

УДК 616.155.1-076.5 + 615.099.036.11-053.6:547.262

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПОДРОСТКОВ ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

¹Щеглова Е.Л., ²Высокогорский В.Е., ¹Индутный А.В., ¹Ершов А.В.,
³Орлова Н.В., ³Пискарева Н.И.

¹ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава РФ,
Омск, e-mail: eleon_74@mail.ru;

²ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Омск;

³БУЗОО «Областная детская клиническая больница», Омск

Проведен хемилюминесцентный анализ гемолизатов эритроцитов крови подростков (12–15 лет) с диагнозом: острое отравление алкоголем. Выявлено увеличение интенсивности свободнорадикального окисления у подростков при острой алкогольной интоксикации, светосумма хемилюминесценции увеличена в 3,6 раза, прежде всего за счёт спонтанной светимости и максимальной светимости. Повышение спонтанной светимости в 2 раза ($p < 0,006$) отражает высокий исходный уровень свободных радикалов даже без индукции хемилюминесценции. Повышение максимальной светимости и вспышки свидетельствует о существенном накоплении в крови подростков с острым отравлением алкоголем субстратов свободнорадикального окисления, что приводит к повышенному образованию свободных радикалов после добавления индуктора хемилюминесценции. Установлены отличия показателей хемилюминесценции в зависимости от скорости выведения этанола из организма, так, в группе с преобладанием этанола в крови светосумма увеличена в 3,8 раза в отличие от показателей группы подростков, у которых концентрация этанола преобладает в моче. Показатели светосуммы у подростков с преобладанием этанола в моче также увеличены, но меньше чем, в с группе сравнения, другие показатели хемилюминесценции существенно не отличаются.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, подростки, свободнорадикальное окисление, хемилюминесценция

ERYTHROCYTES CHEMILUMINESCENCE IN ADOLESCENTS IN ACUTE ALCOHOLIC INTOXICATION

¹Scheglova E.L., ²Vysokogorskiy V.E., ¹Indutnyy A.V., ¹Ershov A.V.,
³Orlova N.V., ³Piskareva N.I.

¹GBOU VPO «Omsk State Medical Academy» Minzdrava RF, Omsk, e-mail: eleon_74@mail.ru;

²FGBOU VPO «Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin», Omsk;

³BUZOO «Omsk regional children hospital», Omsk

An analysis of chemiluminescent haemolysates erythrocytes in adolescents (12–15 years) with a diagnosis of acute alcohol poisoning has been performed. There was revealed an increase in the intensity of free radical oxidation in adolescents with acute alcohol intoxication, that chemiluminescence sum was increased 3,6 times as many, primarily due to spontaneous luminosity and maximum luminosity. 2 times ($p < 0,006$) spontaneous luminosity increase reflects the high initial level of free radicals even without inducing chemiluminescence. Increase of the maximum luminosity and outbreaks indicate a significant accumulation of free radical oxidation substrates in the blood of adolescents with acute alcohol poisoning, which leads to increased formation of free radicals after adding the chemiluminescence inducer. The differences in chemiluminescence parameters depending upon the speed of ethanol removing from the body; thus a group with a predominance of blood ethanol the sum was increased by 3,8 times, as oppose to parameters of the adolescents group whose ethanol concentration prevails in the urine. Setosum parameters in adolescents with a predominance of ethanol in urine are also increased, but to a lesser extent, compared with the comparison group, other parameters of chemiluminescence do not differ significantly.

Keywords: Alcoholic intoxication, adolescents, free radical oxidation, chemiluminescence

Увеличение в последние годы случаев острого алкогольного отравления наблюдается среди взрослого населения и среди подростков. По данным психо-неврологических диспансеров [4] число детей до 14 лет с «вредными последствиями употребления алкоголя» за 10 лет с 1993 по 2012 гг. выросло в 5,6 раза, а подростков 15–17 лет – в 3,6 раза.

Одним из повреждающих факторов интоксикации этиловым алкоголем является активация свободнорадикальных процессов

[5]. Развитие окислительного стресса наблюдается при острой и при хронической алкогольной интоксикации [11]. Окисление этанола сопровождается повышенным образованием активных форм кислорода, которые оказывают мощное повреждающее действие на мембраны клеток и внутриклеточные компоненты.

Активация свободнорадикальных процессов наряду с мобилизацией антиоксидантных резервов печени установлена при острой экспериментальной алкогольной

интоксикации [3]. Аналогичные изменения параметров хемилюминесценции наблюдались и при хронической алкогольной интоксикации, что сопровождалось повышением активности ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы и каталазы, как в печени, так и в сыворотке крови [1].

