

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

На правах рукописи

БЕРБЕРИДИ ХРИСТИНА ПАНАЕТОВНА

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ НА ФОНЕ
ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И
ВОЗМОЖНОСТИ ИХ КОРРЕКЦИИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

1.5.4. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Быков Илья Михайлович

Краснодар – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Основы патобиохимии сахарного диабета	13
1.1.1. Механизм индуцированной диабетом продукции активных форм кислорода и окислительного стресса	18
1.1.2. Взаимосвязь между окислительным стрессом и воспалением	21
1.2. Патобиохимические изменения при острой и хронической алкогольной интоксикации	25
1.2.1. Метаболизм алкоголя в печени	26
1.2.2. Влияние алкоголя на метаболизм липидов	29
1.2.3. Влияние алкоголя на метаболизм углеводов	32
1.3. Особенности метаболических изменений при сочетанном течении сахарного диабета и алкогольной интоксикации	33
Глава 2. Материалы и методы исследования	38
2.1. Дизайн исследования (общая характеристика групп испытуемых лабораторных животных)	38
2.2. Подготовка биологического материала к исследованиям	40
2.3. Биохимические методы исследования	42
2.3.1. Определение функционального состояния антиоксидантно-прооксидантной системы	42
2.3.2. Определение маркеров повреждения печени	45
2.3.3. Определение показателей углеводного и липидного обмена	45
2.3.4. Определение маркеров эндотоксикоза	45
2.3.5. Определение функционального состояния митохондрий печени	46
2.4. Статистический анализ результатов исследования	47

Глава 3. Особенности развития аллоксанового диабета	
на фоне хронической алкогольной интоксикации у крыс	49
3.1. Изменение обмена веществ у животных с экспериментальной моделью аллоксанового диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации	50
3.2. Изменение маркеров окислительного стресса у животных с экспериментальной моделью аллоксанового диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации	53
Глава 4. Возможности коррекции окислительного стресса, развивающегося на фоне хронической алкогольной интоксикации у крыс	62
4.1. Влияние серосодержащих гепатопротекторов на показатели цитолитического синдрома и обмена веществ у животных с хронической алкогольной интоксикацией	63
4.2. Влияние серосодержащих гепатопротекторов на состояние окислительного гомеостаза в крови животных с хронической алкогольной интоксикацией	66
4.3. Влияние серосодержащих гепатопротекторов на состояние окислительного гомеостаза в печени животных с хронической алкогольной интоксикацией	72
Глава 5. Обсуждение полученных результатов	78
5.1. Обсуждение взаимного влияния хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета	78
5.2. Результаты исследований коррекции метаболических нарушений в условиях моделирования хронической алкогольной интоксикации	88
Заключение	97

Выводы	110
Практические рекомендации	113
Список сокращений	114
Список литературы	115
Приложения	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Выраженность метаболических нарушений у больных сахарным диабетом (СД) зависит от функционального состояния печени [И.В. Пальцев, 2016; О.В. Гулинская, 2017; J. Zuwala-Jagiello et al., 2017], что связано с ее участием в патогенезе заболевания и, прежде всего, выполнением глюкостатической функции. Первым органом, в который инсулин приносится с током крови является печень [Д.Н. Пеньков и соавт., 2013]. Гипогликемический эффект инсулина обусловлен рядом факторов, в том числе активацией гликогенолиза в ткани печени и скелетных мышцах, ингибированием секреции глюкагона на уровне α -клеток островкового аппарата поджелудочной железы. Кроме того, инсулин подавляет процесс мобилизации нейтрального жира и, соответственно, снижает концентрацию глицерола и свободных жирных кислот в крови, которые также поступают в печень [Н.А. Бабенко, В.С. Харченко, 2015; A.A. Dawood et al., 2017]. Таким образом, снижение активности инсулина способствует постоянной гиперпродукции глюкозы печенью [М.А. Дербак и соавт., 2014]. Распространенность поражений печени при СД достаточно высока. В зависимости от методов диагностики диабетические гепатопатии выявляются в 30–60 % всех случаев. По некоторым данным гепатопатии занимают по частоте третье место среди поздних осложнений СД, после диабетических нейро- и нефропатий [Е. Вовк, 2013; А.О. Буеверов, А.В. Зилов, 2021]. У больных СД статистически значимо выше распространенность маркеров инфекционных гепатитов, чем среди популяции доноров, не страдающих данной эндокринопатией, и составляет для гепатитов В и С соответственно 8 % и 4 % на 100 обследованных (в здоровой популяции 0,4–0,7 %) [A. Lecube et al., 2006; Z.M. Younossi et al., 2019]. Значительную роль в структуре заболеваний печени играют алкогольные гепатиты, что особенно актуально ввиду многократного

увеличения токсического влияния этанола на метаболические системы организма больных СД.

Степень разработанности темы. Важная роль в развитии СД и заболеваний печени отводится нарушениям нормального функционирования прооксидантно-антиоксидантной системы. В большом количестве исследований показано, что воспаление и окислительный стресс являются одними из основных факторов развития и прогрессирования поздних осложнений СД [А.А. Спасов и соавт., 2016]. Между окислительным стрессом и воспалением также существует симбиотическая связь. ОС представляет собой дисбаланс между продукцией активных форм кислорода и антиоксидантной защитой. Это патологическое состояние, которое приводит не только к прямому клеточному повреждению, но и к развитию воспалительного каскада, который еще больше усиливает повреждение тканей [V. Calabrese et al., 2012; F. McMurray et al., 2016; H. Juchniewicz, A. Lubkowska, 2020]. Перспективные терапевтические стратегии направлены на повышение антиоксидантной защиты (антиоксиданты и активаторы Nrf2), снижение продукции АФК (ингибиторы NADPH-оксидазы и ингибиторы ксантинооксидазы), ингибирование ассоциированных воспалительных путей (ингибиторы инфламмосомы NLRP3, липоксины, агонисты рецепторов GLP-1 и антагонисты рецепторов AT-1). В ряде экспериментальных и клинических работ показана возможность антиоксидантной коррекции метаболических нарушений, как при СД, так и при гепатитах различного генеза [В.Я. Мокрый и соавт., 2015; S.W. Choi, C.K. Ho, 2017; Е.И. Морковин и соавт., 2019]. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях показана возможность усиления основных метаболических нарушений на фоне сочетанного течения СД и алкогольной интоксикации [Z. Ren et al., 2016]. При этом во всех случаях экспериментальных исследований индуцировали развитие СД введением аллоксана или стрептозоцина, а уже потом вводили этиловый

спирт в составе питьевого рациона или внутривенно [А.В. Индутьный и соавт., 2010; Н.В. Жаркова и соавт., 2012]. На наш взгляд более логичной и соответствующей реальной клинической ситуации должна быть обратная модель – формирование СД на фоне предварительной алкоголизации.

Цель исследования: определить особенности нарушений обмена веществ в условиях сочетанного моделирования сахарного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации и провести сравнительную оценку эффективности серосодержащих соединений для коррекции повреждений печени и нарушений окислительного гомеостаза.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности повреждения печени и нарушений обмена веществ в экспериментальных условиях моделирования сахарного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации.

2. Определить особенности нарушений окислительного гомеостаза и эндотоксикоза в экспериментальных условиях моделирования сахарного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации.

3. Провести сравнительную оценку эффективности коррекции повреждений печени и нарушений окислительного гомеостаза в условиях моделирования хронической алкогольной интоксикации с использованием метионина и S-аденозилметионина.

4. Провести сравнительную оценку эффективности разных тиоэфирных и тиолсодержащих соединений в коррекции повреждений печени и нарушений окислительного гомеостаза в условиях моделирования хронической алкогольной интоксикации.

5. Сравнить эффективность разных способов введения липоевой кислоты для коррекции повреждений печени и нарушений окислительного гомеостаза в условиях моделирования хронической алкогольной интоксикации.

Научная новизна:

В исследовании впервые:

1) определены особенности повреждения печени и обмена веществ в экспериментальных условиях при моделировании аллоксан-индуцированного диабета на фоне предварительно сформированной хронической алкогольной интоксикации у крыс;

2) проведено сравнительное исследование гепатопротекторной активности метионина и S-аденозилметионина в эксперименте при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс;

3) изучено влияние тиоэфирных (метионин и S-аденозилметионин) и тиолсодержащих (липовая кислота) соединений на состояние окислительного гомеостаза и повреждение печени при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс;

4) доказана эквивалентная эффективность введения липоевой кислоты только в парентеральной форме или по смешанной схеме, включающей на первом этапе внутрибрюшинное введение препарата с переходом на дальнейшую поддерживающую терапию с пероральным введением липоевой кислоты.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Теоретическая значимость работы заключается в определении характера взаимного влияния хронической алкогольной интоксикации и СД при их сочетанном моделировании в экспериментальных условиях. Основным практическим результатом является обоснование гепатопротекторной эффективности различных серосодержащих соединений, таких как метионин, аденозилметионин и липовая кислота. Определены несомненные преимущества активной формы метионина, связанные с его влиянием на метаболические и детоксицирующие системы печени. Использование свободного метионина может быть оправдано только в профилактических целях в стадии ремиссии заболевания, что связано с утяжелением

повреждений печени при его введении. Кроме того, было установлено, что липоевая кислота оказывает выраженную поддержку антиоксидантной системы крови, но это оказывается недостаточным для защиты гепатоцитов от повреждений в условиях хронической алкоголизации крыс.

Методология и методы исследования. Дизайн исследования включал 2 основных раздела: изучение особенностей течения СД на фоне хронической алкогольной интоксикации и сравнительную оценку эффективности использования серосодержащих соединений для коррекции метаболических нарушений у животных в процессе алкоголизации. На первом этапе были сформированы 4 группы животных (по 20 особей): контрольная и экспериментальные – с моделированием сочетанной и изолированных форм патологических состояний (СД и алкогольная интоксикация). Для реализации 2-го этапа сформированы группы крыс (по 15 особей), которые подвергали 2-х месячной алкоголизации с параллельным введением аденозилметионина, метионина или липоевой кислоты. Последнее вещество вводили в пероральной форме, парентеральной и смешанной. Для оценки метаболических нарушений определяли биохимические показатели крови и гомогената печени, отражающие состояние цитолитического синдрома, уровня гликемии и липидного профиля, окислительного метаболизма и эндогенной интоксикации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сочетанное моделирование сахарного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации у крыс сопровождается усилением повреждения печени и нарушений углеводного обмена относительно изолированного течения патологических процессов.

2. Изменения липидного профиля и нарушения окислительного метаболизма в условиях сочетанного моделирования хронической алкогольной интоксикации и аллоксан-индуцированного диабета в основном связаны с развитием сахарного диабета, тогда как алкоголизация животных оказывает основное влияние на развитие эндогенной интоксикации.

3. В сравнении с липоевой кислотой и метионином S-аденозилметионин оказывает влияние на метаболические системы не только крови, но и печени, что сопряжено с реализацией его цитопротекторных свойств.

4. Введение метионина крысам с хронической алкогольной интоксикацией не оказывает гепатопротекторного действия, что может быть связано с энергозатратным процессом его активации в условиях гипоэнергетического состояния.

5. Введение липоевой кислоты крысам с хронической алкогольной интоксикацией сопровождается наиболее выраженными изменениями антиоксидантной активности крови, но практически не оказывает гепатопротекторного эффекта.

6. Наиболее оптимальной схемой применения липоевой кислоты при токсическом повреждении печени является парентеральное введение на начальном этапе терапии с дальнейшим переходом на пероральное введение препарата.

Степень достоверности и апробации работы. Исследование проведено на 155 белых нелинейных крысах-самцах массой 200–250 грамм. Лабораторные животные были разделены на 9 групп по 15–20 особей в каждой, что позволило сформировать достаточные по объему выборки для проведения статистического анализа. Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы StatPlus для Windows (AnalystSoft Inc.). Лабораторный этап исследования выполнен с использованием современных методик и оборудования. Определение не отдельных показателей, а профилей показателей, комплексно отражающих состояние липидного обмена, окислительного гомеостаза, эндогенной интоксикации, цитолитического синдрома позволило получить объективные данные о состоянии отдельных звеньев метаболизма и сформулировать достоверные выводы.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ и в рамках комплексных тем НИР кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России № АААА-А17-117060610055-4 «Изучение молекулярных механизмов и разработка инновационных биохимических подходов диагностики, мониторинга и коррекции адаптационного потенциала у лиц, работающих в экстремальных условиях, при высоких физических нагрузках и различных патологических состояниях», № 121110900082-3 «Исследование молекулярных механизмов патологических процессов в условиях коморбидных форм социально значимых заболеваний».

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на XI Всемирном конгрессе по ХОБЛ, астме и иммунопатологии (Москва, 2017), XXIV Всемирном конгрессе по клинической медицине и иммунореабилитации (Дубай, ОАЭ, 2017), XII World congress on COPD, asthma and respiratory allergy (Dubai, UAE, 2018), Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: innovative technologies, Filodiritto International Proceedings (Bologna, Italy, 2018), XXV Всемирном конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Барселона, Испания, 2018), II Объединенном научном форуме, VI Съезде физиологов СНГ, VI Съезде биохимиков России (Сочи-Дагомыс, 2019), XIII Всемирном конгрессе по астме, аллергии и иммунопатологии, III международном конгрессе по молекулярной аллергологии (Москва, 2020).

Внедрение результатов исследования. Основные фундаментальные положения, сформулированные в диссертационном исследовании, внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Основные практические результаты диссертации внедрены в диагностическую лабораторную практику Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Публикации. Всего по материалам диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, из которых 6 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.

Личный вклад автора в исследование. Диссертантом проведена разработка дизайна исследования (95 %), проведен поиск и обзор отечественных и зарубежных источников литературы (92 %), лично выполнены все лабораторные исследования, проведена статистическая обработка и анализ полученных результатов (85 %). Соискатель принимал непосредственное участие в составлении выводов и формулировании научных положений, предложений для внедрения, разработке практических рекомендаций (85 %), написании статей (73 %) и тезисов (78 %), подготовил текст и иллюстративный материал для диссертации (97 %).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 13 таблицами и 8 рисунками. Указатель литературы содержит 131 источник, из которых 34 отечественных и 97 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основы патобиохимии сахарного диабета

Сахарный диабет (СД) 1 и 2 типа – это хронические заболевания, характеризующиеся неблагоприятным прогнозом в отношении здоровья и высоким расходом на здравоохранение, от которых страдают уже более 425 миллионов человек во всем мире. Ожидается, что к 2045 году это число вырастет примерно на половину и составит около 629 миллионов. Обе формы заболевания (СД 1 типа и СД 2 типа) связаны со значительным снижением качества жизни. Ежегодно осложнения СД становятся причиной около 4,6 миллионов случаев смерти [F.B. Hu et al., 2015; International Diabetes Federation (IDF), 2017]. Факторы риска СД 2 типа включают факторы, связанные с образом жизни, такие как нездоровое питание, а также генетические факторы, которые взаимодействуют друг с другом и с окружающей человека средой. Это сложное заболевание с различными взаимоотношениями патогенетических звеньев, включающими воспалительные процессы, ожирение и инсулинорезистентность, развивающиеся в результате действия различных иммуновоспалительных медиаторов, таких как адипокины, на гликемический гомеостаз [B. Arneith et al., 2019].

Гипергликемия является основной характеристикой СД и развивается в результате нарушений функционирования инсулина как гормона, регулирующего углеводный метаболизм. Инсулинорезистентность, в частности, связана с дефектом в процессах передачи сигналов в клетки-мишени. Инсулин обеспечивает транспорт глюкозы во внутриклеточную среду, взаимодействуя с рецепторами инсулина (IR), присутствующими по всей клеточной мембране и состоящими из двух α и двух β цепей. Так начинается процесс передачи сигналов инсулина, способствующих

последовательному фосфорилированию и активации двух основных путей, известных как сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). На пути различных постинсулиновых сигнальных реакций действуют многие иммуновоспалительные медиаторы, способствующие развитию инсулинорезистентности [M. Guasch-Ferré et al., 2016].

Прогрессирование СД 2 типа приводит к микро- и макрососудистым осложнениям, включая почечные и сердечно-сосудистые заболевания, являющиеся основной причиной смертности у пациентов с диабетом. Окислительный стресс (ОС) и воспаление считаются основными факторами патогенеза диабетических осложнений [C. Poblete-Aro et al., 2015; C. Poblete-Aro et al., 2018; B. Dewidar et al., 2020]. Между окислительным стрессом и воспалением также существует симбиотическая связь. ОС представляет собой дисбаланс между продукцией активных форм кислорода (АФК), азота (АФА) и антиоксидантной защитой. Это патологическое состояние, которое приводит не только к прямому клеточному повреждению, но и к развитию воспалительного каскада, который еще больше усиливает повреждение тканей. Перспективные терапевтические стратегии направлены на повышение антиоксидантной защиты (антиоксиданты и активаторы Nrf2), снижение продукции АФК (ингибиторы NADPH-оксидазы и ингибиторы ксантинооксидазы), ингибирование ассоциированных воспалительных путей (ингибиторы инфламмосомы NLRP3, липоксины, агонисты рецепторов GLP-1 и антагонисты рецепторов AT-1). АФК представляют собой реактивные частицы, производные кислорода, такие как супероксид анион-радикал ($\cdot\text{O}_2$), пероксидный радикал ($\text{ROO}\cdot$), гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) и пероксид водорода (H_2O_2). К активным формам азота относят оксид азота ($\text{NO}\cdot$) и пероксинитрит ($\text{ONOO}\cdot$) [V. Calabrese et al., 2012; F. McMurray et al., 2016; H. Juchniewicz, A. Lubkowska, 2020]. ОС вызывает активацию продукции провоспалительных цитокинов, которые дополнительно

способствуют выработке АФК, тем самым усиливая повреждение клеток и тканей. На клеточном уровне механизмы, с помощью которых усиливается продукция АФК, включают полиоловый и гексозаминовый пути, протеинкиназу С (PKC), семейство NADPH-оксидазы и накопление конечных продуктов гликирования (AGE). Хроническая гипергликемия стимулирует активность вышеупомянутых путей, что приводит к повышенной продукции АФК, повреждению почек и сердечно-сосудистой системы [L.D. Roberts et al., 2014; A. Phaniendra et al., 2015].

