показників у мозку довгосплячих щурів за умов впливу етанолу впродовж 30 діб і дії імпульсного гіпоксичного тренування (M±m, n=10)

Показники	Контроль	Етанол	Імпульсне гіпоксичне тренування	Етанол та імпульсне гіпоксичне тренування
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	1834,10±78,50	2744,61±86,45*	1821,19±90,37	2057,19±74,63*,**,***
Дієнові кон'югати, од.Е/г	2,0±0,08	2,7±0,12*	1,0±0,11*,**	1,07±0,07*,**
Загальна антиокисна активність (I_{AOA})	1,74±0,09	1,14±0,24*	2,15±0,12*,**	2,07±0,09*,**
Каталаза, мкмоль$H_2O_2 \cdot г^{-1} \cdot год^{-1}$	2,84±0,09	1,47±0,13*	2,09±0,11	2,24±0,12*,**
Супероксиддисмутаза, од.акт.$\cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$	663,53±58,98	627,25±84,52	681,21±59,73	795,32±76,27
Глутатіонпероксидаза, мкмоль$GSH \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$	1,88±0,07	1,57±0,09	1,18±0,08	2,6±0,11*,**,***

забезпеченості організму ендогенними антиоксидантами показали, що за умов впливу етанолу відбувається значне зменшення відсотка гемолізу еритроцитів. Така сама особливість простежується іншими авторами, які збільшення перекисної резистентності еритроцитів пов'язують із низьким вмістом ненасичених жирних кислот та холестеринозом мембран [10]. Застосування ІГТ сприяє нормалізації перекисної стійкості мембран еритроцитів.

Адаптація до ІГТ істотно не вплинула на вміст продуктів ПОЛ у всіх органах. Це свідчить про відсутність пошкоджуючих ефектів при обраному режимі адаптації.

ВИСНОВКИ

1. Вплив етанолу супроводжується порушенням у системі кисеньзалежних метаболічних реакцій, що специфічно проявляється у різних органах та системах.

2. Виявлені реципрокні зміни в утворенні продуктів оксиду азоту та утворенні активних форм кисню.

3. Проведені дослідження підтверджують доцільність використання в комплексному лікуванні алкогольної інтоксикації ІГТ, коригуючий ефект якого реалізується через активацію ферментних процесів біологічного окиснення та механізми формування кисневого і енергетичного гомеостазу при переході від нормоксії до гіпоксії та навпаки.

L.P.Kozak,O.I.Terletska, S.M.Kovalchuk

THE ROLE OF OXIDATIVE METABOLISM IN FORMING ADAPTIVE EFFECT UNDER ETHANOL INFLUENCE AND CORRECTIVE ACTION OF IMPULSE HYPOXIC TRAINING

The activities of lipid peroxidation and the antioxidative defence systems, the content of nitric oxide metabolites, an erythrocyte resistanse to peroxide hemolysis in rats exposed to ethanol and hypoxic training were studied. We also evaluated the detoxicant capacity of the liver by 4-aminoantipyrine clearance. It was established that an effect of ethanol was accompanied by the disturbances in the oxygen-dependent metabolic reactions if the liver in different organs and systems. The results have confirmed the expediency of using the hypoxic training in the complex treatment of the chronic alcohol intoxication.

Danylo Halytsky Lviv state medical university

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березовский В.Я. Роль індивідуальності в реакції на гіпоксію // Фізіол. журн. – 1975. – **21**, №3. – С. 371 – 376.
2. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. – М.: Медицина, 1985. – 224 с.
3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.
4. Елисеева О.П., Сирота Т.В., Федотчева Н.И. и др. Образование эндогенного кислорода гомогенатами печени и мозга крыс как возможный механизм ликвидации гипоксии клеток // Материалы Третьей Всерос. конф. "Гипоксия. Механизмы. Адаптация. Коррекция" – Москва, 2002. – С.44 – 45.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И.,Захария В.А., Западнюк Б.В Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: Вища шк., 1983. – 215 с.
6. Зезеров Е.Г. Биохимические механизмы острого и хронического действия этанола на организм человека (лекция) // Вопр. биологии, медицины и фармацевт. химии. – 1998. – №2. – С. 47 – 55.
7. Зенина Т.А., Голубева Л.Ю., Салтыкова В.А. и др. NO-зависимые механизмы адаптации к гипоксии // Изв. РАН. Сер. биол. – 1998. – №4. – С. 535 – 540.
8. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск: Беларусь, 2000. – Т.2. – 463 с.
9. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16 – 19.
10. Лапинский А.Г., Марачев А.Г. Модификация липидного состава и свойств эритроцитарных мембран у человека при хронической алкоголизации // IV Всесоюз. съезд патофизиологов: Тез. докл. – Москва, 1989. – С. 12 – 41.
11. Колчинская А.З. Механизмы действия интервальной гипоксической тренировки // Hyp. Med. J. – 1993. – **1**, №1. – P. 5 – 8.
12. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88 – 91.
13. Мартынюк В.Б., Ковальчук С.М., Тимочко М.Ф. и др. Индекс антиокислительной активности биологического материала // Лаб. дело. – 1991. – №3. – С. 19 – 22.
14. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Там же. – 1986. – №6. – С. 724 – 727.

15. Покровский А.А., Абраров А.А. К вопросу о перекисной резистентности эритроцитов // Вопр. питания. – 1964. – **23**. – С. 44 – 49.
16. Попов Т.А., Леоненко О.К. Метод оценки оксидаз печени // Гигиена и санитария. – 1977. – №9. – С.56 – 58.
17. Пшикова А. Ф., Шаов М. Т. Изменение напряжения кислорода в околомембранном пространстве нейронов коры мозга крыс под влиянием импульсной гипоксии и облепихи крушиновидной // Нур. Med. J. – 1997. – №2. – С. 13 – 16.
18. Стрелков Р.Б., Чижов А.Я. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. – Екатеринбург, 2001. – 398 с.
19. Тимирбулатов Р.А., Селезнев Е.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. –1981. – № 4. – С. 209 – 211.
20. Тимочко М.Ф., Єлісєєва О.П., Кобилінська Л.І., Тимочко І.Ф. Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних станах. – Львів, 1998. – 141 с.
21. Biophotonics and Coherent Systems. Proceedings of the 2nd Alexander Gurwitsch Conference and Additional Contributions / Editors: Lev Beloussov, Frits-Albert Popp, Vladimir Voeikov and Roeland Van Wijk. – Moscow: University press, 2000. – 460 p.
22. Green L.C., David A.W., Glogovski J. Analysis of nitrate and [^{15}N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131 – 138.
23. Kozak L.P., Aleksevich Ya. I., Terletskaya O.I. et al. A system of pro- and antioxidant balance during adaptation to periodical hypoxia under alcohol intoxication // Hyp. Med. J. – 2000. – № 3 – 4. – P. 34 – 37.
24. Tymochko M.F., Aleksevich Ja., Bobkov Ju., Kovalenko E. Oxygen balance under extreme conditions // Hyp. Med. J. – 1996. – **5**, № 3. – P. 8 – 12.
25. Tymochko M.F., Kobylinskaya L.I., Aleksevich Ja.I. Involvement of free radical-mediated reactions in oxygen homeostasis of the organism // Ibid. – 1998. – **6**, №4. – P. 154 – 159.

Львів. мед. ун-т ім. Данила Галицького

Матеріал надійшов до редакції 10.06.2002