С другой стороны, имеются данные об использовании алкоголя как антиоксиданта, нейтрализующего ОН-радикалы, для профилактики реперфузионных поражений сердца и повреждающего действия ионизирующей радиации [8].

Учитывая увеличение случаев алкогольных отравлений лиц молодого возраста и роль СРО, целью данного исследования явилось выяснение интенсивности свободнорадикальных процессов при острой алкогольной интоксикации у подростков.

Материалы и методы исследования

Параметры хемилюминесценции определяли в гемолизатах эритроцитов крови подростков (12–15 лет) с диагнозом: острое отравление алкоголем (группа ОАИ) и практически здоровых пациентов аналогичной возрастной категории (группа сравнения проходивших диспансеризацию). Исследования проведены в Областной детской клинической больнице и Городской детской клинической больнице № 2 им. В.П. Бисяриной г. Омска.

Интенсивность свечения определяли на хемилюминомере ХЛ-003 (Уфа), в соответствии с методическими указаниями [6]. Хемилюминесценцию индуцировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа. Запись свечения осуществляли в течение 10 мин, регистрировали значение таких параметров, как спонтанная светимость (у.е.), амплитуда вспышки (у.е.), и светосумма (у.е.×мин).

Наличие алкогольной интоксикации у детей подтверждено обнаружением этанола в крови 1,6 (0,4–2,9) г/л и в моче 1,8 (0,3–2,7) г/л.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью компьютерной программы Statistica 6. В качестве основных характеристик опи-

сательной статистики при распределении, отличающемся от нормального, использовали медиану (Me), нижний и верхний квартили (P_{25} – P_{75}). Оценку статистической значимости различий проводили с использованием непараметрических критериев Манна – Уитни для двух независимых выборок (U). Критический уровень значимости при проверке нулевых гипотез был принят на уровне $p = 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При определении параметров хемилюминесценции гемолизатов эритроцитов крови выявлено увеличение интенсивности свободнорадикального окисления у подростков при острой алкогольной интоксикации, так как светосумма хемилюминесценции повышена в 3,6 раза ($p < 0,001$) при существенном увеличении всех других показателей свечения. В 2 раза повышена спонтанная светимость ($p < 0,006$), отражающая исходный уровень свободных радикалов без индукции хемилюминесценции. Повышение максимальной светимости и вспышки свидетельствует о существенном накоплении в крови подростков с ОАИ субстратов свободнорадикального окисления, что приводит к повышенному образованию свободных радикалов после добавления индуктора хемилюминесценции.

Для выяснения зависимости интенсивности хемилюминесценции от скорости снижения концентрации этанола в крови путем выведения его из организма в неизменном виде рассчитано соотношение содержания этанола в крови к его уровню в моче – коэффициент элиминации неметаболизированного этанола (КЭНЭ). В результате выделена подгруппа ОАИ с КЭНЭ $> 1,0$ с повышенным уровнем этанола в крови и подгруппа ОАИ с КЭНЭ $< 1,0$, характеризующаяся преобладанием концентрации этанола в моче.

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции крови при острой алкогольной интоксикации подростков, Me (P_{25} – P_{75})

Показатели	Контрольная группа (n = 50)	Группа ОАИ (n = 33)
Светосумма (у.е.*мин)	1,88 (0,81–2,23)	6,80 (4,39–9,45) $p < 0,001$
Спонтанная светимость (у.е.)	0,30 (0,26–0,45)	0,60 (0,25–0,90) $p = 0,006$
Максимальная светимость (у.е.)	0,65 (0,37–1,14)	1,01 (0,79–2,17) $p = 0,001$
Вспышка (у.е.)	0,82 (0,42–1,03)	0,97 (0,73–1,38) $p = 0,009$

Примечания: Me – медиана, P_{25} – нижний квартиль, P_{75} – верхний квартиль, n – число наблюдений; p – уровень статистической значимости различий в сравнении с контрольной группой по критерию U; у.е. – условные единицы свечения.

Таблица 2

Показатели хемилюминесценции крови на разных этапах острой алкогольной интоксикации подростков, Me (P_{25} – P_{75})

Показатели	Контрольная группа ($n = 50$)	Группа ОАИ, КЭНЭ > 1 ($n = 18$)	Группа ОАИ, КЭНЭ < 1 ($n = 15$)
Светосумма (у.е.*мин)	1,88 (0,81–2,23)	7,15 (4,39–11,55) $p = 0,000001$	5,59 (2,39–8,25) $p = 0,000006$
Спонтанная светимость (у.е.)	0,30 (0,26–0,45)	0,60 (0,29–0,87) $p = 0,005$	0,33 (0,19–0,90) $p = 0,15$
Максимальная светимость (у.е.)	0,65 (0,37–1,14)	1,07 (0,75–2,17) $p = 0,0027$	0,99 (0,86–1,10) $p = 0,046$
Вспышка (у.е.)	0,82 (0,42–1,03)	0,84 (0,67–1,31) $p = 0,26$	1,07 (0,80–1,38) $p = 0,002$

Примечания: Me – медиана, P_{25} – нижний квартиль, P_{75} – верхний квартиль, n – число наблюдений; p – уровень статистической значимости различий в сравнении с контрольной группой по критерию U; у.е. – условные единицы свечения.