Основными эндогенными антиоксидантными ферментами, нейтрализующими АФК, являются супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) и глутатионпероксидаза (ГПО). СОД относится к группе металлоферментов, которые превращают $O_2^{\cdot-}$ в кислород и H_2O_2 . У млекопитающих известны три формы СОД: цитоплазматическая СОД (СОД1), митохондриальная СОД (СОД2) и внеклеточная СОД (СОД3) [S.H. Kim et al., 2015]. ГПО нейтрализует перекись водорода и органические перекиси липидов. КАТ участвует в разложении перекиси водорода до воды и кислорода. Снижение активности СОД на фоне гипергликемии может быть связано с ингибированием, вызванным окислительным стрессом. Повышенная концентрация перекиси водорода, как известно, инактивирует СОД, гликозилирование СОД и / или потеря Cu^{2+} , кофактора, необходимого для активности фермента, также могут снизить его активность. АФК могут быть нейтрализованы другими неферментативными молекулами, улавливающими свободные радикалы, такими как витамины и их производные, мелатонин и глутатион (GSH) [H.F. Jelinek et al., 2014; I. Mirończuk-Chodakowska et al., 2018]. При снижении защитного потенциала антиоксидантной системы, образующиеся АФК окисляют физиологически активные биомолекулы, липиды мембран, ферменты и нуклеиновые кислоты. Радикал NO^{\cdot} является необходимым медиатором вазодилатации, который в норме синтезируется ферментом синтазой оксида азота (NOS). В условиях

окислительного стресса $\text{NO}\cdot$ реагирует с супероксидным анион-радикалом с образованием $\text{ONOO}\cdot$, вызывая повреждение эндотелия [Z.V. Varga et al., 2015; F. Zaccardi et al., 2016].

Процесс липопероксидации или перекисного окисления липидов (ПОЛ) – это механизм повреждения липидов мембран клеток и клеточных органелл [K. McDonnell-Dowling et al., 2017]. Наибольшей чувствительностью к окислительным повреждениям обладают полиненасыщенные жирные кислоты, что обусловлено наличием двойных связей углерод-углерод. Основными продуктами ПОЛ являются гидропероксиды, такие как пропаналь, гексаналь, 4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид (МДА) [A. Ayala et al., 2014]. Другие ПОЛ представляют собой изопростаны, которые образуются в результате неферментативного окисления ненасыщенных жирных кислот, таких как арахидоновая кислота [L. Orazo-Ríos et al., 2020]. Кроме того, АФК могут повреждать структуру ДНК, наиболее чувствительным компонентом которых являются остатки азотистого основания гуанин. Окисление гуанина обычно ведет к образованию 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) или 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина (8-oxodG). Эти патологические метаболиты – биомаркеры окислительных модификаций ДНК в нормальных условиях восстанавливаются ферментом оксогуанингликозилазой (hOGG1). На фоне гипергликемии увеличивается содержание маркеров окислительных модификаций белков (нитротирозин и карбонильные остатки), снижается активность антиоксидантных ферментов. ОС связан не только с воспалением, но и с гипергликемией и прогрессированием СД 2 типа [C. Poblete-Aro et al., 2018; N.S. Dhalla et al., 2020].

Развитие диабетических осложнений во многом связано с дисгликемией – хроническая стойкая гипергликемия и острые колебания гликемии [A. Hosseini, M. Abdollahi, 2013]. На выраженность окислительного стресса напрямую влияют колебания концентрации глюкозы крови. Резкие амплитудные колебания уровня глюкозы крови оказывают большее влияние на развитие

окислительного стресса, чем постоянная гипергликемия [M. Packer, 2020]. Продолжительность и тяжесть хронической гипергликемии и регулярно возникающие острые изменения концентрации глюкозы являются основными составляющими гликемических нарушений. Существует множество источников продукции АФК при СД, включая ферментативные, неферментативные и митохондриальные пути [I. Liguori et al., 2018]. Доминирующим фактором интенсификации окислительного стресса является аутоокисление глюкозы. Изменения в митохондриальной мембране могут приводить к активации комплексов цепи переноса электронов, тем самым внося вклад в продукцию АФК [D.S.N.K. Liyanagamage, R.D. Martinus, 2020]. В качестве основного источника, индуцированного глюкозой образования АФК рассматривается НАДФН-оксидаза. Очевидно, что определенную роль играет ксантинооксидаза. Важным фактором интенсификации свободнорадикальных процессов является снижение антиоксидантной защиты (снижение уровня клеточных антиоксидантов и снижение активности ферментов антирадикальной защиты) [M. Fransen et al., 2012; E.G. Butkowski et al., 2016].

Роль митохондриальной динамики. Митохондрии являются основным местом энергообразования, генерации АФК, передачи сигналов и апоптоза [X. Miliara et al., 2015]. В митохондриальной динамике подчеркивается важность процессов слияния и деления в митохондриальном гомеостазе. Слияние митохондрий оказывается полезным, поскольку оно распределяет метаболиты, белки и ДНК через митохондриальную сеть. Чрезмерное деление митохондрий может быть вредным, потому что оно вызывает накопление фрагментированных митохондрий с нарушенной цепью переноса электронов, способной увеличивать продукцию митохондриальных АФК. Считается, что гипергликемия индуцирует деление митохондрий за счет усиления экспрессии связанного с динамином белка 1 (Drp1). Drp1 – это цитозольная гуанозин-5'-трифосфатаза, которая запускает деление митохондрий путем связывания с белков митохондриального деления 1 (Fis1) или с фактором деления

митохондрий. Повышенное деление митохондрий наблюдается при эндотелиальной дисфункции на фоне вызванной СД. Предполагают, что ингибирование процесса деления митохондрий может эффективно предотвращать развитие атеросклероза у больных СД и связанных с ним сердечно-сосудистые осложнения [С.Н. Wang, Y.H. Wei, et al., 2017].

1.1.1. Механизм индуцированной диабетом продукции активных форм кислорода окислительного стресса

При диабете АФК продуцируются различными путями, такими как усиление полиолового пути, повышенное образование конечных продуктов гликирования (AGE) и активация протеинкиназы С (PKC) [С. Poblete-Aro et al., 2015; K. Rehman, M.S.H. Akash, 2017].

Альдозоредуктаза – это НАДФН-зависимый фермент, который катализирует восстановление глюкозы до сорбита, с последующим окислением сорбита до фруктозы NAD^+ -зависимой сорбитолдегидрогеназой. Считается, что гипергликемия приводит к насыщению гексокиназы до такой степени, что более 30 % глюкозы превращается по такому пути. Полиоловый путь приводит к нехватке внутриклеточного НАДФН и избытку НАДН. Повышенная выработка НАДН является источником субстрата для НАДН-оксидазы и генерации АФК. Полиоловый путь однозначно служит основным источником образования АФК в сетчатке, а накопление сорбита вовлечено в развитие ретинопатии и других диабетических осложнений (рисунок 1.1).

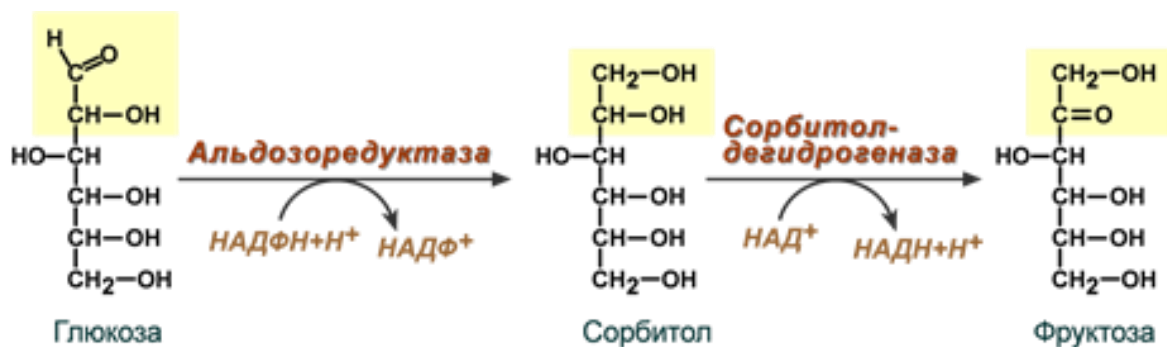


Рисунок 1.1 – Полиоловый путь превращения глюкозы

Образование конечных продуктов гликирования. Глюкоза может спонтанно реагировать со свободными аминогруппами белка с образованием оснований Шиффа. Эти соединения посредством сложных реакций могут образовывать конечные продукты гликирования (AGE), которые могут вызывать повреждение тканей за счет образования поперечных сшивок, изменяющих структуру и функцию белка. Кроме того, взаимодействие AGE с рецепторами на эндотелиальных клетках и макрофагах приводит к активации клеточной передачи сигналов и экспрессии генов, стимулирующих развитие окислительного стресса и воспаления.

Протеинкиназа C (PKC). Высокий уровень концентрации глюкозы может стимулировать выработку АФК через PKC-зависимую активацию НАДФН-оксидазы, что продемонстрировано в культивируемых эндотелиальных клетках аорты, клетках гладких мышц и клетках почек. Лабораторные данные показывают, что продукция АФК, зависящая от НАДФН-оксидазы, может вызывать повреждение ДНК в тканях почек и приводит к развитию диабетической нефропатии. Сообщалось о повышенной активности НАДФН-оксидазы в сетчатке крыс с экспериментальным диабетом, что позволяет предположить ее участие в развитии диабетической ретинопатии. PKC потенциально способна регулировать развитие диабетических осложнений различными способами, включая активацию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), НАДФН-оксидазы, фосфолипазы A₂, продукцию эндотелина-1, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующего фактора роста-β (TGF-β) и путем активации NF-κB. PKC, активированная диацилглицерином, влияет на экспрессию генов ключевых белков, приводит к снижению кровотока, закупорке капилляров, воспалению, образованию свободных радикалов и повреждению макромолекул клеток [X. Miliara et al., 2015].

Использование антиоксидантов в терапии СД. Для терапии СД сегодня активно используется метформин – синтетический диметилбигуанид,

эффективный сахароснижающий препарат. Помимо снижения уровня глюкозы в крови, метформин уменьшает риск развития сердечно-сосудистых осложнений. Положительные сердечно-сосудистые эффекты метформина, по-видимому, не зависят от его антигипергликемического эффекта, поскольку другие традиционные методы снижения уровня гликемии, такие как инсулинотерапия и использование сульфонилмочевины, проявляют значительно менее выраженное влияние на риск поражений сердечно-сосудистой системы. Имеются свидетельства, что метформин ингибирует фрагментацию (деление) митохондрий при СД, активируя АМРК, что приводит к предотвращению повреждения эндотелия. Было установлено, что метформин снижает экспрессию Drp1 и Drp1-опосредованное деление митохондрий в АМРК-зависимых диабетических эндотелиальных клетках. Ингибирование фрагментации митохондрий подавляет ОС в клетках эндотелия, улучшает функцию эндотелия и уменьшает атеросклеротические поражения. Имеются данные, что лечение метформином сопровождается снижением содержания МДА, увеличением уровня GSH и подавлением воспалительных процессов.

Имеются данные, что сверхэкспрессия ферментов СОД, КАТ и ГПО может защищать островковый аппарат поджелудочной железы от АФК и поддерживать продукцию инсулина на более высоком уровне. Витамин С, витамин Е и β -каротины традиционно используются для коррекции окислительного стресса и его осложнений при СД. При это хорошо известно, что добавление антиоксидантов не влияет на уровень глюкозы или инсулина в плазме больных. Однако имеются достоверные данные, что уровень HbA_{1c} значительно снижается при добавлении антиоксидантов, что можно рассматривать как один из существенных признаков протективного действия [C. Carresi et al., 2020; P.V. Dlodla et al., 2020].

В качестве одного из эффективных антиоксидантов рассматривают мелатонин, являющийся производным триптофана и секретируемый в

основном пинеалоцитами [М.Н. Pourhanifeh et al., 2020]. Основная функция мелатонина – регулирование цикла сна и бодрствования, однако он также участвует в регуляции гомеостаза и энергетического обмена. Мелатонин может активировать метаболизм в бурой жировой ткани, увеличивать расход энергии и обладать противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. Мелатонин увеличивает экспрессию антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ и ГПО), способствует нейтрализации свободных радикалов. Мелатонин используется отдельно или в сочетании с другими антиоксидантами в течение 1-3 недель в составе комплексной терапии СД и способен вызвать клинические улучшения [А. García-Sánchez et al., 2020].

1.1.2. Взаимосвязь между окислительным стрессом и воспалением

Воспаление – важная физиологическая реакция организма на различные патологические процессы, такие как действие патогенов и раздражителей, повреждение тканей. Этот ответ включает инфильтрацию и последующую активацию клеток иммунной системы в месте повреждения, выработку медиаторов воспаления, таких как цитокины. Считается, что высвобождение медиаторов воспаления связано с уровнем гликемии и опосредовано окислительным стрессом. Хроническое воспаление и ОС вовлечены в патофизиологию сахарного диабета. Сложные взаимодействия между ОС и воспалительными путями включают механизмы обоюдного усиления (положительная обратная связь или «порочный круг»). Воспаление – это первичная реакция иммунной системы на устранение патогенов или других стимулов с целью восстановления нормального состояния клеток или замены разрушенной ткани. После активации клетки врожденной иммунной системы секретируют провоспалительные цитокины и хемокины, которые стимулируют выработку АФК и / или АФА [F.M. Schmidt et al., 2015]. Провоспалительные цитокины могут косвенно

вызывать ОС, активируя макрофаги, которые, как известно, играют ключевую роль в удалении патогена за счет генерации АФК. Важно отметить, что хроническое воспаление – это длительное патологическое состояние, которое сопровождается разрушением тканей и фиброзом, ключевым компонентом которого является повреждение клеток в результате гиперпродукции АФК воспалительными клетками [N. Esser et al., 2014; L. Maschirow et al., 2015; C. Poblete-Aro et al., 2018].

Хроническое воспаление вызывает свои клеточные побочные эффекты главным образом за счет непрерывного и чрезмерного образования свободных радикалов и истощения эндогенных антиоксидантов. АФК также усиливает воспаление, стимулируя определенные стресс-активируемые киназы. АФК могут стимулировать факторы транскрипции, такие как ядерный фактор-каппа В (NF- κ B) и активаторный белок-1 (AP-1), для стимуляции экспрессии провоспалительных цитокинов [F. Al Hannan, K.G. Culligan, 2015]. Следовательно, терапия, нацеленная на сигнальные пути ОС и воспалительных цитокинов, является перспективной стратегией для лечения СД и его осложнений. В нормальных физиологических условиях ОС и активация иммунной системы обычно непродолжительны из-за внутренних механизмов отрицательной обратной связи, таких как повышенное производство антиоксидантных соединений или противовоспалительных цитокинов. При некоторых хронических болезненных состояниях, таких как СД данная связь нарушается [Q.N. Dinh et al., 2014; V.F. Gomes, C.M. Accardo, 2019; O.O. Oguntibeju, 2019].

Роль воспаления в патогенезе сахарного диабета 2 типа.

В последнее время активно рассматривается идея о том, что СД 2 типа является воспалительным заболеванием. Продукция медиаторов воспаления является важным прогностическим признаком высокого риска заболеваемости СД 2 типа у взрослых. Повышенный уровень сиаловых кислот, ИЛ-6 и С-реактивного белка в плазме крови могут указывать на развитие СД 2 типа. Показано, что

повышенный уровень воспалительных биомаркеров предсказывает развитие резистентности к инсулину. Сообщается о корреляции между уровнем инсулина натощак и С-реактивного белка в плазме диабетиков, что также подтверждает то, что резистентность к инсулину и воспалительные процессы взаимосвязаны [R. Hojs et al., 2016]. Исследования показали, что хроническое субклиническое воспаление является фактором развития инсулинорезистентности, хотя эти механизмы не совсем понятны, однако было замечено, что жировая ткань может синтезировать основные провоспалительные цитокины: ФНО, ИЛ-1 и ИЛ-6 [Z.V. Varga et al., 2015]. Продукция биомаркеров воспаления связана с общим объемом жировой ткани, что свидетельствует о том, что нарушения иммунологической реактивности и воспаление являются важными биологическими факторами в патогенезе СД и его осложнений. Например, считается, что диабетическая нейропатия развивается как следствие индуцированных гипергликемией метаболических, ферментативных и микрососудистых изменений, связанных с продукцией провоспалительных цитокинов, действующих на нейроны в центральной, периферической и вегетативной нервной системе [D. Tousoulis et al., 2013]. Исследования на животных также показали, что при развитии диабетической ретинопатии экспрессия мРНК ИЛ-1 и ФНО-альфа значительно увеличивается в сетчатке лабораторных животных, тогда как ингибирование ФНО-альфа способно оказать протективное влияние на развитие осложнений СД. Содержание фибриногена, лейкоцитов, С-реактивного белка, сывороточного амилоида А и провоспалительных цитокины, таких как ИЛ-1 бета, ИЛ-6 и хемокины, такие как MCP-1, повышается в крови людей с СД 2 типа. При этом данные параметры снижаются, на фоне серьезных изменений образа жизни, способствующих прежде всего снижению массы тела. Таким образом жировая ткань, мышечные клетки и клетки поджелудочной железы являются очагами воспаления при ожирении и СД 2 типа [C. Gar et al., 2018].

Взаимодействие гипергликемии, воспаления и окислительного стресса при сахарном диабете 2 типа

Известно, что хроническая гипергликемия играет основную роль в развитии микро- и макрососудистых осложнений, которые, как уже было указано, опосредованы рядом механизмов, включая ОС и воспаление [A. Otamas et al., 2020]. Следствием ОС являются повреждения ДНК, липидов и белков, а степень повреждений связана с продолжительностью гипергликемии. В исследованиях о взаимосвязи между воспалением, ОС и СД 2 типа было высказано предположение, что контроль воспаления и ОС необходим для эффективного процесса лечения и профилактики диабетических осложнений. Исследования показали, что люди с повышенным уровнем ИЛ-6 и ИЛ-1 бета имеют в 3 раза более высокий риск развития СД 2 типа, в то время как низкие уровни ИЛ-1 бета не были ассоциированы с увеличением риска развития СД 2 типа [A. Dayre et al., 2016; V.F. Gomes, C.M. Accardo, 2019].

