

УДК 577.151.03+616.37:591.16:547.262+616-092.9

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОТОМСТВА, АЛКОГОЛИЗИРОВАННОГО В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Курч Н.М., Высокогорский В.Е.

ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Омск, e-mail: nkurch@mail.ru

В гомогенатах поджелудочной железы потомства, полученного от самок крыс, алкоголизованных в течение гестационного периода, исследовали состояние системы глутатиона в различные сроки постнатального развития (15, 30 и 60 суток). Обнаружено уменьшение содержания общих сульфгидрильных групп и глутатиона, а также снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сравнении с аналогичными показателями контрольной группы. Активность глутатион-S-трансферазы превышала контрольные значения во все сроки наблюдения. Выявленное изменение показателей системы глутатиона отражает сохраняющееся в постнатальном периоде нарушение клеточного редокс-потенциала и может рассматриваться как универсальный механизм клеточной защиты в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: пренатальная алкогольная интоксикация, окислительный стресс, система глутатиона

PANCREAS GLUTATHIONE SYSTEM OF POSTERITY ALCOHOLIZED IN PRENATAL PERIOD

Kurch N.M., Vysokogorskiy V.E.

Omsk State Medical Academy, Omsk, e-mail: nkurch@mail.ru

To female rats ethanol was intragastral injected (4g/kg of an animal weight) daily during all the gestation period. Control female rats received a saline solution. Posterity was killed within different terms of postnatal development (15, 30 and 60 days). In posterity pancreas homogenates glutathione system state was studied. Reduction of sulfhydryl groups, glutathione and decrease of glutathione peroxidase and glutathione reductase as compared with control group indices were found. Glutathione-S-transferase activity exceeded control values through all the observation terms. The revealed glutathione system indices change reflects remaining in postnatal period cell redox-potential disorder and may be considered as a universal preventive mechanism in terms of oxidative stress.

Keywords: prenatal alcohol intoxication, oxidative stress, the glutathione system

Одним из ведущих факторов в формировании основных метаболических нарушений при хронической алкогольной интоксикации является развитие окислительного стресса [3]. Окислительный стресс характеризуется дисбалансом между интенсивной продукцией свободных радикалов и депрессией антиоксидантных систем клетки. Накопление в клетках свободных радикалов может приводить к окислительной модификации молекул, повреждению клеточных структур и в итоге клеточной гибели. В этих условиях важным звеном в процессах инактивации свободных радикалов является система глутатиона, представленная глутатионом и глутатионзависимыми ферментами – глутатионпероксидазой, глутатион-S-трансферазой и глутатионредуктазой. Компоненты данной системы принимают участие не только в восстановлении супероксидрадикалов, перекисей и органических гидроперекисей, но и в обезвреживании высокореакционных вторичных метаболитов, образующихся в клетке при окислительном стрессе [7]. Поэтому истощение глутатионовой системы может приводить к серьезным цитотоксическим и деструктивным эффектам. В ряде работ показано, что алкогольная интоксикация приводит к нарушениям в системе глутати-

она, выражающимся в снижении пула восстановленного глутатиона [3], изменению активности глутатионзависимых ферментов [4].

Поджелудочная железа относится к органам наиболее чувствительным к воздействию алкогольной интоксикации. По данным Э.Р. Буклис [1], от 55 до 80% хронических панкреатитов имеют алкогольный генез. В основе деструктивных изменений при панкреатитах, по мнению ряда авторов, лежит развитие окислительного стресса, обусловленного довольно низкой активностью супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы поджелудочной железы [15]. Кроме того, глутатионсинтетические возможности в поджелудочной железе ниже, чем в печени и почках и при этом значительная часть глутатиона необходима для синтеза ферментов экзокриноцитами [13].