При сравнении параметров хемилюминесценции в подгруппах ОАИ с различным коэффициентом элиминации обнаружено, что активация свободнорадикальных процессов в разной степени выражена в исследуемых подгруппах. Если в подгруппе с КЭНЭ > 1 светосумма хемилюминесценции эритроцитов увеличена в 3,8 раза, то в подгруппе с преобладанием этанола в моче (КЭНЭ < 1) – только в 3,0 раза, что может указывать на снижение образования перекисных радикалов. Особенно следует отметить существенные различия показателя спонтанной светимости, который значительно увеличен в подгруппе с преобладанием этанола в крови над его концентрацией в моче (КЭНЭ > 1), а в подгруппе с более низким содержанием этанола в крови (КЭНЭ < 1) спонтанная светимость не отличалась от данных контрольной группы, что указывает на нормализацию содержания свободных радикалов в крови. Однако в этой подгруппе несколько увеличена амплитуда вспышки, характеризующей повышенную способность липидов к переоислению, а в подгруппе с КЭНЭ > 1 интенсивность вспышки не отличалась от данных контрольной группы. Таким образом, несмотря на известные свойства этанола как ловушки свободных радикалов, алкогольная интоксикация вызывает активацию свободнорадикального окисления, вероятно, из-за недостаточной активности системы антиоксидантной защиты, а увеличение скорости ренального пути элиминации этанола сопровождается снижением интенсивности хемилюминесценции.

Заключение

Полученные результаты подтверждают данные литературы об активации свободнорадикального окисления при алкоголь-

ной интоксикации, полученные ранее при клинических наблюдениях [2] и экспериментальных исследованиях [3, 2]. Однако результаты исследования гемолизатов эритроцитов при алкогольной интоксикации подростков отличаются большей выраженностью, а интенсивность свободнорадикальных процессов зависит от скорости выведения неметаболизированного этанола (не подвергнувшегося биотрансформации) с мочой. Несмотря на то, что этанол является ловушкой свободных радикалов и положительные клинические эффекты его использования при повреждающем действии ионизирующей радиации, при алкогольной интоксикации проявляются прооксидантные эффекты даже при кратковременном, но токсическом воздействии.

Активация свободнорадикальных процессов при алкогольной интоксикации может быть вызвана как нарушением процессов окисления, повышенным образованием активных форм кислорода, так и недостаточностью антиоксидантной системы. Окисление этанола с участием изоформ цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) способствует образованию активных форм кислорода. Кроме того, интенсивное образование восстановленных форм никотинамидадениндинуклеотида (НАД·Н) при алкогольной интоксикации и активация митохондриального метаболизма может вызывать образование супероксиданиона как побочного продукта [10]. Значительную роль в развитии окислительного стресса при алкогольной интоксикации могут играть нарушения компонентов антиоксидантной защиты. Несмотря на наблюдаемое многими авторами повышение активности СОД и каталазы в крови [1], потребление алкоголя приводит к снижению в печени активности

глутатионпероксидазы и уровня глутатиона [7, 9]. Этанол-индуцированное повреждение клеток печени проявляется в нарушениях различных митохондриальных компонентов-белков, липидов и особенно митохондриальной ДНК. По данным Mansouri A. и соавт. (1999), острая интоксикация этанолом вызывает у мышей в течение нескольких часов потерю 50% митохондриальной ДНК, что обусловлено, по мнению авторов, развитием окислительного стресса [12]. Таким образом, наблюдаемые нами изменения параметров хемилюминесценции, свидетельствующие об активации свободнорадикальных процессов в организме подростков, указывают на значительные нарушения окислительных процессов и обосновывают необходимость эффективной метаболической коррекции.