Принципиально то, что во время гипергликемии продукция цитокинов сопровождается повышением уровня хемоаттрактантного белка моноцитов-1 и снижением уровня инсулиноподобного фактора роста-1. Сообщалось, что повышенный уровень хемоаттрактантного белка-1 моноцитов может активировать инфильтрацию макрофагов в жировую ткань, вызывая индуцированную дедифференцировку жировой ткани, которая способствует гиперинсулинемии и СД 2 типа через инсулинорезистентность. Считается, что прогрессирование хронических заболеваний связано с взаимодействием между воспалением и ОС. Повышенный уровень ИЛ-6 способствует гиперпродукции супероксидных анион-радикалов и ОС, которые, в свою очередь, негативно влияют на эффективный метаболизм свободных жирных кислот. Таким образом, сам ОС вызывает разобщение митохондрий и увеличивает образование АФК. В каскаде дальнейших реакций повышенное образование АФК приводит к дальнейшему ОС, который также индуцирует

интенсификацию воспалительных процессов [E.G. Butkowski, H.F. Jelinek, 2017].

ОС является одним из факторов патогенеза инсулинорезистентности, нарушения секреции инсулина, утилизации глюкозы, нарушения метаболизма глюкозы в печени в сочетании с активацией воспалительных цитокинов приводит к СД 2 типа. Известно, что ОС в бета-клетках поджелудочной железы развивается на фоне высокого уровня глюкозы, гиперлипидемии и воспалительных реакций. ОС увеличивает выработку провоспалительных цитокинов, таких как ФНО. Повышенное образование ФАК приводит к увеличению их в адипоцитах, а ОС, вызванный воспалением, считается одним из наиболее важных факторов в развитии СД 2 типа [R. Anne et al., 2018]. Было замечено, что бета-клетки поджелудочной железы, подвергшиеся воздействию повышенной концентрации свободных жирных кислот и гипергликемии, подвергаются апоптозу, и что ОС является основным фактором, вызывающим апоптоз бета-клеток поджелудочной железы. Кроме того, связь между уровнем биомаркеров ОС и наличием поражений бета-клеток поджелудочной железы наблюдалась у добровольцев с СД 2 типа [O.O. Oguntibeju, 2019].

1.2. Патобиохимические изменения при острой и хронической алкогольной интоксикации

Чрезмерное употребление алкоголя – глобальная проблема здравоохранения с огромными социальными, экономическими и клиническими последствиями, на которую ежегодно приходится более 3,3 миллиона смертей (World Health Organization, 2014). Чрезмерное употребление алкоголя в течение десятилетий повреждает почти все органы и системы организма человека. Однако наиболее чувствительной к действию алкоголя является печень, поскольку она является основным местом

метаболизма этанола. Печень поражается в первую очередь и степень ее повреждения наиболее выражена в сравнении с другими органами и тканями [G. Addolorato et al., 2016; I.A. Kirpich et al., 2016; S. Liangpunsakul et al., 2016; S. Wang et al., 2016].

1.2.1. Метаболизм алкоголя в печени

Этиловый спирт в составе различных напитков метаболизируется в основном в паренхиматозных клетках печени – в гепатоцитах, которые составляют около 70 % массы печени. Эти клетки экспрессируют самые высокие уровни основных ферментов, окисляющих этанол: алкогольдегидрогеназы (АДГ), которая локализована в цитозоле, и цитохрома P450 2E1 (CYP2E1), который локализован в гладком эндоплазматическом ретикулуме. Гепатоциты также экспрессируют очень высокий уровень каталазы, фермента, который находится в пероксисомах. Каталаза обычно осуществляет детоксикацию перекиси водорода, однако, в присутствии этанола, каталаза играет вспомогательную роль в его метаболизме за счет использования H_2O_2 для окисления этанола до ацетальдегида. Окисление этанола каталазой является второстепенным путем его метаболизма в печени, но имеет большую роль в окислении этилового спирта в головном мозге [A.I. Cederbaum, 2012; M.M. Thakkar et al., 2015].

АДГ является наиболее активным ферментом, метаболизирующим этанол, ее активность достигает половины максимальной на фоне концентрации циркулирующего этанола в крови 5-10 мг/дл, что значительно ниже токсической концентрации. АДГ является НАД-зависимым ферментом, в процессе реакции образуется НАДН и ацетальдегид. Последнее соединение очень реактивно и токсично. Оно может ковалентно связываться с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами с образованием аддуктов ацетальдегида, которые, в свою очередь, могут нарушать структуру и функцию этих макромолекул [M. Ganesan et al., 2015; M. Ganesan et al., 2016;

C.T. Shearn et al., 2016]. Один из способов минимизировать токсичность ацетальдегида гепатоцитами – быстрое окисление его до ацетата с использованием митохондриального фермента альдегиддегидрогеназы 2 (АЛДГ2). Реакция ALDH2 – еще одна стадия окисления-восстановления, на которой образуются НАДН и ацетат [M. Rohanka, 2016]. Соль уксусной кислоты может диффундировать в кровоток для использования в других метаболических путях. Повышенная выработка НАДН в результате реакций, катализируемых как АДГ, так и АЛДГ2, изменяет нормальное состояние депо коферментов НАД/НАДН внутри гепатоцитов, нарушается окислительно-восстановительный потенциал клетки [C.C. Cunningham et al., 2001]. Такие изменения индуцируют значительные метаболические сдвиги окислительного метаболизма к восстановительному синтезу, способствуя образованию жирных кислот и развитию жирового гепатоза [R.E. Levy et al., 2015; H.J. Edenberg, J.N. McClintick, 2018; B. Le Daré et al., 2019].

CYP2E1 – другой ключевой печеночный фермент, катализирующий окисление этанола до ацетальдегида. Хотя каталитическая эффективность CYP2E1 значительно ниже, чем АДГ, CYP2E1 имеет в 10 раз большее сродство к этанолу. Таким образом константа Михаэлиса для данного фермента составляет 46-92 мг/дл. Кроме того важно то, что CYP2E1 является индуцибельным ферментом, его содержание в гепатоцитах повышается при хроническом потреблении этанола [Y. Lu, A.I. Cederbaum, 2018]. Непосредственное взаимодействие молекулы этанола с белком CYP2E1 ведет к конформационным перестройкам, который снижают активность деградации фермента убиквитин-протеасомной системой, что приводит к накоплению молекул CYP2E1 в клетке. Индукция CYP2E1 имеет несколько основных эффектов: во-первых, поскольку большее количество CYP2E1 окисляет этанол, у злоупотребляющих алкоголем развивается «метаболическая толерантность», то есть им нужно пить больше алкоголя, чтобы достичь уровня интоксикации, который они ранее достигали после употребления меньшего количества

алкоголя [Q.M. Anstee et al., 2016; H. Donnadieu-Rigole et al., 2017]. Во-вторых, ускоренный метаболизм алкоголя за счет более высоких уровней CYP2E1 подвергает клетки печени метаболической опасности, поскольку большее количество CYP2E1 не только производит больше ацетальдегида, но и индуцированный фермент также генерирует большее количество АФК, включая гидроксиэтильные радикалы (т.н. свободнорадикальная форма этанола), супероксид анионы-радикал и гидроксильные радикалы [C. Matyas et al., 2016]. Непрерывное образование этих реактивных молекул у больных алкоголизмом в конечном итоге ведет к формированию ОС. В этих условиях скорость образования АФК превышает способность печени нейтрализовать их природными антиоксидантами, такими как глутатион и витамины E, A и C, или удалять их с помощью антиоксидантных ферментов. Исследования на животных показали, что хроническая алкогольная интоксикация снижает активность и / или количество некоторых антиоксидантных ферментов. ОС еще больше усугубляется, когда образующиеся АФК участвуют во вторичных реакциях с белками и ненасыщенными липидами [S. Das et al., 2017]. Такие реакции приводят к образованию перекисей липидов, которые сами взаимодействуют с белками и ацетальдегидом с образованием более крупных аддуктов (например, аддуктов МДА и ацетальдегида), которые способны вызывать воспалительный ответ [Л.Ф. Панченко и соавт., 2013; E. Seni et al., 2014; M. Li et al., 2017]. Наконец, из-за широкой субстратной специфичности CYP2E1 повышенная активность данного фермента также ускоряет преобразование избыточного количества субстратов, отличных от этанола, таких как нестероидные противовоспалительные средства, в том числе ацетаминофен. После индукции CYP2E1 у больных алкоголизмом парацетамол превращается в более токсичный, реактивный промежуточный продукт, что подвергает больных значительному риску токсического лекарственного поражения печени и усугублению основного патологического процесса [Y.C. Jung, K.W. Namkoong, 2014; Dunn, V.H. Shah, 2016].

1.2.2. Влияние алкоголя на метаболизм липидов

Этанол ускоряет липогенез в печени. Повышенный синтез липидов в печени является результатом более высокой экспрессии липогенных ферментов и цитокинов, которые кодируются генами, регулируемые двумя факторами транскрипции: стероидным регуляторным элементом, связывающим белок-1с (SREBP-1с) и Egr-1. SREBP-1с принадлежит к семейству факторов транскрипции, которые контролируют метаболизм холестерина в печени. Однако у злоупотребляющих алкоголем людей окисление этанола приводит к изменению метаболизма липидов в печени, превращающим печень из органа, сжигающего липиды, в орган, накапливающий липиды. Таким образом, печеночный SREBP-1с относительно неактивен в гепатоцитах относительно здоровых людей. Однако у человека, который постоянно переедает или злоупотребляет этиловым спиртом, окисление этанола в печени запускает транслокацию SREBP-1с в аппарат Гольджи, где он подвергается протеолитическому созреванию до своей активной формы. Egr-1 контролирует экспрессию генов, отвечающих на клеточный стресс. Он связывается с участками промотора гена, которые имеют отношение к индуцированному алкоголем повреждению печени и стеатозу. Наиболее заметным из них является ФНО альфа и липогенный цитокин. Кроме того, поскольку Egr-1 активируется очень рано после введения этанола, он также регулирует экспрессию гена SREBP-1с [B. Chang et al., 2015; C. Matyas et al., 2016].

В дополнение к усиленному липогенезу печени жировая ткань способствует развитию стеатоза [T. Fujita et al., 2016]. Жировая ткань в норме является важным энергетическим депо, накапливая лишние калории, полученные в результате потребления пищи, в виде жира. При необходимости высококалорийный жир можно использовать для удовлетворения энергетических потребностей в периоде голодания или интенсивных физических нагрузок. Исследования на грызунах, постоянно

употребляющих алкоголь, показали, что потребление этанола снижает массу жировой ткани за счет усиления расщепления жира (т.е. липолиза) в жировой ткани [R.J. Wilkin et al., 2016]. Свободные жирные кислоты, высвобождаемые из жировой ткани, поглощаются печенью и этерифицируются в триглицериды, тем самым усугубляя накопление жира в печени. Клинические исследования также показали, что больные алкоголизмом и ожирением печени имеют значительно более низкую массу тела, индекс массы тела и содержание жира в организме, чем практически здоровые люди [S. Mathews et al., 2016; N.A. Osna et al., 2017].

Этанол замедляет распад липидов в печени. Поскольку большинство липидов в гепатоцитах находится в липидных каплях, необходимо иметь механизмы извлечения липидов для их последующего окисления. Распад липидных капель осуществляется липофагией, особой формой внутриклеточного процесса, который разрушает цитоплазматические компоненты. В процессе липофагии липидные капли захватываются вакуолями, связанными с двойной мембраной, которые называются аутофагосомами. Эти вакуоли переносят содержимое липидных капель в лизосомы, где они расщепляются ферментами, переваривающими липиды (например, липазами), высвобождая свободные жирные кислоты, которые затем подвергаются β -окислению внутри митохондрий. Скорость аутофагии замедляется на фоне хронического потребления этанола, что может быть связано с тем, что этанол способен нарушать биогенез лизосом [D.V. Suraweera et al., 2015].

Кроме того, чрезмерное употребление алкоголя снижает скорость β -окисления жирных кислот. Есть несколько механизмов влияния этилового спирта на этот процесс. Во-первых, усиленное образование НАДН путем окисления этанола ингибирует митохондриальное β -окисление – регуляция депо коферментов. Во-вторых, образующийся ацетальдегид инактивирует рецептор фактора транскрипции альфа, активируемый пролифератором

пероксисом (PPAR- α), который действует совместно с ретиноидным рецептором X (RXR) и регулирует экспрессию генов, регулирующих транспорт и окисление жирных кислот. Ацетальдегид, вероятно, инактивирует PPAR- α , ковалентно связываясь с фактором транскрипции, тем самым блокируя его способность распознавать и/или связывать промоторные последовательности PPAR- α . В-третьих, как острая, так и хроническая алкогольная интоксикация сопровождаются деполяризацией митохондрий, что снижает их способность генерировать энергию, что приводит к неэффективному импорту жирных кислот и снижению уровня β -окисления. В-четвертых, потребление этанола снижает выработку гормона адипонектина, который секретируется адипоцитами, восстановление уровня которого способствует увеличению скорости окисления жирных кислот и наоборот [Z. Younossi, L. Henry, 2016; P. Mukhopadhyay et al., 2017].

Этанол вызывает нарушение экспорта липидов из печени. Хорошо известно, что печень экспортирует триглицериды и холестерин только в составе липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), поэтому любые нарушения синтеза или экспорта ЛПОНП способствует накоплению жира в гепатоцитах. Сборка липопротеинов регулируется доступностью триглицеридов (которые составляют более 50 % ЛПНОП) липидных капель цитоплазмы. До 70 % триглицеридов в ЛПОНП имеет происхождение из пула триглицеридов, хранящихся в липидных каплях, которые сначала подвергаются липолизу, а затем повторно этерифицируются, образуя триглицериды в составе ЛПОНП. Имеются свидетельства о причастности нарушений секреции ЛПОНП к развитию алкогольного стеатоза, однако точно неизвестно, как алкоголь нарушает липолиз запасов триглицеридов в липидных каплях и использование их для сборки ЛПОНП и их последующей секреции. Имеются данные, что нарушенная алкоголем секреция ЛПОНП вызвана сниженным синтезом необходимых белков для их сборки [C. Matyas et al., 2016].

1.2.3. Влияние алкоголя на метаболизм углеводов

Как уже было указано основной мишенью этилового спирта в организме животных является печень, которая также несет основную нагрузку в метаболизме глюкозы. Одним из характерных симптомов длительной алкогольной интоксикации, продолжающейся 3–4 месяца и более является гипогликемия, связанная со смещением отношения синтеза и утилизации данного метаболита в организме [А.К. Бортникова, Т.И. Панова, 2013]. Усиление образования НАДН на фоне алкоголизации ведет не только к подавлению расщепления липидов, но и угнетению активности глюконеогенеза [G. Kubiak-Tomaszewska et al., 2020]. Указывается, что на фоне алкогольной интоксикации также развиваются нарушения гликолиза и пентозофосфатного пути катаболизма глюкозы [С.В. Лелевич, 2009]. Уже на фоне 2-х недельной алкогольной интоксикации у лабораторных животных наблюдается снижение активности глюкокиназы в ткани печени. Также на фоне небольшой по длительности (2–4 недели) алкогольной интоксикации определяется небольшая гипергликемия. Увеличение длительности патологического процесса сопровождается более глубокими изменениями углеводного обмена. Так на фоне алкогольной интоксикации в течение 1 месяца у крыс в печени определяется не только сниженная активность глюкокиназы, но и ЛДГ, начинает снижаться уровень гликемии. Содержание глюкозы и лактата в печени при этом прогрессирующе нарастает, а уровень глюкозо-6-фосфата снижается. Влияние этанола на пентозофосфатный путь проявляется снижением активности транскетолазы и концентрации пентоз в печени крыс после месячной алкоголизации. Считается, что снижение активности транскетолазы в данной ситуации связано с тиамин-дефицитным состоянием, развивающемся в следствие нарушений питания и всасывания пищевых веществ в ЖКТ человека и животных [С.В. Лелевич, 2009].

1.3. Особенности метаболических изменений при сочетанном течении сахарного диабета и алкогольной интоксикации

Имеются данные эпидемиологических наблюдений, что злоупотребление алкоголем связано с увеличением риска развития метаболического синдрома и СД [П.С. Пронько, 2016]. Очевидно, что эффективный контроль СД требует от больного соблюдения рекомендаций по лечению, в первую очередь по контролю уровня гликемии. К сожалению, большинство отечественных и зарубежных исследований свидетельствуют о низком уровне соблюдения рекомендаций по самостоятельному контролю СД [Y. Zheng et al., 2016]. Многочисленные факторы могут быть в основе связи между употреблением алкоголя и неудовлетворительным контролем СД. Употребление алкоголя связано со снижением потребления пищи и коррелирует со снижением готовности придерживаться режима питания. Считается, что алкоголь мешает соблюдению диеты и приема лекарств, он также может нарушать другие способы самоконтроля, такие как мониторинг гликемии и в целом отношение к собственному здоровью. У больных алкоголизмом на фоне СД наблюдается плохая приверженность к инсулинотерапии [A. van de Wiel, 2004; P.A. Engler et al., 2013].

Исследование влияния кратковременного употребления алкоголя на СД демонстрирует противоречивые результаты. Было показано, что алкоголь влияет как на гликемический контроль, так и на продукцию глюкозы [H.W. Al-Humadi et al., 2019]. Алкоголь может вызывать гипогликемию. Некоторые исследования показали наличие обратной зависимости между потреблением алкоголя и HbA_{1c}. Есть свидетельства того, что умеренное употребление алкоголя может оказывать долгосрочное благоприятное влияние на течение СД. Например, больные СД, которые выпивали один стакан вина в день в течение трехмесячного периода исследования, имели более низкий уровень глюкозы натощак по сравнению с трезвенниками,

однако у них не было выявлено различий в уровне глюкозы после приема пищи. Точно так же пациенты с СД, которые употребляли 1–2 стакана вина в день в течение месяца, имели более низкий уровень инсулина в сыворотке крови натощак. Однако это не было связано со снижением уровня глюкозы или HbA_{1c} [B. Le Daré, T. Gicquel, 2019]. Имеются данные об отрицательном взаимодействии между алкоголем и пероральными сахароснижающими препаратами. Например, алкоголь усиливает гипогликемический эффект сульфонилмочевины. Также было показано, что хлорпропамид снижает скорость выведения этанола из крови. Не рекомендуется чрезмерное употребление алкоголя при приеме метформина из-за повышенного риска развития лактоацидоза [S. Minzer et al., 2020].

Этиловый спирт оказывает множество эффектов на энергетический метаболизм, обмен липидов и углеводов, является источником энергии и агентом, обладающим собственными фармакологическими свойствами [P.K. Kamat et al., 2016; Е.А. Чигринский и соавт., 2022]. В частности, употребление этилового спирта способствует развитию кетоза – накопления кетоновых тел в крови и тканях. Считается, что причиной влечения к алкоголю на этапе формирования зависимости является потребность головного мозга в кетоновых телах на фоне гипогликемии, которая также индуцируется употреблением алкоголя. При этом устранение гипогликемии способствует снижению влечения к этиловому спирту [А.К. Бортникова, 2013; А.К. Бортникова, Т.И. Панова, 2014]. Прослеживается ряд патогенетических звеньев, которые могут быть общими на фоне сочетанного течения алкогольной интоксикации и СД.