При внутриутробной интоксикации алкоголем, по данным G.I. Henderson [12], эффективного обезвреживания этанола и ацетальдегида, поступившего из кровеносного русла материнского организма в организм плода, не происходит ввиду крайне низкой активности алкогольдегидрогеназы, а также микросомальной этанолокисляющей системы, достигающей зрелости только в постнатальном периоде развития. В связи

с этим, у плода наиболее ярко проявляются цитотоксический, мутагенный, тератогенный эффекты алкогольной интоксикации. Эти эффекты проявляются в различных тканях плода, таких как мозг, печень, мышечные ткани и др. [14]. Ранее нами получены данные, свидетельствующие о нарушении метаболизма углеводов-белковых комплексов в поджелудочной железе пренатально алкоголизируемого потомства крыс [8]. Одним из ведущих факторов в развитии подобных изменений, по-видимому, является окислительный стресс. Данные о роли системы глутатиона в механизме, лежащем в основе повреждающего действия пренатальной алкогольной интоксикации на поджелудочную железу потомства, практически отсутствуют в литературе.

Цель: оценить состояние системы глутатиона поджелудочной железы потомства крыс при воздействии пренатальной алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования

Самок неинбредных крыс подвергали алкогольной интоксикации весь период гестации путем интрагастрального введения этанола в дозе 4 г/кг массы животных. Потомство, полученное от этих самок, составило группу «Алкоголь». Другая группа самок получала эквивалентное количество физиологического раствора. Потомство этих самок составило группу «Контроль». Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом в возрасте 15, 30 и 60 суток. Для биохимического исследования использовали супернатанты и гомогенаты поджелудочной железы.

Содержание сульфгидрильных групп белков и восстановленного глутатиона в гомогенатах поджелудочной железы определяли с использованием реактива Элмана [10]. Активность глутатион-S-трансферазы оценивали по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом [11]. Активность глутатионредуктазы определяли методом, основанным на измерении скорости уменьшения оптической плотности при 340 нм, обусловленного окислением НАДФ-H [2], активность глутатионпероксидазы – по реакции взаимодействия восстановленного глутатиона с гидроперекисью трет-бутила [9].

В работе анализировали выборку объемом 280 наблюдений и использовали следующие статистические методы: проверка нормальности распределения коли-

чественных признаков, непараметрический критерий Манна-Уитни. Выборочные параметры, приводимые далее в таблицах, имеют следующие обозначения: Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль, *p* – достигнутый уровень значимости. Критическое значение уровня значимости принималось равным 0,05. Анализ данных проводили с помощью программы STATISTICA-6.

Результаты исследования и их обсуждение

У потомства крыс, перенесшего пренатальную алкогольную интоксикацию, активность глутатионпероксидазы поджелудочной железы в возрасте 15 суток статистически значимо снижена в 1,8 раза (*p* = 0,021) относительно контрольных значений (табл. 1).

Таблица 1

Активность глутатионпероксидазы поджелудочной железы, мкмоль/мин·г белка, Me(Q1-Q3)

Группы	Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	0,49 (0,36–0,60)	0,41 (0,27–0,59)	0,84 (0,40–0,77)
Алкоголь	0,27 (0,15–0,38) pU = 0,021	0,19 (0,11–0,44) pU = 0,043	0,42 (0,29–0,72) pU = 0,032

При достижении потомством алкоголизируемых самок 30-суточного возраста снижение активности фермента продолжалось и разница со значениями группы «Контроль» достигала 2,2 раза (*p* = 0,043). В возрасте 60 суток активность глутатионпероксидазы существенно повышалась, но сохранялось более низкое значение данного показателя по сравнению со значениями контрольной группы (в 2,0 раза, *p* = 0,032).

Несколько иная картина наблюдалась при исследовании активности глутатион-S-трансферазы в поджелудочной железе животных, алкоголизируемых в пренатальном периоде. В раннем постнатальном периоде отмечалось увеличение активности фермента в 2,3 раза (*p* = 0,001) в сравнении с данным показателем в группе «Контроль» (табл. 2).