Список литературы

1. Аллекрад Х. Регуляция свободнорадикального гомеостаза при хронической алкогольной интоксикации у крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Воронеж, 2012. – 24 с.
2. Ефременко Е.С., Высокогорский В.Е., Свободно-радикальное окисление при развитии алкогольной абстиненции // Омский научный вестник. – 2008. – № 1 (65). – С. 53–56.
3. Жукова О.Ю., Высокогорский В.Е. Влияние острой алкогольной интоксикации на хемилюминесценцию митохондрий печени при экспериментальном сахарном диабете // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 10. – С. 54–56.
4. Михайлова Ю.В., Абрамов А.Ю., Цыбульская И.С., Шикина И.Б., Халиуллин Н.И., Низамова Э.Р. Наркотизация детей, подростков и молодежи России // Социальные аспекты здоровья населения. – 2014. – Т. 37, № 3. – С. 10.
5. Овчинникова Л.Н., Горкин В.З. Об особенностях перекисного окисления липидов при алкогольной интоксикации // Вопросы мед. химии.-1989.-вып.5, т. 35.- С.86-90.
6. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А., Хемилюминисцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине. – Уфа, 1998. – 90 с.
7. Bailey S.M. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver / Bailey S.M., Patel V.B., Young T.A., Asayama K., Cunningham C.C. // Alcohol Clin. Exp Res. – 2001. – № 25. – P. 726–733.
8. Ewing D., Walton H.L. Do ·OH scavenger secondary radicals protect by competing with oxygen for cellular target sites? // Radiat. Res. – 1991. – Vol. 128. – № 1. – P. 29–36.
9. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. // Semin Liver Dis. – 1998. – № 18. – P. 389–401.
10. Hoek J.B., Cahill A., Pastorino J.G. / Alcohol and Mitochondria: A Dysfunctional Relationship // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 122, № 7. – P. 2049–2063.

11. Koch O. Alcohol-induced oxidative stress in rat liver / O. Koch [et al.] // Xenobiotica. – 1991. – Vol. 21, № 8. – P. 1077–1084.
12. Mansouri A. An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice / Mansouri A., Gaou I., De Kerguenec C., Amsellem S., Haouzi D., Berson A., Moreau A., Feldmann G., Letteron P., Pessayre D., Fromenty B. // Gastroenterology. – 1999, № 117. – P. 181–190.

References

1. Allekrad X. *Reguljacija svobodnoradikal'nogo gomeostaza pri hronicheskoj alkohol'noj intoksikacii u krysv: Avtoref. dis. kand. biol. nauk. Voronezh*, 2012, 24 p.
2. Efremenko E.S., Vysokogorskiy V.E., *Omskiy nauchnyj vestnik*, 2008, no.65, pp. 53–56.
3. Zhukova O.Ju., *Uspеhi sovremennogo estestvoznaniya*, 2005, no. 10, pp. 54–56.
4. Mikhaylova Ju.V., Abramov A.Ju., Cybul'skaya I.S., Shikina I.B., Haliullin N.I., Nizamova Je.R. *Social'nye aspekty zdorov'ja naseleniya*, 2014, Vol. 37, no. 3. pp. 10.
5. Ovchinnikova L. N. Gorkin V.Z. *Voprosy med.khimii*, 1989, vyp.5, Vol. 35, pp. 86–90.
6. Farhutdinov R.R., Lihovskih V.A., *Hemiljuminiscentnye metody issledovaniya svobodnoradikal'nogo okisleniya v biologii i medicine* [Hemilyuminiscentny methods of research of free radical oxidation in biology and medicine]. Ufa, 1998, 90 p.
7. Bailey S.M. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver / Bailey S.M., Patel V.B., Young T.A., Asayama K., Cunningham C.C. // *Alcohol Clin. Exp Res.* 2001. no. 25. pp. 726–733.
8. Ewing D., Walton H.L. Do ·OH scavenger secondary radicals protect by competing with oxygen for cellular target sites? // *Radiat. Res.* 1991. Vol. 128. – no. 1. – P. 29–36.
9. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. // *Semin Liver Dis.* – 1998. – no. 18. – P. 389–401.
10. Hoek J.B., Cahill A., Pastorino J.G. / *Alcohol and Mitochondria: A Dysfunctional Relationship* // *Gastroenterology.* – 2002. – Vol. 122, № 7. – P. 2049–2063.
11. Koch O. Alcohol-induced oxidative stress in rat liver / O. Koch [et al.] // *Xenobiotica.* – 1991. – Vol. 21, no. 8. – P. 1077–1084.
12. Mansouri A. An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice / Mansouri A., Gaou I., De Kerguenec C., Amsellem S., Haouzi D., Berson A., Moreau A., Feldmann G., Letteron P., Pessayre D., Fromenty B. // *Gastroenterology.* – 1999, no. 117. – P. 181–190.

Рецензенты:

Конвай В.Д., д.м.н., профессор кафедры химии, ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», г. Омск;

Степанова И.П., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой химии, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Омск.

Работа поступила в редакцию 12.02.2015.