Имеются данные, свидетельствующие об усилении окислительного стресса у больных СД 2 типа, злоупотребляющих алкоголем. По данным А.В. Индутного и соавт. у таких больных статистически значимо выше, чем у групп больных с изолированными формами заболеваний и контрольной группы здоровых лиц, уровень светосуммы перекись-индуцированной

хемилюминесценции и содержание ТБК-реактивных продуктов. И первый и второй показатель отражают интенсивность свободнорадикальных процессов и накопление продуктов окислительных модификаций биомолекул в сыворотке крови больных. Только уровень антиокислительной активности сыворотки крови больных СД 2 типа на фоне злоупотребления алкоголем соответствует значению аналогичного показателя группы лиц, страдающих алкоголизмом и несколько выше контрольных значений и значения показателя больных изолированной формой СД 2 типа. Авторы предположили, что это адаптивные изменения, связанные с усилением активности системы антиоксидантной защиты и детоксикации на фоне предшествующего длительного употребления этанола [А.В. Индутный и соавт., 2004].

В экспериментальных условиях при моделировании СД и алкогольной интоксикации в течение 2-х месяцев после введения стрептозоцина показано усиление процессов окислительных модификаций биомолекул – липопероксидации и карбонильной модификации белков относительно изолированного моделирования отдельных патологических процессов [А.В. Индутный и соавт., 2009]. В этой же работе показано, что у таких животных обнаруживаются признаки повреждения миокарда, что проявляется увеличением выброса сердечного тропонина I в плазму крови почти в 20 раз относительно контроля. Это указывает на взаимное усиление изученных патологических процессов проявляющееся не только в статистически значимых изменениях маркеров углеводного обмена или поражения печени, но и в изменении специфических маркеров повреждения других органов, что свидетельствует о кратном возрастании риска развития осложнений.

Исследования особенностей влияния алкогольной интоксикации на течение экспериментального аллоксанового СД представлено в работах О.Ю. Жуковой. В данном случае начинали алкоголизацию спустя 2 недели

после введения аллоксана, то есть формировали наиболее распространенную экспериментальную модель сочетанного патологического процесса на фоне уже сформировавшегося СД. В результате проведенных исследований было подтверждено, что алкоголизация на фоне СД ведет к интенсификации свободнорадикальных процессов в печени крыс. Это характеризуется увеличением накопления продуктов окислительных модификаций липидов – гидроперекисей в цитозольной фракции гомогената печени животных. Нарушения системы антиоксидантной защиты характеризуются изменениями соотношения активности ферментов – КАТ и СОД, увеличением нагрузки на систему глутатиона, а с увеличением длительности алкогольной интоксикации прогрессирующе снижается уровень SH-групп тиолсодержащих компонентов печени [О.Ю. Жукова и соавт., 2005; О.Ю. Жукова, В.Е. Высокогорский, 2005; В.Е. Высокогорский и соавт., 2007].

В другой работе [А.В. Индутный и соавт., 2010] показано, что экспериментальное моделирование алкогольной интоксикации после создания модели СД не сопровождается существенными изменениями уровня концентрации глюкозы плазмы крови или содержания в крови продуктов окисления белков и липидов, относительно соответствующих показателей животных только со стрептозоциновым диабетом. Однако здесь же указывается, что в условиях сочетанной экспериментальной модели значительно усиливаются проявления окислительного стресса в ткани сердечной мышцы, а также можно предположить, что и в других тканях.

Исследования особенностей азотистого обмена на фоне экспериментального СД и острой алкогольной интоксикации, которую моделировали путем однократной внутрибрюшинной инъекции 25 % этилового спирта в дозировке 4 г/кг натошак с последующим выведением животных из эксперимента через 2 или 6 часов, показали, что в данных условиях наблюдается усиление катаболизма аминокислот и азотистых оснований нуклеотидов. Наиболее значительные изменения, статистически значимо

отличающиеся от показателей изолированного моделирования одного из патологических процессов, заключались в увеличении активности глутаматдегидрогеназы и АМФ-деаминазы в печени, что сочеталось со снижением количества свободных аминокислот и увеличением содержания мочевины и мочевой кислоты в крови спустя 6 часов после введения этилового спирта [Н.В. Жаркова и соавт., 2012]. Усиление катаболизма пуриновых азотистых оснований и соответственно образования ксантина и гипоксантина может сопровождаться усилением активности ксантиноксидазы, способной катализировать образования пероксида водорода. Это может быть также одним из потенциальных механизмов интенсификации свободнорадикальных процессов, отмечаемых многими авторами.

Таким образом, в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях показана возможность усиления основных метаболических нарушений на фоне сочетанного течения СД и алкогольной интоксикации [Z. Ren et al., 2016]. При этом во всех случаях экспериментальных исследований сперва индуцировали развитие СД введением аллоксана или стрептозоцина, а уже потом вводили этиловый спирт в составе питьевого рациона или внутривенно [В. Gao et al., 2017]. На наш взгляд более логичной и соответствующей реальной клинической ситуации должна быть обратная модель – формирование СД на фоне предварительной алкоголизации. Поэтому в нашем исследовании сперва в течение 1 месяца крысам вводили этиловый спирт в качестве единственного источника жидкости, а уже затем вводили аллоксана моногидрат и продолжали алкоголизацию еще на протяжении 1 месяца.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования (общая характеристика групп испытуемых лабораторных животных)

Диссертационная работа была выполнена с использованием 155 белых нелинейных крыс-самцов массой 210–240 грамм. Лабораторные животные содержались на базе учебно-производственного отдела ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Все исследования были предварительно рассмотрены и одобрены на заседании независимого этического комитета при ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 54, от 11.10.2017 г.). Этические принципы соответствовали «Правилам, принятым в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986), болезненные манипуляции выполняли после общей анестезии препаратом Золетил 100 («Virbac», Франция, 10 мг/кг, в/м).

Лабораторные животные были разделены на следующие группы:

1. Контрольная группа: интактные животные (1-я группа, $n = 20$), содержащиеся в таких же условиях, что и крысы опытных групп, но которым не выполнялось моделирование сахарного диабета или алкогольной интоксикации, а также не вводили никакие средства для метаболической коррекции.

2. Группы сравнения: животные по 20 особей в группах, на которых выполнялось моделирование аллоксанового диабета или алкогольной интоксикации без проведения коррекции:

- 2-я группа ($n = 20$) – лабораторные животные, которым выполнялось моделирование аллоксан-индуцированного сахарного диабета. Для создания экспериментальной модели животным после суточного голодания внутривентриально однократно вводили аллоксана моногидрат в дозировке 150 мг/кг;

- 3-я группа (n = 20) – крысы, которые подвергались алкоголизации в течение 2-х месяцев. Для создания экспериментальной модели животным полностью заменяли стандартный пищевой рацион на раствор этилового спирта. При этом для постепенного привыкания животных в первую неделю крысы получали 10 % этанол, в течение 2-й недели – 20 % этанол, а начиная с 3-й недели и до конца эксперимента крысы получали 30 % этиловый спирт;
- 4-я группа (n = 20) – животные с сочетанной формой патологического процесса. Для моделирования патологического процесса крысам 4-й группы начинали проведение алкоголизации по той же схеме, что и крысам 3-й группы, но спустя месяц после начала алкоголизации 10 % этиловым спиртом вводили аллоксана моногидрат в дозировке 150 мг/кг с продолжением наблюдения еще в течение месяца и введением этанола до конца эксперимента (рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 – Схема проведения эксперимента

3. Основные опытные группы: животные по 15 особей в группах, на которых выполнялось моделирование хронической алкогольной интоксикации по схеме, описанной для 3-й группы крыс, на фоне метаболической коррекции:

- 5-я группа (n = 15) – крысы, которым на фоне хронической алкогольной интоксикации, продолжающейся в течение 1 месяца, вводили адеметионин 10 мг/сут (Гетрал, Эбботт С.р.Л., Италия) в течение месяца, в течение которого также продолжали введение этилового спирта;
- 6-я группа (n = 15) – крысы, которые на фоне хронической алкогольной интоксикации, продолжающейся в течение 1 месяца, получали метионин 100 мг/кг/сут перорально с питьевым рационом в течение месяца, в течение которого также продолжали введение этилового спирта;
- 7-я группа (n = 15) – крысы, которые на фоне хронической алкогольной интоксикации, продолжающейся в течение 1 месяца, получали липоевую кислоту (Октолипен, Фармстандарт-Лексредства, Россия) перорально 100 мг/кг/сут с питьевым рационом в течение месяца, в течение которого также продолжали введение этилового спирта;
- 8-я группа (n = 15) – крысы, которым на фоне хронической алкогольной интоксикации, продолжающейся в течение 1 месяца, вводили липоевую кислоту (Октолипен, Фармстандарт-Лексредства, Россия) внутрибрюшинно 50 мг/кг/сут в первую неделю, затем переходили на пероральное введение аналогичного препарата в дозировке 100 мг/кг/сут до конца эксперимента, в течение которого также продолжали введение этилового спирта;
- 9-я группа (n = 15) – крысы, которым на фоне хронической алкогольной интоксикации, продолжающейся в течение 1 месяца, вводили липоевую кислоту только внутрибрюшинно в дозировке 50 мг/кг/сут до конца эксперимента, при этом продолжали алкоголизацию животных еще в течение месяца.

2.2. Подготовка биологического материала к исследованиям

На этапе выведения животных из эксперимента у них проводился забор биологического материала для лабораторных исследований: кровь и печень.

Кровь забирали из нижней полой вены в объеме 3–4 мл в шприцы с гепарином натрия в соотношении 10 : 1. После центрифугирования при 3000 об/мин на стандартной общелабораторной центрифуге разделяли плазму крови и взвесь форменных элементов. Проводили процедуру отмывания эритроцитарной массы путем ресуспендирования взвеси форменных элементов в физиологическом растворе в соотношении 1 : 9 с последующим осаждением путем центрифугирования и трехкратным повторением данной манипуляции. В ходе отмывания также удаляли лейкоцитарную пленку на поверхности эритроцитарной массы. Таким образом, получали чистую взвесь эритроцитов, из которой готовили гемолизаты в холодной дистиллированной воде в соотношении эритроциты : вода 1 : 9, 1 : 99, 1 : 999 для определения содержания метаболитов и активности ферментов.

Для изучения патобиохимических изменений на местном уровне забирали печень, из которой выделяли суспензию митохондрий и цитозольную фракцию. Выделение митохондрий осуществляли методом дифференциального центрифугирования в сахарозной среде (состав среды : 250 мМ сахараза, 1 мМ ЭГТА и 2 мМ хлорид магния в 0,02 М трис-НСl буфере с рН 7,4). Для этого после мягкой гомогенизации печени проводили 1 центрифугирование при 1000 g в течение 5 минут при охлаждении до 2 °С (в центрифуге Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Германия). На этом этапе происходило осаждение крупных неразрушенных структур – клетки, ядра, куски межклеточного матрикса и т.п. Далее супернатант подвергали 2-му центрифугированию при 12000 g в течение 10 минут, в процессе которого уже осаждались митохондрии, которые затем еще однократно отмывали в чистой сахарозной среде. Полученный на 2-м этапе центрифугирования супернатант использовали в качестве цитозольной фракции. В суспензии митохондрий и цитозольной фракции определяли концентрацию белка с помощью реактива Брэдфорд (краситель Кумасси) и готовили рабочие растворы с конечной концентрацией белка 5 мг/мл в цитозоле и 1 мг/мл в митохондриальной суспензии [А.В. Панов, 2015].

2.3. Биохимические методы исследования

Для оценки патобиохимических изменений в крови и гомогенате печени животных определяли ряд биохимических показателей, характеризующих состояние углеводного обмена, повреждения печени, прооксидантно-антиоксидантной системы, эндогенной интоксикации и функционального состояния митохондрий печени. Лабораторные исследования проведены на базе учебно-исследовательской лаборатории кафедры фундаментальной и клинической биохимии и лаборатории Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

2.3.1. Определение функционального состояния антиоксидантно-прооксидантной системы

Для оценки функционального состояния прооксидантно-антиоксидантной системы выполняли определение маркеров окислительного повреждения биомолекул и активности системы антиоксидантной защиты крови и гомогената печени, включая цитозольную и митохондриальную фракции.

В плазме крови, цитозольной фракции и суспензии митохондрий определяли общую антиоксидантную активность железомвосстанавливающим методом (FRAP метод). Методика основана на определении способности биожидкости восстанавливать ионы Fe^{3+} до Fe^{2+} , которые дают красный окрашенный продукт при взаимодействии с 2,2'-дипиридиллом, который также заранее вносится в реакционную смесь. Интенсивность окраски (максимум поглощения 520 нм) прямо пропорциональна концентрации ионов двухвалентного железа и восстанавливающей (антиоксидантной) способности используемой биожидкости (плазма крови). Для выражения полученных результатов в удобную общепринятую форму выполняли построение калибровочного

графика с использованием разных концентраций аскорбиновой кислоты, в mM раствора которой выражали общую АОА плазмы крови [O. Kosakowska et al., 2018; K. Popov et al., 2021].

В эритроцитарной взвеси и в цитозольной фракции гомогената определяли содержания продуктов окислительных модификаций биомолекул по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Метод основан на реакции карбонильных групп продуктов окисления липидов и белков с ТБК с образованием так называемых ТБК-реактивных продуктов, имеющих кирпично-красную окраску, интенсивность которой прямо пропорциональна их концентрации и регистрируется фотометрически при 450 и 532 нм [В.С. Камышников, 2004].

В эритроцитарной взвеси и в цитозольной фракции гомогената определяли содержание восстановленного глутатиона по реакции с дитиобиснитробензойной кислотой (ДТНБ, реагент Элмана) в результате которой высвобождается окрашенный тионитрофенильный анион (максимум поглощения 412 нм). Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию SH-групп. При этом основным низкомолекулярным тиолсодержащим соединением клетки является глутатион, поэтому с учетом предварительной депротенинизации сульфосалициловой кислотой можно принять, что уровень небелковых тиоловых групп эритроцитарной взвеси соответствует содержанию анализируемого трипептида, точнее его восстановленной форме [А.И. Карпищенко, 2002; И.М. Быков и соавт., 2018].

В плазме крови определяли уровень общих тиоловых групп по реакции с дитиобиснитробензойной кислотой. В данном случае методика была аналогична определению уровня глутатиона в эритроцитах, однако не выполнялась депротенинизация. Низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в плазме крови минимальное количество, поэтому можно ими пренебречь и считать все определяемые SH-группы функциональными группами остатков цистеина в составе белков [К.А. Попов и соавт., 2017].

В эритроцитарной взвеси и в цитозольной фракции гомогената определяли активность ферментов системы антиоксидантной защиты : супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). Ферментативную активность определяли традиционными энзиматическими методами, основанными на регистрации убыли субстрата или появления продукта в единицу времени. Эритроцитарную взвесь предварительно подвергали гемолизу холодной дистиллированной водой с приготовлением гемолизатов 1 : 9, 1 : 99 и 1 : 999. Активность СОД определяли по способу, основанному на регистрации степени торможения аутоокисления кверцетина в тест-системе с генерацией супероксидного анион-радикала в слабощелочной среде с внесением ТМЭДА (тетраметилэтилендиамин). Результаты выражали в % снижения уровня окисленной формы кверцетина при внесении биожидкости (гемолизат 1 : 99) относительно контрольной пробы с внесением дистиллированной воды вместо крови [В.А. Костюк и соавт., 1990]. Для определения активности КАТ использовали простой метод, основанный на спектрофотометрической (при 260 нм) регистрации скорости разложения пероксида водорода после внесения в реакционную смесь гемолизата эритроцитов [А.И. Карпищенко, 2002]. Для определения активности ГПО использовали способ, основанный на определении скорости расходования восстановленной формы глутатиона в реакции с гидроперекисью трет-бутила. Об изменении концентрации глутатиона судили по реакции с реактивом Элмана, как описано выше [А.И. Карпищенко, 2002; И.М. Быков и соавт., 2018]. Активность ГР определяли по методике, основанной на регистрации скорости окисления НАДФН при его использовании для регенерации окисленной формы глутатиона изучаемым ферментом. О скорости расходования НАДФН в реакционной смеси судили традиционным спектрофотометрическим способом – по снижению оптической плотности раствора при 340 нм [А.И. Карпищенко, 2002].

2.3.2. Определение маркеров повреждения печени

Для лабораторной оценки повреждения печени выполняли определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и концентрации общего белка плазмы крови. Определение всех изученных параметров проводили с использованием реагентов Randox Laboratories (Великобритания) и автоматического биохимического анализатора Super Z (Китай).

2.3.3. Определение показателей углеводного и липидного обмена

Для изучения липидного профиля выполняли определение содержания общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) с использованием реагентов Randox Laboratories (Великобритания) и автоматического биохимического анализатора Super Z (Китай).

Для оценки глубины нарушений углеводного обмена у животных на фоне моделирования аллоксан-индуцированного сахарного диабета определяли концентрацию глюкозы плазмы крови после сбора крови в пробирки с гепарином натрия и фторидом натрия (5 мг/мл). Определение уровня глюкозы крови осуществляли также с использованием реагентов Randox Laboratories (Великобритания) и автоматического биохимического анализатора Super Z (Китай).

2.3.4. Определение маркеров эндотоксикоза

Выраженность развития эндогенной интоксикации у лабораторных животных на фоне патологического процесса оценивали по содержанию веществ со средней и низкой молекулярной массой (ВСиНММ) в плазме крови и эритроцитарной взвеси. ВСиНММ – комплекс соединений биологических жидкостей, которые остаются после депротеинизации с использованием трихлоруксусной кислоты в конечной концентрации 5 %.