Таблица 2

Активность глутатион-S-трансферазы поджелудочной железы, моль/мин·г белка, Me(Q1-Q3)

Группы	Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	100,25 (84,21–105,87)	83,83 (48,36–101,39)	72,62 (62,09–86,41)
Алкоголь	225,69 (186,72–247,76) pU = 0,001	171,04 (118,13–208,39) pU = 0,001	141,80 (93,44–164,85) pU = 0,001

В возрасте 30 суток активность глутатион-S-трансферазы имела тенденцию к снижению, однако статистически значимо превышала контрольные значения в 2 раза ($p = 0,001$), в возрасте 60 суток – в 1,9 раза ($p = 0,001$).

Поддержание достаточно высокого уровня восстановленного глутатиона путем восстановления его дисульфидной формы обеспечивается глутатионредуктазой. Пренатальная алкогольная интоксикация привела к снижению активности глутатионредуктазы в поджелудочной железе в возрасте 15 суток в 1,7 раза ($p = 0,002$) (табл. 3).

По мере взросления потомства отмечался рост активности фермента аналогично контрольной группе. В возрасте

30 суток активность глутатионредуктазы статистически значимо ниже контрольных значений в 1,5 раза ($p = 0,021$), в возрасте 60 суток – в 1,3 раза ($p = 0,043$). Согласно полученным данным, регенерации глутатиона в поджелудочной железе у пренатально алкоголизированного потомства на должном уровне не происходило. Наиболее вероятным причинным фактором этого явления может быть недостаточная регенерация НАДФ в пентозофосфатном пути. Исследование активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у пренатально алкоголизированного потомства крыс выявило снижение данного показателя в возрасте 15 суток в 2,2 раза ($p = 0,019$) относительно контрольных значений (табл. 4).

Таблица 3

Активность глутатионредуктазы поджелудочной железы, мкмоль/мин·г белка, Me(Q1-Q3)

Группы	Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	102,78 (72,45–129,65)	157,18 (131,29–192,33)	186,77 (146,37–283,71)
Алкоголь	61,62 (44,19–69,13) $pU = 0,002$	107,49 (84,06–125,13) $pU = 0,021$	138,83 (93,51–158,85) $pU = 0,043$

Таблица 4

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы поджелудочной железы, мкмоль/мин·г белка, Me(Q1-Q3)

Группы	Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	10,11 (9,81–10,24)	18,67 (16,88–25,02)	24,24 (21,06–26,06)
Алкоголь	4,7 (3,98–5,06) $pU = 0,019$	9,79 (7,06–11,15) $pU = 0,001$	8,09 (6,78–12,03) $pU = 0,001$

В дальнейшем сохранялось статистически значимое уменьшение активности фермента в возрасте 30 суток в 1,9 раза ($p = 0,001$), в возрасте 60 суток – в 3 раза ($p = 0,001$) в сравнении с аналогичным показателем в группе «Контроль».

Выявленные изменения активности ферментов системы глутатиона у пренатально алкоголизированных животных отразились на содержании в ткани поджелудочной железы белковых и небелковых сульфгидрильных групп. В гомогенатах поджелудочной железы потомства, перенесшего пренатальную алкогольную интоксикацию, содержание белковых сульфгидрильных групп в возрасте 15 суток не имело статистически

значимых отличий от контрольных значений (табл. 5).

В дальнейшем, в возрасте 30 суток наблюдалось снижение содержания доступных тиоловых групп белков в 1,54 раза ($p = 0,001$) в сравнении с контрольными значениями, в возрасте 60 суток – в 1,46 раза ($p = 0,001$).

У потомства крыс, перенесших внутриутробное воздействие алкогольной интоксикации, наблюдалось статистически значимое уменьшение содержания небелковых тиоловых групп в поджелудочной железе в возрасте 30 суток в 2 раза ($p = 0,001$), в возрасте 60 суток – в 1,5 раза ($p = 0,001$).