В норме определяется обширный спектр таких низкомолекулярных соединений, включающий такие вещества как мочевины, глюкоза, холестерин, мочевая кислота и другие. Однако содержание таких соединений в плазме крови или других биожидкостях можно рассматривать как биохимические константы, которые в норме поддерживаются в пределах определенных нормальных значений. Эндогенная интоксикация сопровождается разрушением собственных тканей или клеток микроорганизмов и массивным выбросом продуктов их деградации в кровь, что характеризуется резким увеличением содержания ВСиНММ. Таким образом, данный параметр является неспецифическим, однако позволяет судить об общем уровне эндотоксикоза или степени тяжести патологического состояния. Для определения субстратов эндотоксикоза к 1,0 мл отмытой эритроцитарной взвеси, разбавленной в 2 раза физиологическим раствором, или к 1,0 мл плазмы крови добавляли 0,5 мл 20 % холодной трихлоруксусной кислоты. Спустя 10 минут инкубации для полной денатурации белков центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут. Затем отбирали 0,5 мл супернатанта, разбавляли дистиллированной водой в 10 раз и снимали спектр в УФ-области на длинах волн 238–298 нм с шагом сканирования 2 нм. О содержании ВСиНММ судили по площади под кривой полученного спектра после корректировки на спектр поглощения холостой пробы, выполненной так же как опытная, только без биожидкости [С.В. Якубовский, С.В. Ткачев, 2008].

2.3.5. Определение функционального состояния митохондрий печени

Интегральной характеристикой, отражающей функциональное состояние митохондрий, может служить способность их генерировать мембранный потенциал, от которого зависит в первую очередь способность синтезировать АТФ, но также другие функции, такие как определение

направления транспорта веществ, контроль качества органелл и др. Для определения мембранного потенциала митохондрий в нашей работе использовали катионный флуоресцентный краситель сафранин О (AppliChem, США) в конечной концентрации в реакционной смеси 1 мкМ. В энергизированном состоянии при внесении в суспензию митохондрий сукцината натрия матрикс заряжается отрицательно, относительно межмембранного пространства, поэтому в матрикс активно заходят молекулы сафранина О. При увеличении локальной концентрации красителя наблюдается эффект тушения флуоресценции, таким образом в энергизированном состоянии интенсивность сигнала флуоресценции снижается. Для выполнения лабораторной методики использовали суспензию митохондрий с концентрацией белка 0,3 мг/мл в реакционной смеси. Энергизацию осуществляли внесением в реакционную смесь 10 мкМ ротенона и 5 мМ сукцината. Для деэнергизации в реакционную смесь вносили ингибитор цитохромов 1 мМ азид натрия. Для регистрации интенсивности сигнала флуоресценции использовали спектрофлуориметр SM 2203 (Solar, Беларусь), длине волны возбуждения – 495 нм, длина волны испускания – 586 нм. Измерения выполняли при 25 °С и постоянном перемешивании. Расчет мембранного потенциала митохондрий осуществляли теоретическим расчетным методом [И.В. Перевощикова и соавт., 2009; В.Т. Чещевик, 2010].

2.3. Статистический анализ результатов исследования

Для статистического анализа результатов исследования использовали AnalystSoft Inc., StatPlus (Версия 7, см. www.analystsoft.com/ru/). Перед выполнением основной части статистической обработки данных, включающей сравнение показателей различных выборок, определялись с методами анализа. Для этого, прежде всего, выполняли оценку характера

распределения показателей, в большинстве случаев распределение показателей в выборках отличалось от нормального закона, описываемого Гауссовой функцией. Это обусловило выбор непараметрических методов сравнения данных. При этом сравнение показателей разных групп лабораторных животных основывалось на определении критерия Краскела-Уоллиса, а при выявлении статистически значимых отличий (при условии $p \leq 0,05$) выполняли попарное сравнение показателей групп с учетом критерия Манна-Уитни. В данном случае также различия принимали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3.

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

В экспериментальных условиях наиболее распространенной моделью является алкоголизация путем острого или хронического введения этилового спирта животным с уже сформированным СД путем введения аллоксана или стрептозоцина лабораторным животным. В качестве лабораторных животных в более чем 90 % случаев используют белых крыс-самцов различных линий. На наш взгляд более логичной экспериментальной моделью является формирование СД на фоне предварительного и постепенного развития хронической алкогольной интоксикации. Такие условия на наш взгляд больше соответствуют реальной клинической ситуации, поскольку чаще СД 2 типа развивается у взрослого населения после 40 лет уже с той или иной стадией алкоголизма, в сравнении с обратной ситуацией, когда люди начинают употреблять алкоголь после развития метаболического синдрома и диабета. Также маловероятной ситуацией представляется развитие СД 1 типа, формирующегося преимущественно в молодом возрасте, на фоне хронической алкогольной интоксикации и алкоголизма. С учетом вышеизложенного была предложена модель формирования экспериментального аллоксанового диабета у белых нелинейных крыс-самцов после месячной алкоголизации путем полного замещения стандартного водного рациона на растворы этилового спирта с возрастающей концентрацией – в первую неделю 10 %, во вторую – 20 %, с третьей недели – 30 %. При этом алкоголизация животных продолжалась и после введения аллоксана еще в течение месяца.

3.1. Изменение обмена веществ у животных с экспериментальной моделью аллоксанового диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации

Для характеристики повреждения печени были исследованы классические ферментные маркеры цитолитического синдрома – активность ЛДГ, АСТ и АЛТ в плазме крови лабораторных животных. В ходе проведенных исследований были получены вполне прогнозируемые результаты. Так было установлено, что моделирование аллоксанового диабета не сопровождается статистически значимыми изменениями активности вышеуказанных ферментов в плазме крови. В тоже время отмечалось существенное увеличение показателей цитолиза гепатоцитов на фоне хронической алкогольной интоксикации. Значение активности ЛДГ в плазме крови крыс 3-й группы было увеличено в сравнении с контрольной группой в 2,2 раза. Активность АЛТ также была увеличена спустя 2 месяца алкоголизации крыс и достигала значений, превышающих контрольные на 71 %. Активность другой аминотрансферазы – АСТ существенных изменений у лабораторных животных 2-4-й групп не претерпевала (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Изменения маркеров цитолитического синдрома у животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Ме (Q1-Q3))

Группа, № №	Показатели		
	ЛДГ, ед/л	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л
1 (контрольная)	86,4 (77,2/105,8)	23,5 (19,4/24,5)	44,6 (42,9/47,9)
2 (СД)	113,3 (95,8/125,0)	23,4 (22,0/24,3)	47,6 (44,2/50,5)
3 (А)	193,6* (175,5/220,1)	40,2* (35,8/48,9)	45,3 (40,3/47,6)
4 (А+СД)	285,2*^# (247,5/302,1)	50,7*^ (42,6/65,6)	49,3 (47,8/55,5)

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Одновременное моделирование аллоксанового диабета и хронической алкогольной интоксикации у животных 4-й экспериментальной группы ожидаемо сопровождалось еще более значительным увеличением маркеров цитолитического синдрома – активности АЛТ и ЛДГ. Активность ЛДГ в данном случае возростала до уровня значений, превышающих контрольные в 3,3 раза. Активность АЛТ в плазме крови крыс 4-й группы превышала значение аналогичного показателя 1-й группы в 2,2 раза. Кроме того, были выявлены статистически значимые отличия между показателями активности ЛДГ в плазме крови крыс 4-й и 3-й групп. У животных с сочетанной формой патологического процесса активность анализируемого фермента была на 48 % выше. Активность АЛТ у животных 4-й группы также превышала значение параметра крыс 3-й группы на 26 %, однако анализ данных не позволил сделать вывод о наличии отличий показателей этих 2-х групп, выявленные отличия можно охарактеризовать как тенденцию (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Изменения концентрации глюкозы и общего белка в плазме крови у животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Me (Q1-Q3))

Группа, № №	Показатели	
	Глюкоза, ммоль/л	Общий белок, г/л
1 (контрольная)	6,40 (5,90/6,91)	58,2 (56,9/60,0)
2 (СД)	10,65 (10,26/11,56) *	59,5 (57,5/60,7)
3 (А)	6,76 (6,08/7,02)	55,9 (54,9/57,0)*
4 (А+СД)	12,93 (12,19/14,68) *^#	56,6 (55,2/57,5)*^

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Определение концентрации глюкозы в плазме крови ожидаемо показало ведущее влияние моделирования аллоксанового диабета. У экспериментальных животных 2-й группы уровень данного показателя превышал значение контрольного параметра на 66 %, а для крыс 4-й группы

было характерно еще более существенное возрастание уровня гликемии – до цифр, превышающих контрольные в 2,0 раза. Также были выявлены статистически значимые отличия уровня гликемии у крыс 2-й и 4-й групп. У животных последней группы концентрация глюкозы плазмы крови была на 21 % выше (таблица 3.3). Хроническая алкогольная интоксикация сама по себе в данных экспериментальных условиях не оказывала существенного влияния на уровень гликемии у животных.

Концентрация общего белка плазмы крови не претерпевала изменений у животных, которым выполняли моделирование СД, однако была в равной степени снижена в крови особей крыс 3-й и 4-й групп. У животных данной групп содержание общего белка плазмы крови в среднем на 4 % было ниже контрольных значений соответствующего показателя.

Таблица 3.3 – Изменения липидного профиля плазмы крови у животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Ме (Q1-Q3))

Группа, № №	Показатели			
	ОХС, ммоль/л	ХС-ЛПВП, ммоль/л	ХС-ЛПНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л
1 (контрольная)	3,14 (2,95/3,39)	0,91 (0,84/0,95)	2,04 (1,90/2,15)	0,42 (0,35/0,52)
2 (СД)	5,22* (4,86/5,42)	0,87 (0,80/0,94)	4,05* (3,65/4,22)	0,65* (0,52/0,70)
3 (А)	3,53 (3,24/3,70)	0,95 (0,88/0,98)	1,96 (1,85/2,11)	0,72* (0,59/0,77)
4 (А+СД)	5,05*# (4,75/5,30)	0,85 (0,80/0,90)	3,80*# (3,58/4,04)	0,70* (0,62/0,78)

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Изменения липидного профиля плазмы крови животных были в основном продиктованы развитием аллоксанового диабета. У животных 2-й группы на фоне СД был статистически значимо увеличен уровень концентрации общего холестерина на 66 %, концентрация холестерина липопротеинов низкой плотности была увеличена в 2,0 раза. Аналогичные значения рассматриваемых показателей были определены и у крыс 4-й

группы, которым моделировали аллоксановый диабет на фоне хронической алкоголизации. Кроме того, у животных всех опытных групп, включая крыс только с хронической алкогольной интоксикацией, была определена увеличенная на 54–71 % концентрация триглицеридов плазмы крови.

3.2. Изменение маркеров окислительного стресса у животных с экспериментальной моделью аллоксанового диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации

Для характеристики окислительного стресса, имеющего ведущее значение в развитии поздних сосудистых осложнений СД и поражения печени при алкогольной интоксикации, был определен комплекс показателей плазмы крови и эритроцитарной взвеси, отражающих и состояние антиоксидантной системы, и уровень окислительных повреждений биомолекул (рисунок 3.1).

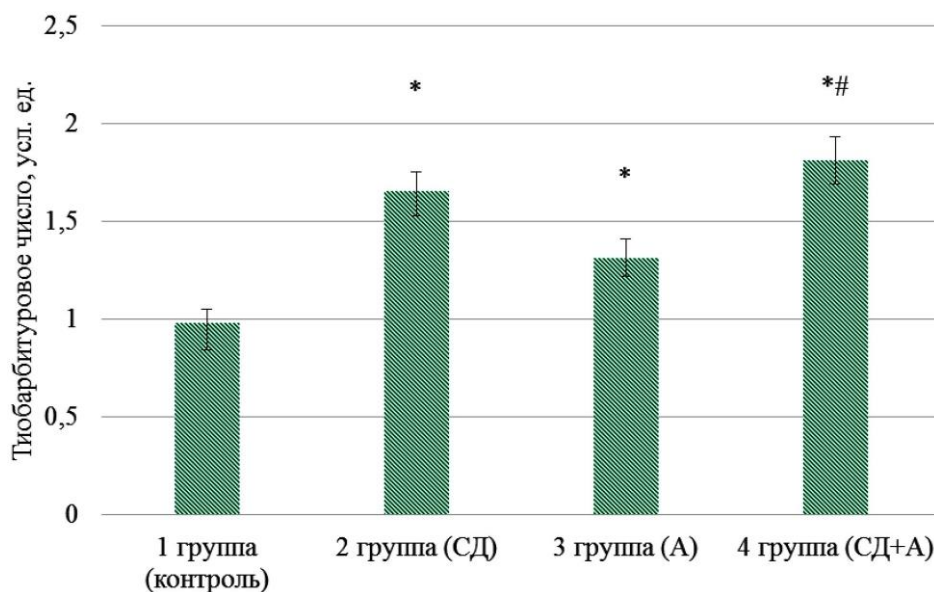


Рисунок 3.1 – Изменение содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Me (Q1-Q3)).

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Для интегральной оценки уровня оксидативного стресса была определена концентрация ТБК-реактивных продуктов в отмытой эритроцитарной взвеси. У всех основных групп лабораторных животных уровень данного показателя был статистически значимо выше уровня значения соответствующего параметра контрольной группы. Так на фоне хронической 2-х месячной алкоголизации животных содержание продуктов окислительных модификаций биомолекул было увеличено на 34 %. Более высокие значения анализируемого показателя были определены у крыс на фоне моделирования экспериментального СД. Так у крыс 2-й групп содержание ТБК-реактивных продуктов превышало уровень контрольных значений показателя на 68 %, а для животных 4-й группы были характерны еще более высокие цифры – на 85 % превышающие контрольные. Однако статистически значимых отличий между показателями особей животных 2-й и 4-й групп выявлено не было (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Изменения активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитарной взвеси у животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Ме (Q1-Q3))

Группа, № №	Показатели	
	СОД, усл. ед.	КАТ, ммоль/л×мин
1 (контрольная)	65,22 (62,89/67,05)	16,24 (15,84/20,85)
2 (СД)	56,77 (56,02/58,00) *	9,42 (7,96/10,74) *
3 (А)	58,40 (56,7/62,7) *	11,24 (10,54/14,02) *
4 (А+СД)	46,07 (45,14/50,10) *^#	13,08 (11,39/15,25) *^

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Исследование ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов лабораторных животных показало сниженные значения супероксиддисмутазной и каталазной активности во всех опытных группах. В изменениях активности СОД четко прослеживается зависимость от

сочетанной или изолированной формы патологического процесса. Так на фоне моделирования аллоксанового диабета или хронической алкоголизации животных активность СОД в эритроцитарной взвеси была сниженной на 10–13 %, а у животных 4-й группы с сочетанной формой патологии значение анализируемого показателя отставало от контрольных цифр на 29 %. Для изменений активности каталазы была характерна иная зависимость. Каталазная активность эритроцитарной взвеси животных 2-й и 3-й групп в сравнении с контролем была снижена в меньшей степени, чем уровень аналогичного показателя крыс 4-й группы. Наиболее низкие значения рассматриваемого параметра крови были определены у животных 2-й группы, которым выполняли моделирование СД путем введения аллоксана. Активность каталазы в биожидкости животных данной группы была на 42 % ниже контрольных цифр. На 31 % ниже контрольного уровня было значение активности анализируемого фермента антиоксидантной защиты в крови животных 3-й группы. В эритроцитах крыс 4-й группы каталазная активность была ниже уровня контрольного значения показателя только на 19 % (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Изменения показателей системы глутатиона эритроцитарной взвеси у животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Me (Q1-Q3))

Группа, № №	Показатели		
	ГПО, мкмоль/л×мин	ГР, мкмоль/л×мин	GSH, мкмоль/мл
1 (контрольная)	330,2 (300,55/358,69)	742,23 (650,30/800,25)	2,44 (2,29/2,62)
2 (СД)	553,30* (502,10/585,96)	1021,03* (911,80/1131,57)	1,68* (1,61/1,74)
3 (А)	496,59* (423,14/507,09)	1392,1* (1297,9/1411,5)	1,66* (1,51/2,06)
4 (А+СД)	347,99^# (328,69/414,68)	961,9*# (889,14/1124,81)	1,69* (1,63/2,14)

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Для характеристики изменений тиолового гомеостаза у лабораторных животным выполняли определение следующих параметров системы глутатиона : концентрацию восстановленной формы глутатиона, активность ферментов метаболизма глутатиона – ГПО и ГР. Концентрация восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси животных основных экспериментальных групп составляла в среднем 1,66–1,69 мкмоль/мл, что было ниже контрольных значений соответствующего показателя на 31–32 %. При этом отличий данного показателя между 2–4-й группами крыс выявлено не было в отличие от активности ферментов. Активность обоих изученных ферментов имела тенденцию к увеличению в эритроцитах крыс основных экспериментальных групп. Так активность ГР у животных с аллоксан-индуцированным СД превышала контрольные цифры на 38 %, а у крыс, подвергавшихся хронической алкоголизации в течение 2-х месяцев – на 88 %. В эритроцитарной массе лабораторных животных 4-й группы активность ГР была увеличена на 30 %, что было ближе к значению показателя 2-й группы. Активность ГПО эритроцитов крыс 2-3-й групп была увеличена примерно в одинаковой степени – на 50–68 % относительно уровня значения аналогичного параметра контрольной группы животных. Однако у крыс 4-й группы данный параметр не отличался от значения показателя 1-й группы. Таким образом были определены некоторые отличия в состоянии системы глутатиона у животных разных опытных групп, в том числе были зафиксированы особенности статуса тиолового гомеостаза у животных с сочетанной формой патологического процесса по сравнению с изолированным моделированием аллоксанового диабета и хронической алкогольной интоксикации. Данные особенности заключались в менее выраженных изменениях, относительно контроля, активности ферментов метаболизма глутатиона при сниженной концентрации восстановленной формы трипептида γ -глутамилцистеинилглицина в равной степени с показателями крыс 2-й или 3-й экспериментальных групп (рисунок 3.2).

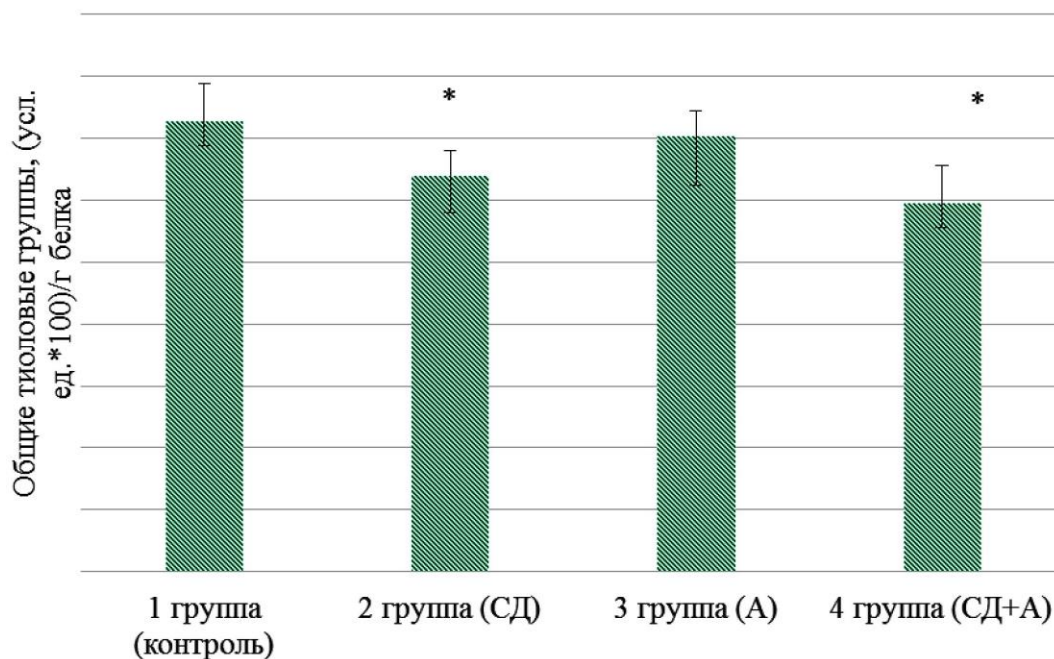


Рисунок 3.2 – Изменение уровня тиоловых групп плазмы крови животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Ме (Q1-Q3)).

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Также для характеристики тиолового гомеостаза определяли содержание общих сульфгидрильных (тиоловых, SH-групп) в плазме крови, представленных прежде всего функциональными группами остатков цистеина в составе белков. В результате проведенных исследований было установлено сниженное значение уровня сульфгидрильных групп белков плазмы крови у крыс 2-й и 4-й групп, то есть у животных с изолированной моделью СД или с моделью СД на фоне 2-х месячной алкоголизации. У животных 2-й группы уровень анализируемого показателя был ниже контрольных цифр на 12 %, а у крыс 4-й группы – на 18 %. Для животных 3-й группы были характерны значения данного показателя, статистически значимо не отличающиеся от уровня контроля (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Изменения маркеров эндогенной интоксикации у животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Ме (Q1-Q3))

Группа, № №	Показатели	
	ВСиНММ плазмы крови, усл. ед.	ВСиНММ эритроцитарной взвеси, усл. ед.
1 (контрольная)	8,8 (8,2/9,3)	13,9 (13,5/14,4)
2 (СД)	10,3 (9,8/10,6)*	19,7 (17,8/21,0)*
3 (А)	11,2 (10,7/11,7)*	34,0 (30,5/36,2)*
4 (А+СД)	10,8 (10,4/11,3)*^	24,6 (22,3/27,1)*^#

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Оценка эндогенной интоксикации, выполненная путем определения суммарного содержания веществ со средней и низкой молекулярной массой в трижды отмытой эритроцитарной взвеси и плазме крови, показала увеличенное количество потенциально токсических субстратов в биожидкостях организма животных 2–4-й групп. Для животных 2-й группы было характерно увеличенное относительно уровня контрольных цифр значение содержания эндотоксинов плазмы крови на 17 % и эритроцитарной взвеси – на 42 %. Еще более высокие значение рассматриваемого показателя были определены в крови крыс на фоне хронической алкогольной интоксикации. В данном случае уровень плазменной фракции веществ со средней и низкой молекулярной массой превышал контрольные значения на 27 %, а уровень эритроцитарной фракции эндотоксинов был увеличен в 2,4 раза. Содержание субстратов эндотоксикоза в крови крыс 4-й группы представляло собой среднее между значениями показателей групп с изолированным моделированием СД или хронической алкогольной интоксикации. Так в плазме крови уровень токсических веществ превышал контрольные цифры на 23 %, а в эритроцитарной взвеси – на 77 %, что было выше значений соответствующих показателей 2-й опытной группы, но ниже значений показателей крысы 3-й группы (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Изменения флуоресцентных маркеров окислительного стресса и неферментного гликирования у животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Ме (Q1-Q3))

Группа, № №	Показатели		
	ПГБ, усл. ед.	Битирозин, усл. ед.	Флуоресценция триптофанилов, усл. ед.
1 (контрольная)	0,80 (0,76/0,90)	1,61 (1,50/1,68)	27,2 (27,0/28,6)
2 (СД)	1,35 (1,23/1,44)*	1,93 (1,83/2,05)*	18,9 (18,45/19,35)*
3 (А)	0,70 (0,68/0,82)	1,70 (1,64/1,77)	19,7 (19,6/20,3)*
4 (А+СД)	1,06 (1,00/1,15)*^#	1,88 (1,82/1,98)*	20,0 (19,4/20,4)*

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

Определение флуоресцентных показателей компонентов плазмы крови показало изменение у животных опытных групп, отражающие развитие окислительного стресса и интенсификацию неферментного гликирования белков. Уровень интенсивности флуоресценции продуктов гликирования белков был резко увеличен у животных, которым выполняли моделирование аллоксан-индуцированного диабета. Так у животных 2-й группы были определены максимальные значения данного параметра, превышающие контрольные цифры на 69 %. У крыс 4-й группы содержание продуктов неферментного гликирования было несколько ниже и достигало значений, превышающих контрольные на 33 %. Для животных 3-й группы были характерны нормальные значения анализируемого параметра, что было вполне прогнозируемо.

Содержание остатков битирозина – продукта окислительных модификаций белков было увеличено также только у лабораторных животных 2-й и 4-й групп. Значение данного показателя у крыс с аллоксановым диабетом при изолированном его моделировании или при моделировании на фоне алкоголизации превышало контрольные значения аналогичного параметра на 17–20 %. Определение интенсивности флуоресценции остатков триптофана (вкладом флуоресценции тирозина и фенилаланина как правило пренебрегают, не упоминая их по причине

сравнительно низкой интенсивности) показало также наличие статистически значимых изменений, определяемых у лабораторных животных всех основных групп. Было зафиксировано снижение интенсивности собственной флуоресценции триптофанилов белков плазмы крови на 26–31 % у животных 2–4-й групп без статистически значимых отличий при сравнении значения показателей отдельных групп друг с другом.

Более высокая интенсивность флуоресценции характерна для зонда – 1-анилино-8-нафталинсульфоновой кислоты (АНС), который имеет несколько (4–5) мест связывания с человеческим сывороточным альбумином. В бычьем сывороточном альбумине идентифицирован 1 центр связывания. Интенсивность его флуоресценции сильно зависит от характера окружения и резко возрастает в неполярном окружении. В нашем исследовании было показано изменение данного параметра в экспериментальных исследованиях (рисунок 3.3).

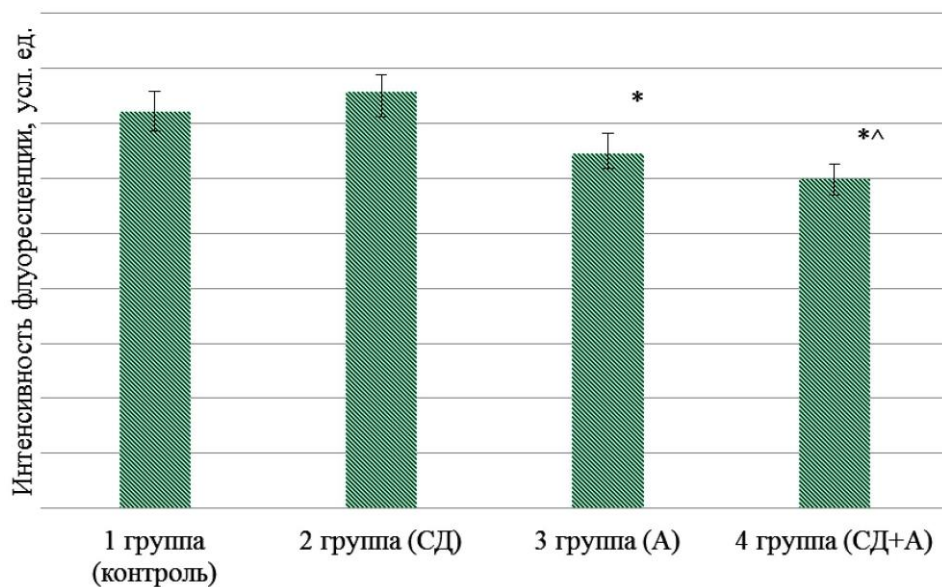


Рисунок 3.3 – Изменение интенсивности зондовой флуоресценции АНС в плазме крови животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета (Ме (Q1-Q3)).

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 2-й и 4-й групп; # – наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей 3-й и 4-й групп.

В результате проведенной оценки интенсивности флуоресценции АНС было показано снижение данного параметра на фоне хронической алкогольной интоксикации на 11 % относительно нормальных значений, полученных при исследовании группы интактных животных. Проведение моделирования аллоксан-индуцированного диабета на фоне хронической алкоголизации животных сопровождалось еще более глубоким снижением данного показателя, который был ниже уровня контрольного параметра на 17 %. Моделирование изолированной формы СД не сопровождалось статистически значимыми изменениями флуоресценции АНС в плазме крови.

Таким образом, проведение исследований показало наличие особенностей повреждения печени и метаболических нарушений в условиях совместного экспериментального моделирования аллоксан-индуцированного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации. Однозначно усиливается на фоне сочетанного течения патологического процесса повреждение печени и нарушения углеводного обмена. При этом изменения липидного профиля и нарушения окислительного метаболизма были в основном продиктованы СД, что подтверждалось более близкими значениями показателей к значениям соответствующих параметров 2-й группы. В тоже время более высокий уровень эндогенной интоксикации у животных на фоне хронической алкоголизации оказывал ведущее влияние на аналогичные параметры у крыс 4-й группы.

ГЛАВА 4.

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

Центральным метаболическим органом организма человека и животных, обеспечивающим в том числе поддержание функциональной активности эндогенной системы антиоксидантной защиты, является печень. Печень принимает на себя основной удар окислительного стресса и особенно подвержена повреждению при хронической алкогольной интоксикации, поскольку является основной мишенью этилового спирта. Существуют разные подходы к гепатопротекции. В экспериментальных условиях хорошо себя зарекомендовал себя гептрал (адеметионин) – активная форма метионина, участвующая в реакциях трансметилирования при биосинтезе физиологически активных соединений и обезвреживании токсических веществ. Поэтому данный препарат в нашем исследовании был выбран в качестве эталонного (5 группа лабораторных животных). Для исследований возможностей коррекции окислительных повреждений при алкогольной интоксикации у крыс был выбран ряд серосодержащих соединений: свободная аминокислота – метионин и липоевая кислота в составе препарата октолипен, который вводили по разным схемам. Крысы 6-й группы получали метионин перорально, крысам 7-й группы в течение месяца вводили липоевую кислоту также перорально, животным 8-й группы начинали парентеральную терапию с использованием липоевой кислоты, которую проводили в течение недели, а затем переходили на пероральное введение октолипена. Крысам 9-й группы липоевую кислоту вводили внутрибрюшинно на протяжении всего периода коррекции. Таким образом

был разработан дизайн сравнительного исследования, который должен был ответить на несколько вопросов. Во-первых, представляет интерес сравнения эффективности введения метионина и его активной формы – адеметионина. Во-вторых, задачей было сравнение эффективности метионина и классического тиолсодержащего антиоксиданта – липоевой кислоты. В-третьих, продолжаются дискуссии относительно схеме терапии с использованием липоевой кислоты, которую можно вводить парентерально, а можно назначить пероральное введение. Нашей задачей было сравнить эффективность разных схем терапии с использованием данного тиолового антиоксиданта.

4.1. Влияние серосодержащих гепатопротекторов на показатели цитолитического синдрома и обмена веществ у животных с хронической алкогольной интоксикацией

Проведение экспериментального исследования повреждения печени на фоне хронической алкогольной интоксикации показало увеличение маркеров цитолиза гепатоцитов – активности ЛДГ и АЛТ в плазме крови. Активность ЛДГ была увеличена более значительно и превышала контрольные значения в 2,2 раза, а активность АЛТ – в 1,7 раза. Активность АСТ также была определена, что было указано в предыдущей главе, однако так как существенных ее изменений ее не было выявлено в данной главе она не представлена. Исследование эффективности использования серосодержащих препаратов для снижения цитолиза гепатоцитов показало неоднозначные результаты несмотря на широкую известность данных веществ как гепатопротекторов (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Показатели цитолитического синдрома у крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Ме (Q1-Q3))

Группа, №	Показатели плазмы крови	
	ЛДГ, ед/л	АЛТ, ед/л
1 (контрольная)	86,4 (77,2/105,8)	23,5 (19,4/24,5)
3 (сравнения)	193,6 (175,5/220,1)*	40,2 (35,8/48,9)*
5	58,0 (52,0/66,7)^	30,8 (26,8/32,0)*^
6	297,4 (250,3/320,8)*^	48,1 (44,6/50,2)*
7	167,3 (152,5/176,5)*	45,2 (42,1/47,5)*
8	142,1 (132,1/158,7)*^	45,2 (42,0/47,0)*
9	144,0 (130,0/151,3)*^	34,4 (31,2/35,8)*^

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

Введение гептрала животным с моделированием хронической алкогольной интоксикации показало наиболее высокую эффективность, заключающуюся в способности снижать проявления цитолитического синдрома. Активность ЛДГ в плазме крови крыс 5-й группы статистически значимо не отличалась от значения контрольного показателя, а средние цифры были даже ниже. Однако о наличии повреждения печени у животных данной группы свидетельствовало небольшое увеличение активности АЛТ в плазме крови, которая превышала контрольные цифры на 31 %. Введение животным не готовой активной формы S-аденозилметионина, а исходной аминокислоты метионина имело противоположный эффект – активность маркеров цитолиза увеличивалось еще более значительно, чем в группе сравнения. Активность ЛДГ в плазме крови достигала средних значений почти 300 ед/л, что было в 1,5 раза выше уровня животных группы сравнения. Активность АЛТ также была увеличена и достигала уровня, превышающего значения показателя группы сравнения на 20 %. Введение липоевой кислоты по какой-либо из схем оказывало слабое влияние на маркеры повреждения печени у крыс 7–9 групп. У животных 7-й группы, получавших препарат только в пероральной форме

вместе с питьевым рационом уровень активности ЛДГ и АЛТ не отличался от уровня активности данных ферментов плазмы крови крыс группы сравнения. Для животных 8-й группы, получавших комбинированную терапию, включающую первоначальное парентеральное введение липоевой кислоты в течение недели с дальнейшим переходом на пероральную форму введения, было характерно небольшое – на 26 % снижение активности ЛДГ, относительно группы сравнения, однако уровень активности АЛТ был таким же высоким. У животных 9-й группы активность обоих изученных лабораторных маркеров была ниже значений соответствующих показателей группы сравнения. Активность ЛДГ в плазме крови была снижена относительно 3-й группы также, как и у крыс 8-й группы на 25 %, а активность АЛТ – на 14 % (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Показатели липидного и углеводного обмена у крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q1-Q3))

Группа, №	Показатели плазмы крови	
	Глюкоза, ммоль/л	ОХС, ммоль/л
1 (контрольная)	6,40 (5,90/6,91)	3,14 (2,95/3,39)
3 (сравнения)	6,76 (6,08/7,02)	3,53 (3,24/3,70)
5	6,92 (6,48/7,22)	3,92 (3,54/4,02)*
6	7,01 (6,65/7,23)	2,81 (2,78/3,11)
7	7,05 (6,55/7,30)	2,92 (2,80/3,20)
8	5,90 (5,69/6,50)	3,00 (2,77/3,24)
9	6,35 (6,05/6,65)	3,22 (3,02/3,30)

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

Для оценки изменений обмена веществ выполняли определение концентрации глюкозы и общего холестерина в плазме крови лабораторных животных исследуемых групп. В результате проведенных исследований было установлено, что концентрация глюкозы в плазме крови всех групп испытуемых животных, представленных в данной главе, колебалась в

пределах 5,7–7,3 ммоль/л без статистически значимых отличий между показателями отдельных групп. Концентрация общего холестерина в плазме крови животных этих же групп находилась в пределах 2,8–3,7 ммоль/л за исключением крыс 5-й группы, получавших адеметионин, у которых уровень рассматриваемого показателя был статистически значимо выше контроля и достигал значений 3,5–4,0 ммоль/л.

4.2. Влияние серосодержащих гепатопротекторов на состояние окислительного гомеостаза в крови животных с хронической алкогольной интоксикацией

Для сравнения состояния окислительного гомеостаза у лабораторных животных на фоне хронической алкогольной интоксикации и метаболической коррекции с использованием различных серосодержащих веществ выполняли определение маркеров окислительного стресса и состояния системы антиоксидантной защиты, а также показатель функционального состояния митохондрий – мембранный потенциал митохондрий, выделенных из печени крыс.

В качестве интегрального показателя, комплексно отражающего состояние системы антиоксидантной защиты, определяли уровень общей антиоксидантной активности (АОА) железо-восстанавливающим способом (рисунок 4.1).

В результате проведенных исследований было установлено, что у животных группы сравнения значение общей АОА плазмы крови было снижено на 23 % относительно показателя контрольной группы. Проведение коррекции способствовало увеличению анализируемого показателя до уровня контрольной группы. На фоне введения метионина или его активной формы животным 5–6-й групп значение общей АОА было увеличено на

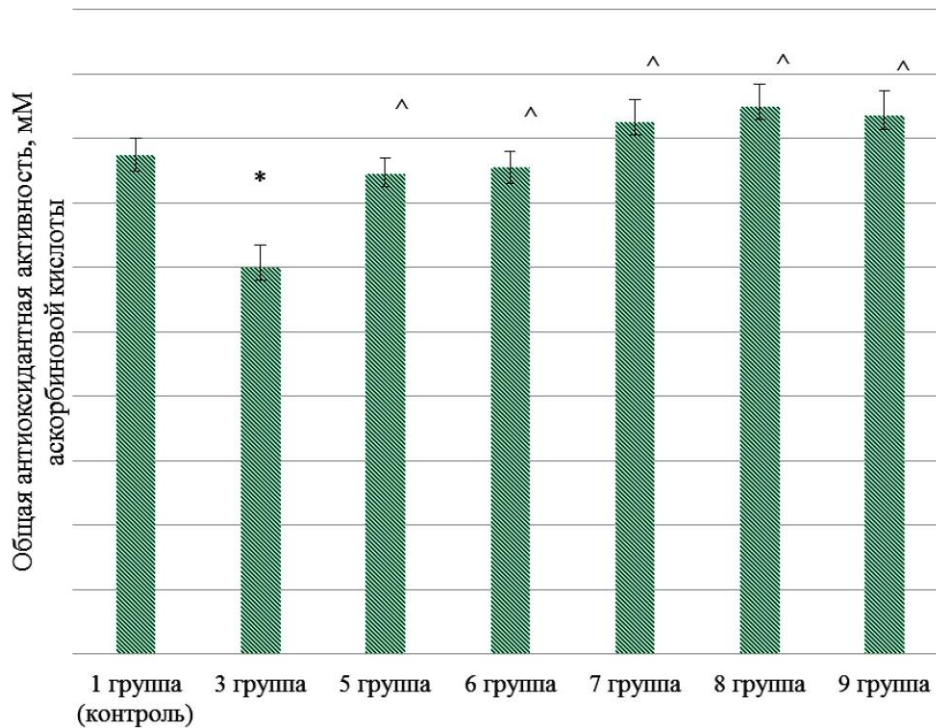


Рисунок 4.1 – Изменение общей антиоксидантной активности плазмы крови крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q1-Q3)).