Таблица 5

Содержание сульфгидрильных групп белков и восстановленного глутатиона поджелудочной железы, мкмоль/г белка, Me(Q1-Q3)

Показатель	Группы	Возраст животных		
		15 суток	30 суток	60 суток
Сульфгидрильные группы белков, мкмоль/г белка	Контроль	29,51 (20,85–31,64)	31,29 (24,78–35,28)	27,69 (22,85–33,33)
	Алкоголь	24,92 (21,30–26,91) pU = 0,249	20,34 (19,36–21,42) pU = 0,001	18,96 (15,29–21,32) pU = 0,001
Небелковые сульфгидрильные группы, мкмоль/г белка	Контроль	19,85 (19,29–26,90)	22,35 (15,74–23,85)	22,73 (18,27–22,78)
	Алкоголь	18,42 (14,85–23,85) pU = 0,219	11,12 (9,15–13,59) pU = 0,001	14,72 (10,26–17,52) pU = 0,001

Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии пренатальной алкогольной интоксикации на состояние глутатионовой системы поджелудочной железы потомства, сохраняющиеся на протяжении длительного периода постнатального онтогенеза – до достижения животными половой зрелости. Очевидно, что изменения функционирования тиолдисульфидной системы являются реакцией на окислительный стресс. Установленное нами снижение активности глутатионпероксидазы во все сроки эксперимента является неблагоприятным фактором, способствующим падению эффективности обезвреживания пероксидных радикалов, что может приводить к повреждению клеточных структур.

По мнению Л.С. Колесниченко и соавт. [6], уменьшение активности глутатионпероксидазы можно рассматривать как проявление минимализации адаптивных процессов организма в условиях окислительного стресса. При этом активность глутатион-S-трансферазы в поджелудочной железе пренатально алкоголизированных крыс имела более высокие значения, чем в контрольной группе. Синтез данного фермента, обладающего наиболее широкой субстратной специфичностью среди антиоксидантных ферментов, индуцируется под действием продуктов свободнорадикального окисления. Кроме того, у крыс отмечается более высокий индекс экспрессии глутатион-S-трансферазы в ответ на индукторы, чем у других млекопитающих (мышь, человек) [5]. Повышенная скорость потребления восстановленного глутатиона в реакциях обезвреживания свободнорадикальных продуктов отразилась в уменьшении содержания в поджелудочной железе алкоголизированных животных белковых и небелковых сульфгидрильных групп. Определенный вклад в дефицит тиолсодержащих соединений вносило снижение активности глу-

татионредуктазы, участвующей в процессах регенерации глутатиона и зависящей от наличия восстановленных форм НАДФ. Основным поставщиком восстановленного НАДФ для глутатионредуктазы является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа пентозофосфатного пути, активность которой в результате пренатальной алкогольной интоксикации существенно снижалась во все сроки наблюдения.

Таким образом, выявленные в результате проведенного исследования разнонаправленные изменения активности глутатионзависимых антиоксидантных ферментов поджелудочной железы могут свидетельствовать о дестабилизации системы глутатиона, что может способствовать нарушению процессов адаптации в ответ на развитие окислительного стресса в результате пренатальной алкогольной интоксикации.

Список литературы

1. Буклис Э.Р. Современная классификация хронического панкреатита // Клинич. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2003. – №3. – С. 8–12.
2. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслягина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. – 1990. – №8. – С. 19–21.
3. Высокогорский В.Е., Ефременко Е.С., Грицаева И.Е. Характеристика системы глутатиона при алкогольном абстинентном синдроме // Наркология. – 2006. – №8. – С. 59–61.
4. Нарушение активности ферментов метаболизма глутатиона в печени пренатально алкоголизированных крыс / В.Е. Высокогорский, Н.Л. Самусева, Н.М. Курч, А.В. Индутный // Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия: сборник научных трудов всероссийской конференции «Проблемы медицинской энзимологии». – М., 2002. – С. 56–57.
5. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // Кислород и антиоксиданты. – 2009. – №1. – С. 3–64.
6. Колесниченко Л.С., Баторова Т.М. Динамика показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы глутатиона мышей при воздействии препаратов железа // Бюллетень ВСНИ СО РАМН. – 2011. – №1. – С. 227–230.

7. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. – №3. – С. 255–277.

8. Курч Н.М., Высокогорский В.Е. Нарушение метаболизма углеводсодержащих компонентов соединительной ткани поджелудочной железы при моделировании пренатальной алкогольной интоксикации // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. – 2010. – №11. – С. 52–56.

9. Черданцев Д.В., Винник Ю.С., Каспаров Э.В. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите. – Новосибирск, 2002. – 147 с.

10. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. – Grune & Stratton. Orlando, 1990. – pp. 131–134.

11. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathione-S-transferases. The first step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974. – no. 249(22). – pp. 7130–7139.

12. Henderson G.I. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus // *Frontiers in Bioscience*. – 1999. – no. 4. – pp. 541–550.

13. Neuschwander-Tetri B.A., Presti M.E., Wells L.D. Glutathione synthesis in the exocrine pancreas // *Pancreas*. – 1997. – no. 14(4). – pp. 342–349.

14. Ornoy A., Ergaz Z. Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment // *Int. J. Environ. Res. Public. Health*. – 2010. – no. 7(2). – pp. 364–379.

15. Rasilainen S., Nieminen J.M., Levonen A.L., Otonkoski T., Lapatto R. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – no. 63(7). – pp. 1297–1304.

References

1. Buklis E.R. // *Clinical Prospects of gastroenterology, hepatology*, 2003, no. 3, pp. 8–12.

2. Vlasova S.N., Shabunina E.I., Pereslyagina I.A. // *Lab. delo*, 1990, no.8, pp. 19–21.

3. Vysokogorskiy V.E., Efremenko E.S., Gritsaeva I.E. // *Narcology*, 2006, no. 8, pp. 59–61.

4. Vysokogorskiy V.E., Samuseva N.L., Kurch N.M., Indutny A.V. // *Sbornic nauchnih trudov Vserossiyskoy konferentsii «Problemy meditsinskoj enzimologii» «Sovremennye tekhnologii laboratornoy diagnostiki novogo stoletiya»* (Proc. of the

All-Russian Conference «Problems of medical enzymology» «Modern technologies of laboratory diagnosis of the new century»). Moscow, 2002, pp. 56–57.

5. Zenkov N.K., Menshchikova E.B. // *Oxygen and anti-oxidants*, 2009, no.1, pp. 3–64.

6. Kolesnichenko L.S., Batorova T.M. // *Bulletin of the ESSC SB RAMS*, 2011, no.1, pp. 227–230.

7. Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. // *Biomed. himiya*, 2009, no. 3, pp. 255–277.

8. Kurch N.M., Vysokogorskiy V.E. // *Problems of Biology, Honey. and Pharm. Chemistry*, 2010, no.11, pp. 52–56.

9. Cherdantsev D.V., Vinnik Y.S., Kasparov E.V. *Diagnosis and treatment of oxidative stress in acute pancreatitis* (Diagnostika i lechenie oksislitel'nogo stressa pri ostrom pankreatite). Novosibirsk, 2002. 147 p.

10. Beutler E. *Grune & Stratton. Orlando.*, 1990, pp. 131–134.

11. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. // *J. Biol. Chem.*, 1974, no. 249(22), pp. 7130–7139.

12. Henderson G.I. // *Frontiers in Bioscience*, 1999, no.4, pp. 541–550.

13. Neuschwander-Tetri B.A., Presti M.E., Wells L.D. // *Pancreas*, 1997, no.14(4), pp. 342–349.

14. Ornoy A., Ergaz Z. // *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, 2010, no.7(2), pp. 364–379.

15. Rasilainen S., Nieminen J.M., Levonen A.L., Otonkoski T., Lapatto R. // *Biochem. Pharmacol.*, 2002, no.63(7), pp. 1297–1304.

Рецензенты:

Камилов Ф.Ф., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, г. Уфа;

Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 30.03.2012.