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

24–26 % и достигало медианных значений 1,49–1,51 мМ аскорбиновой кислоты. Введение липоевой кислоты по любой из используемых схем способствовало более значительному росту антиоксидантной активности. У крыс 7–9-й групп уровень анализируемого показателя, превышал значение соответствующего параметра животных группы сравнения на 38–42 % и достигал медианных значений 1,65–1,7 ммоль/л аскорбиновой кислоты, что было даже немного выше контрольных цифр (1,55 ммоль/л аскорбиновой кислоты) (таблица 4.3).

Для оценки уровня окислительных повреждений определяли в эритроцитарной взвеси лабораторных животных ряд маркеров перекисного окисления липидов : содержание ТБК-реактивных продуктов, диеновых и триеновых конъюгатов. В крови крыс группы сравнения все три исследуемых

Таблица 4.3 – Активность ферментов антиоксидантной системы крови крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Ме (Q1-Q3))

Группа, №	Показатели		
	ТБЧ, усл. ед.	ДК, усл. ед. о. п.	ТК, усл. ед. о. п.
1 (контрольная)	0,98 (0,83/1,06)	0,15 (0,13/0,18)	0,09 (0,07/0,13)
3 (сравнения)	1,31* (1,24/1,43)	0,32* (0,26/0,35)	0,40* (0,35/0,43)
5	1,05^ (0,98/1,10)	0,30* (0,26/0,33)	0,24*^ (0,22/0,27)
6	1,33* (1,26/1,40)	0,32* (0,26/0,35)	0,29*^ (0,25/0,33)
7	1,13*^ (1,05/1,18)	0,38* (0,34/0,40)	0,24*^ (0,21/0,27)
8	1,00^ (0,96/1,05)	0,26* (0,22/0,28)	0,22*^ (0,20/0,25)
9	0,95^ (0,89/1,01)	0,29* (0,26/0,32)	0,20*^ (0,18/0,23)

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

показателя были значительно увеличены. Содержание ТБК-реактивных продуктов было увеличено на 34 %, диеновых конъюгатов – в 2,1 раза, а триеновых конъюгатов – в 4,4 раза относительно значений аналогичных показателей контрольной группы. На фоне введения адеметионина животным 5-й группы концентрация ТБК-реактивных продуктов не отличалась от уровня контрольных цифр, а содержание диеновых и триеновых конъюгатов было увеличено. При этом уровень диеновых конъюгатов соответствовал уровню аналогичного показателя группы сравнения, а содержание триеновых конъюгатов было ниже на 40 %. Использование метионина с целью метаболической коррекции способствовало снижению содержания триеновых конъюгатов на 28 %, тогда как остальные анализируемые маркеры окислительного стресса были на уровне значений соответствующих параметров группы сравнения. Введение липоевой кислоты демонстрировало в целом хороший эффект, направленный на снижение образование продуктов окислительных модификаций биомолекул. В случае получения животными липоевой кислоты в составе

питьевого рациона было достигнуто снижение содержания ТБК-реактивных продуктов на 14 % и триеновых конъюгатов – на 40 %. Уровень диеновых конъюгатов в эритроцитарной взвеси животных 7-й группы статистически значимо не отличался от значения аналогичного показателя группы сравнения. Более эффективным оказалось снижение рассматриваемых показателей на фоне введения липоевой кислоты в парентеральной форме животным 8-й и 9-й групп. В данном случае уровень ТБК-реактивных продуктов эритроцитарной массы был снижен до уровня контрольной группы. Снижение содержания диеновых конъюгатов было не таким очевидным, однако их концентрация в крови крыс 8-9-й групп была ниже, чем в 7-й группе на 24–32 %. Содержание триеновых конъюгатов в целом соответствовало уровню анализируемого параметра животных 7-й экспериментальной группы и было в 1,8–2,0 раза ниже значения показателя группы сравнения (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Активность ферментов антиоксидантной системы крови крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Ме (Q1-Q3))

Группа, №	Показатели		
	КАТ, моль/л×мин	ГПО, мкмоль/л×мин	GSH, мкмоль/мл
1 (контрольная)	16,2 (15,84/20,9)	330,2 (300,6/358,7)	2,4 (2,3/2,6)
3 (сравнения)	11,2 (10,54/14,0)*	496,6 (423,1/507,1)*	1,7 (1,5/1,9)*
5	14,8 (14,2/17,4)^	340,0 (300,5/360,2)^	1,7 (1,5/1,8)*
6	6,9 (6,2/7,6)*^	450,7 (420,2/470,8)*	1,7 (1,6/1,9)*
7	6,3 (5,9/7,0)*^	280,8 (250,0/305,4)^	1,9 (1,8/2,2)^
8	24,8 (20,3/26,0)*^	336,0 (308,3/359,2)^	1,9 (1,8/2,1)*
9	19,5 (16,5/21,5)^	342,1 (310,0/360,0)^	1,6 (1,5/1,8)*

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

Для характеристики функционального состояния системы антиоксидантной защиты проводили определение активности эффекторных

ферментов – каталазы и глутатионпероксидазы, а также концентрации SH-содержащего трипептида глутатиона. При этом было определено, что исходно сниженная на 29 % концентрация глутатиона эритроцитарной взвеси животных группы сравнения оставалась на таком же уровне и в условиях проведения коррекции с использованием различных серосодержащих веществ. Не удавалось поддержать систему тиолового антиоксиданта глутатиона даже с использованием липоевой кислоты. Максимальные значения данного показателя были определены в эритроцитах крови крыс 7-й группы, у которых было определено даже статистически значимое превышение значения показателя на 11 % при сравнении его с 3-й группой, однако сомнительно, что это имело значимый клинический эффект.

Активность ферментов антиоксидантной защиты изменялась у крыс разных групп на фоне коррекции более сложным образом. Как уже было указано ранее активность каталазы у животных группы сравнения на фоне хронической алкогольной интоксикации была сниженной на 31 %, а активность ГПО эритроцитарной взвеси наоборот была увеличенной относительно крыс контрольной группы на 50 %. Проведение метаболической коррекции с использованием S-аденозилметионина в составе гептрала способствовало наиболее выраженным изменениям активности анализируемых ферментов – их активность в эритроцитарной взвеси возвращалась к нормальным значениям, определенным в крови крыс контрольной группы. В крови животных 6-й группы, получавших свободный метионин, наблюдалось дальнейшее снижение каталазной активности, которая была ниже контрольного уровня в 2,3 раза, активность ГПО при этом оставалась на уровне значения показателя животных группы сравнения. Были выявлены значительные отличия показателей на фоне использования липоевой кислоты при разных способах введения. Только пероральный способ введения препарата сопровождался такими же низкими значениями активности каталазы, как и на фоне введения метионина, однако в данном

случае и активность ГПО также была сниженной – до уровня показателя 1-й группы лабораторных животных. У животных 8-й и 9-й групп каталазная активность была существенно увеличена и даже превышала уровень контрольных цифр. На фоне исключительно парентерального введения липоевой кислоты крысам 9-й группы активность КАТ превышала контрольные значения аналогичного показателя на 20 %, а в крови лабораторных животных 8-й группы еще значительно – на 53 %. Активность другого фермента – ГПО при этом снижалась относительно соответствующего показателя 3-й группы и достигала в крови крыс 8-й и 9-й групп уровня контрольных значений (таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Показатели уровня эндогенной интоксикации у крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q1-Q3))

Группа, №	Показатели плазмы крови	
	ВСиНММ плазмы крови, усл. ед.	ВСиНММ эритроцитарной взвеси, усл. ед.
1 (контрольная)	8,8 (8,2/9,3)	13,9 (13,5/14,4)
3 (сравнения)	11,2 (10,7/11,7)*	34,0 (30,5/36,2)*
5	9,0 (8,6/9,5)^	16,5 (15,7/18,0)*^
6	9,8 (9,5/10,3)*^	20,6 (18,7/22,2)*^
7	9,2 (8,7/9,5)^	16,4 (15,5/17,8)*^
8	9,5 (9,0/9,8)^	14,9 (14,6/16,0)*^
9	8,8 (8,5/9,4)^	14,9 (14,5/15,8)*^

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

Исследование уровня эндогенной интоксикации показало значительное увеличение концентрации веществ со средней и низкой молекулярной массой на фоне хронической алкогольной интоксикации, достигающее 27 % плазменной фракции и 245 % эритроцитарной фракции по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Проведение терапии с

использованием серосодержащих средств в разной степени способствовало снижению данных показателей. Содержание токсинов в плазменной фракции снижалось по сравнению с 3-й группой на фоне проведения коррекции во всех группах. Во всех группах животных, кроме 6-й, концентрация веществ со средней и низкой молекулярной массой снижалась в равной степени и достигала уровня контрольных цифр. Только в 6-й группе крыс уровень эндотоксинов в плазме крови оставался немного выше контроля – на 11 %. В эритроцитарной взвеси резко увеличенное содержание потенциально токсических субстратов на фоне терапии заметно снижалось. На фоне введения метионина уровень эритроцитарной фракции веществ со средней и низкой молекулярной массой было ниже значения показателя группы сравнения на 45 %. Введение аденозилметионина или липоевой кислоты по пероральной схеме способствовало еще более значительному снижению рассматриваемого параметра – на 51 % относительно группы сравнения. Наиболее высокая эффективность снижения уровня эндогенной интоксикации была выявлена при использовании липоевой кислоты у животных 8-й и 9-й групп. В данном случае уровень субстратов эндотоксикоза было на 56 % ниже, чем в крови крыс группы сравнения и всего на 7 % превышало значение показателя контрольной группы.

4.3. Влияние серосодержащих гепатопротекторов на состояние окислительного гомеостаза в печени животных с хронической алкогольной интоксикацией

Анализ изменений окислительного метаболизма в печени при моделировании хронической алкогольной интоксикации и проведении коррекции включал определение ряда показателей состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса гомогената печени и функционального состояния изолированных митохондрий гепатоцитов (рисунок 4.2).

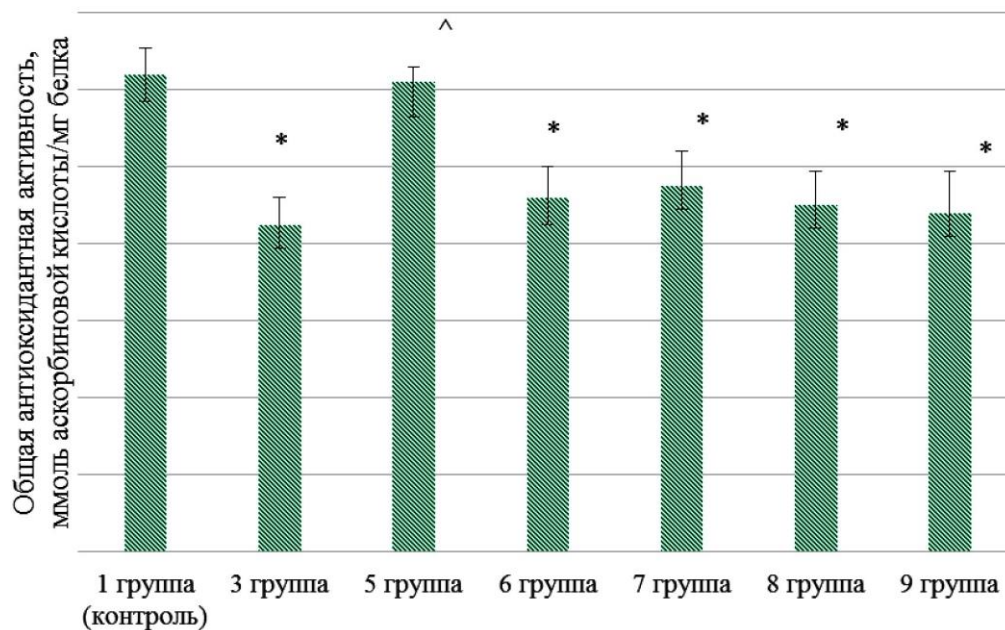


Рисунок 4.2 – Изменение общей антиоксидантной активности гомогената печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q1-Q3)).

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

Исследование общей АОА гомогената печени железо-восстанавливающим способом показало снижение значения данного показателя на 31 % на фоне развития хронической алкогольной интоксикации у животных 3-й группы. Проведение гепатокоррекции с использованием аденозилметионина способствовало увеличению анализируемого показателя до контрольного уровня, характерного для гомогената печени животных 1-й группы. Введение метионина или липоевой кислоты крысам 6–9-й групп не оказывало какого-либо существенного влияния на антиоксидантный статус печени при хронической алкогольной интоксикации. Общая АОА гомогената печени лабораторных животных 6–9-й групп была ниже контроля на 23–29 % и статистически значимо не отличалась от аналогичного параметра группы сравнения (таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Активность ферментов антиоксидантной системы печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Ме (Q1-Q3))

Группа, №	Показатели		
	КАТ, ммоль/мин×мг белка	ГПО, мкмоль/мин×мг белка	GSH, мкмоль/г ткани
1 (контрольная)	1,4 (1,2/1,6)	10,3 (9,8/10,8)	3,3 (3,0/3,4)
3 (сравнения)	5,1 (4,5/6,2)*	20,3 (19,0/21,1)*	2,0 (1,9/2,1)*
5	0,9 (0,8/1,3)^	8,8 (8,4/9,5)^	2,7 (2,6/2,9)*^
6	2,2 (1,9/2,4)*^	16,4 (16,0/17,0)*^	1,8 (1,7/2,0)*
7	7,0 (6,5/7,4)*^	14,5 (14,1/15,2)*^	2,1 (1,9/2,2)*
8	4,4 (4,0/4,7)*	14,8 (14,2/15,5)*^	2,1 (2,0/2,3)*
9	2,4 (2,0/2,7)*^	18,7 (18,2/19,4)*	2,0 (1,9/2,3)*

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

Определение маркеров состояния системы антиоксидантной защиты печени включало те же показатели, что и в крови: активность КАТ и ГПО, концентрация восстановленной формы глутатиона. В данном случае также была определена сниженная на 39 % концентрация глутатиона на фоне развития хронической алкогольной интоксикации у крыс. Коррекция с использованием адеметионина у животных 5-й группы сопровождалась статистически значимым ростом показателя – на 35 % относительно группы сравнения. В остальных случаях уровень концентрации анализируемого тиолсодержащего трипептида был ниже контроля и соответствовал уровню 3-й группы лабораторных животных. Наиболее низкие медианные значения концентрации глутатиона были определены в гомогенате печени крыс 6-й группы, получавших свободный метионин. В ткани печени животных этой группы данный показатель был ниже контрольного уровня на 45 % и даже несколько ниже уровня соответствующего параметра группу сравнения на 10 %. Активность ферментов системы антиоксидантной защиты печени крыс

на фоне хронической алкоголизации имела отчетливую тенденцию к увеличению. Так активность ГПО в ткани печени животных 3-й группы была увеличена в 2,0 раза относительно контроля. Каталазная активность паренхимы печени крыс той же группы превышала контрольные цифры уже в 3,6 раз. На фоне проведения метаболической коррекции активность рассматриваемых ферментов имела тенденцию к снижению относительно группы сравнения в сторону значений соответствующих показателей контрольной группы. Активность ГПО в печени животных 5–9-й групп была ниже, чем в 3-й группе. Наиболее существенное снижение уровня глутатионпероксидазной активности было зафиксировано на фоне введения гептрала (адеметионина) крысам 5-й группы у которых значение рассматриваемого параметра статистически значимо не отличалось от уровня контрольного показателя. У животных остальных групп уровень активности ГПО оставался выше контрольных цифр, но все же ниже, чем в группе сравнения. В частности, у животных 7–8-й групп этот показатель был всего на 41–44 % выше контроля, у крыс 6-й группы – на 59 %, а у лабораторных животных 9-й группы – на 82 %. В последнем случае значение активности ГПО практически не отличалось от значения аналогичного показателя контрольной группы. Активность КАТ у животных на фоне проведения терапии также стремилась к снижению в сторону уровня 1-й группы, кроме показателя у 7-й группы лабораторных животных. В данном случае на фоне перорального введения липоевой кислоты каталазная активность возрастала еще более значительно – в 5,0 раз относительно контроля. На фоне введения гептрала активность КАТ гомогената печени, как и ГПО, возвращалась к нормальным значениям. У животных 6-й и 9-й групп каталазная активность гомогената печени была ниже аналогичного показателя группы сравнения в 2,1–2,3 раза, но оставалась выше контрольных цифр в 1,6–1,7 раза. Практически такие же значения, как и в печени животных 3-й группы были определены в гомогенате крыс 8-й группы (рисунок 4.3).

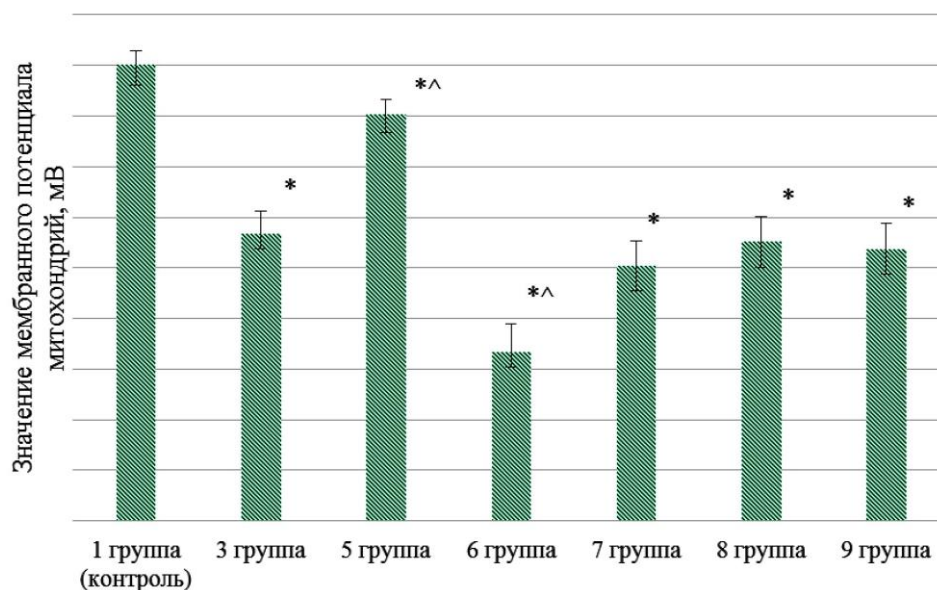


Рисунок 4.3 – Изменение мембранного потенциала изолированных митохондрий печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией и коррекцией серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q1-Q3)).

Примечание : * – наличие статистически значимых отличий от контрольного показателя ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий от показателя группы сравнения ($p < 0,05$).

Определение изменений мембранного потенциала в суспензии изолированных митохондрий гепатоцитов лабораторных животных показало наличие отчетливой тенденции к снижению данного параметра на фоне моделирования патологического процесса, связанного с алкоголизацией крыс. Так у животных группы сравнения данный показатель был ниже контроля на 37 %. Проведение коррекции с использованием аденозилметионина способствовало поддержанию функционального состояния митохондрий печени на более высоком уровне, медианное значение мембранного потенциала у особей 5-й группы отставало от контрольных цифр только на 11 %. Коррекция с использованием свободной аминокислоты метионина или липоевой кислоты не оказывала протективного влияния на митохондрии ткани печени. У животных 6-й группы и вовсе способность митохондрий гепатоцитов к генерации мембранного потенциала была снижена еще более значительно, чем в группе сравнения – на 63 %

ниже нормальных значений, определенных у интактных животных контрольной группы. На фоне введения липоевой кислоты статистически значимых изменений относительно значения показателя 3-й группы выявлено не было.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности коррекции и метаболических нарушений, и повреждения печени в условиях хронической алкогольной интоксикации с использованием различных серосодержащих средств. Несомненно, наиболее высокую эффективность, особенно в области решения основной задачи – гепатопротекции, продемонстрировал аденозилметионин (гептрал). Использование метионина в целом показало противоположные результаты, а введение липоевой кислоты по одной из исследуемых схем в основном оказывало действие, направленное на поддержку функциональной активности антиоксидантной системы крови, но не способствовало усилению данного звена системы неспецифической резистентности печени и снижению активности маркеров цитолитического синдрома, а вероятнее всего и повреждению паренхимы печени.

ГЛАВА 5

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Обсуждение взаимного влияния хронической алкогольной интоксикации и аллоксанового диабета

На этапе планирования эксперимента в качестве ожидаемых результатов предполагали, что предварительное развитие хронической алкогольной интоксикации отразится на функциональном состоянии печени, также являющейся одной из центральных мишеней инсулина, что должно будет в первую очередь оказать влияние на клинико-лабораторные проявления нарушений углеводного обмена. Центральная роль печени в углеводном обмене подтверждается участием ее во всех метаболических путях глюкозы, многие из которых протекают практически исключительно в печени. Это прежде всего запасание глюкозы в виде гликогена – гликогеногенез, синтез из неуглеводных веществ – гликонеогенез, взаимопревращения моносахаридов и др. Инсулин-зависимый транспорт глюкозы через клеточную мембрану характерен для клеток скелетной мускулатуры и жировой ткани, между тем печень наряду с этими тканями рассматривается в качестве ключевого органа-мишени этого гормона. Это связано с тем, что основная часть ферментов, активность которых зависит от действия инсулина, локализована в гепатоцитах. Повреждение печени может сопровождаться разнонаправленными эффектами изменений концентрации глюкозы крови. Часто описываются гипогликемические эффекты алкогольного повреждения печеночной паренхимы, связанные с нарушениями запасания гликогена и гликонеогенеза. В тоже время изменения уровня гликемии на фоне разового принятия алкоголя или хронического употребления зачастую непредсказуемы, что в некоторой степени определяет актуальность нашего исследования.

На первом этапе оценки выраженности повреждений печени в условиях формирования одной из экспериментальных моделей на лабораторных

животных было выполнено определение ферментных маркеров цитолиза гепатоцитов. В результате проведенных исследований было установлено, что на фоне хронической алкоголизации животных происходит выброс ферментов – ЛДГ и АЛТ из ткани печени и наблюдается увеличение их активности в плазме крови в 1,7–2,2 раза. Ожидаемо никаких изменений на фоне моделирования СД у крыс не происходило, однако у животных 4-й группы были получены наиболее высокие значения изученных показателей. Отсутствие изменений активности АСТ может косвенно подтвердить предположения о преимущественном повреждении печеночной паренхимы у лабораторных животных, поскольку известно, что в ее ткани преобладает активность АЛТ. Максимальные значения маркеров цитолиза гепатоцитов у животных 4-й группы наглядно демонстрируют влияние сопутствующего развития СД, проявляющееся в усилении поражения печени на фоне алкоголизации. Возможных механизмов может быть несколько. Наиболее простым объяснением является усиление токсического влияния этилового спирта на фоне увеличенной нагрузки на метаболические системы печени в условиях дефицита секреции инсулина при аллоксан-индуцированном диабете. С другой стороны, обе экспериментальные модели характеризуются нарушениями липидного обмена, протекающего в печени. Так на фоне алкогольной интоксикации повышается синтез липидов в печени и нарушается их экспорт в составе липопротеинов в другие ткани. Усиление липолиза в жировой ткани и поставка ацетил-КоА в печень может усугубить нарушения баланса синтеза и распада жиров в этом органе.

Оценка изменений уровня гликемии у исследуемых групп лабораторных животных закономерно показала увеличение концентрации глюкозы в плазме крови крыс на фоне аллоксан-индуцированного СД, что непосредственно связано с панкреатотоксичностью аллоксана моногидрата. Концентрация глюкозы в плазме крови крыс 3-й группы, находившимся на замещенном этанолом питьевом рационе, не отличалась от нормальных значений, хотя во

многих ситуациях демонстрируют гипогликемическое действие этилового спирта. В нашем случае возможно не хватило длительности развития патологического процесса для реализации всех его классических проявлений. С другой стороны, необходимо учитывать, что крысы – лабораторные животные, которые питаются не по расписанию и у них сложно отследить уровень гликемии натощак. С этим во многом связано и то, что определяемый уровень гликемии у крыс обычно выше, чем у человека. Возможно, что натощак была бы определена и нами сниженная концентрация глюкозы крови, но это вынудило бы нас внести существенные изменения в схему эксперимента. Моделирование СД на фоне хронической алкогольной интоксикации сопровождалось более значительным ростом гликемии у животных, чем у крыс только с СД. Это на наш взгляд может быть вызвано как усилением токсичности аллоксана при его введении на фоне алкогольной интоксикации, так и нарушениями глюкостатической функции печени вследствие ее поражения, которое было подтверждено изменениями маркеров цитолиза гепатоцитов. Таким образом, исследование основных лабораторных маркеров позволило установить, что развитие СД на фоне хронической алкогольной интоксикации у животных характеризуется обоюдным усилением и повреждением печени и нарушения углеводного обмена.

В качестве еще одного косвенного маркера состояния функции печени можно рассматривать концентрацию общего белка плазмы крови или сывороточного альбумина. В нашем исследовании было определено содержание только общего белка, но даже это позволило обнаружить статистически значимое снижение его уровня у крыс 3-й и 4-й групп. С учетом важной белоксинтезирующей роли печени данные изменения можно считать подтверждением повреждения гепатоцитов. Однако в данном случае никаких особенностей выявлено не было, все-таки это менее специфичный маркер, изменения которого могут быть продиктованы и состоянием иммунологической реактивности, функциональным состоянием

почек, а поражения печени обычно сопровождаются более яркими изменениями ближе к терминальным стадиям заболевания, что обусловлено высокими компенсаторными способностями органа.

Оценка состояния липидного обмена выявила ведущее влияние развития аллоксан-индуцированного СД, что характеризовалось увеличением концентрации общего холестерина в плазме крови у животных 2-й и 4-й группы в равной степени. Аналогично у животных этих же групп отмечался одинаковый рост содержания холестерина ЛПНП и триглицеридов в плазме крови. В данном случае отсутствие статистически значимых отличий между параметрами липидного профиля этих 2-х групп лабораторных животных может быть объяснено второстепенным участием обмена жиров в развитии и течении изученных патологических процессов. Однако это может частично разрешить вопрос о роли данного звена патогенеза в алкогольном поражении печени и СД при их совместном развитии. Как было указано выше взаимное усиление 2-х моделируемых патологических состояний может быть обусловлено или повышением токсичности аллоксана и повреждения β -клеток островкового аппарата поджелудочной железы или усугублением нарушений липидного обмена – в данном случае общего звена патогенеза. Определение показателей липидного профиля показало, что на самом деле очевидного усугубления нарушений обмена холестерина и триглицеридов у животных не наблюдалось. Хотя у крыс только на фоне алкоголизации и отмечалось статистически значимое увеличение концентрации триглицеридов крови. В любом случае данные изменения трактовать однозначно нельзя, как было уже указано на фоне алкогольного поражения печени нарушается транспорт липидов из печени, что может отражаться на показателях крови.

Одной из сторон нарушения липидного обмена может быть перекисное окисление липидов, как часть окислительного стресса. В качестве основного маркера окислительного стресса традиционно рассматривают концентрацию

малонового диальдегида или более широкое понятие – ТБК-реактивные продукты, включающие в себя малоновый диальдегид и другие карбонильные продукты окислительных модификаций липидов. Чаще выполняют определение ТБК-реактивных продуктов, так как это методически проще. Определение концентрации индивидуальных веществ обычно требует использования сложных и дорогостоящих хроматографических методов разделения. Результаты определения ТБК-реактивных продуктов в нашем исследовании показали статистически значимое увеличение данного показателя во всех опытных группах лабораторных животных, но максимальные значения были ассоциированы с развитием СД у крыс 2-й и 4-й групп. При этом сочетанное моделирование аллоксанового диабета и хронической алкогольной интоксикации не сопровождалось статистически значимыми отличиями рассматриваемого показателя от соответствующего параметра животных 2-й группы. Мы полагаем, что СД характеризуется все-таки более высоким уровнем окислительного стресса, что подтверждается и нашими данными и общими представлениями об участии свободнорадикальных процессов в развитии осложнений. Такие выводы обоснованы также выявленными особенностями изменений активности ферментов антиоксидантной защиты. Было установлено, что на фоне развития обеих патологических состояний активность КАТ и СОД заметно снижается. При этом активность фермента первой линии антирадикальной защиты несколько ниже на фоне моделирования аллоксанового диабета, а на фоне экспериментальных условий сочетанного течения СД и алкогольной интоксикации определены наиболее низкие значения активности СОД. Наиболее низкая каталазная активность в эритроцитарной взвеси была характерна для животных также с экспериментальной моделью СД, однако у животных 4-й группы активность данного фермента была выше и существенно ближе к контрольным цифрам, чем у крыс 2-й и 3-й групп. Можно констатировать, что действительно

сахарный диабет в основном определяет развитие окислительных повреждений, однако сочетанное течение аллоксан-индуцированного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации представляет собой качественно новое состояние, отличающееся даже по проявления окислительного стресса от изолированных форм патологических состояний. Таким образом, в эксперименте нам удалось сформировать коморбидное состояние практически соответствующее традиционным о нем представлениям. Продолжение анализа состояния ферментного звена системы антиоксидантной защиты включало определение активности ферментов метаболизма глутатиона – ГПО и ГР. Активность данных ферментов была увеличена относительно контрольных цифр в эритроцитарной взвеси всех опытных групп лабораторных животных. Такие изменения – снижение активности КАТ и СОД, но при увеличенных значениях активности ГР и ГПО очевидно свидетельствуют о дисбалансе ферментного звена антиоксидантной системы, а увеличение содержания ТБК-реактивных продуктов – об интенсификации свободнорадикальных повреждений биомолекул, что в совокупности составляет классические лабораторные признаки окислительного стресса. Однако высокие значения активности ферментов метаболизма глутатиона могут свидетельствовать о наличии компенсаторных явлений, которые не справляются с интенсификацией продукции АФК. Последнее предположение подтверждается не только существенным ростом содержания ТБК-реактивных продуктов, но и значительным снижением концентрации восстановленной формы глутатиона в эритроцитах – в среднем 31–32 % относительно контрольных цифр. Причем во всех случаях было определено одинаковое снижение концентрации глутатиона, что может быть лабораторным симптомом того, что ни в одной из ситуаций ГПО и ГР не справляются, не смотря на увеличение их активности, особенно это относится к ферменту регенерации глутатиона – ГР. Еще одним интересным

на наш взгляд наблюдением были сравнительно низкие значения активности обоих рассматриваемых ферментов тиолового гомеостаза эритроцитов у животных 4-й группы относительно соответствующих параметров 2-3-й групп. Это может указывать на явления декомпенсации данного звена системы антиоксидантной защиты с дальнейшим прогрессированием окислительных повреждений и развитием осложнений. Определение уровня тиоловых групп белков плазмы крови подтвердило ранее сделанное предположение о ведущей роли СД в развитии окислительного стресса. Так на 12–18 % данный показатель был снижен у животных 2-й и 4-й экспериментальных групп. Более низкие значения показателя были у крыс с сочетанной формой патологии, но статистически значимых отличий в данном случае выявлено не было. Таким образом в очередной раз подтвердилось, что необходим комплексный подход к исследованиям окислительного стресса, учитывающий состояние разных звеньев и подсистем, который позволяет провести объективную оценку функционального состояния системы неспецифической резистентности в целом.

Исследование уровня эндогенной интоксикации у групп лабораторных животных, включенных в работу, показало, что в данном случае ведущее влияние оказывает моделирование хронической алкоголизации крыс. Действительно и сам этиловый спирт, и его метаболиты являются токсическими субстратами, оказывающими прямое повреждающее действие на структуры печени, а также других органов и тканей. Повреждение тканей способствует накоплению токсических веществ напрямую и за счет снижения активности системы детоксикации, локализованной также преимущественно в печени. Накопление в крови токсических субстратов проявляется увеличением содержания веществ со средней и низкой молекулярной массой, представляющих собой собирательное понятие, включающее весь спектр соединений, оставшихся в биологической жидкости после депротенизации и поглощающих УФ в области 238–298 нм.

Определение таких веществ в плазме крови животных 2–4-й групп показало сравнительно небольшое увеличение их содержания – всего на 17–27 % относительно значения соответствующего параметра контрольной группы. Однако увеличение содержания в плазме крови данных веществ больше характерно для процессов декомпенсации системы детоксикации, что чаще проявляется на терминальных стадиях заболеваний. Различия в уровне эндогенной интоксикации были выявлены при исследовании содержания веществ со средней и низкой молекулярной массой в эритроцитарной взвеси. Считается, что на первых этапах развития эндотоксикоза эритроциты принимают наиболее активное участие в сорбции потенциально токсических субстратов, что ограничивает распространение патологического процесса и снижает их негативное влияние на нормальные биологические структуры. Поэтому обнаружение резко увеличенного содержания эритроцитарной фракции субстратов токсикоза свидетельствовало о компенсаторной фазе эндогенной интоксикации. Причем наиболее высокие значения анализируемого параметра, превышающие контрольные цифры в 2,4 раза, были определены в крови животных 3-й группы.

Исследование флуоресцентных свойств плазмы крови позволяет легко определить ряд параметров, отражающих возможные метаболические нарушения. В большинстве случаев использование данных маркеров ограничено невысокой чувствительностью и специфичностью, однако в условиях экспериментальных моделей, когда нам точно известен патологический процесс и можно прогнозировать развитие тех или иных нарушений, характеризующихся определенной клинико-лабораторной симптоматикой, ценность таких исследований существенно возрастает. В частности, нами было исследовано содержание флуоресцентных продуктов неферментного гликирования белков. В результате было получено информация, свидетельствующая об увеличении данного параметра у животных на фоне моделирования СД во 2-й группе и в 4-й группе на фоне

хронической алкогольной интоксикации. Причем в последнем случае были получены несколько более низкие значения содержания продуктов гликирования белков. Возможно, что это связано с конкуренцией между процессами гликирования белков на фоне гипергликемического состояния и ацилирования белков с ацетальдегидом – продуктом метаболизма этилового спирта. Обе реакции преимущественно протекают по амидной группе остатков лизина в молекулах белка. Поэтому кажущееся снижение уровня ферментного гликирования белков в данном случае не является доказательством позитивного влияния этилового спирта на формирование поздних осложнений СД и в целом прогноз заболевания. Широко известно, что окислительные модификации белков и их гликирование способны взаимно усиливать эффекты друг друга за счет повышения чувствительности уже поврежденных белков к действию какого-либо из модификаторов. Можно предположить, что и ацилирование также само по себе является негативным фактором нарушения нативной конформации белков и развития эндотелиальной дисфункции, но и усиливает влияние повреждающих факторов окислительного и карбонильного стресса.

Определение остатков битирозина – продукта окислительных модификаций белков плазмы крови, также обладающего характерной флуоресценцией, показало в целом аналогичные результаты, полученные при определении других маркеров окислительного стресса. Были определены увеличенные концентрации данного патологического метаболита в плазме крови крыс 2-й и 4-й групп, что в очередной раз подтвердило ведущее влияние СД на развитие и поддержание высокой интенсивности свободнорадикальных процессов. Преимуществом определения содержания остатков битирозина является их относительная стабильность в биологических жидкостях организма. Такие повреждения белков не репарируются, сохраняются в течение всей продолжительности жизни молекулы белка и длительное время после его деградации до выведения из

организма животного. Это позволяет надежно определить наличие свободнорадикальных повреждений, активизирующихся на фоне хронического окислительного стресса, характерного для заболеваний обмена веществ, таких как СД.

Определение интенсивности собственной или зондовой флуоресценции белков плазмы крови позволяет судить о состоянии молекулы, наличии конформационных перестроек, вызванных повреждениями вследствие ковалентных модификаций или связыванием с другими ионами и молекулами со средней или низкой молекулярной массой. В результате определения интенсивности собственной флуоресценции остатков триптофанилов белков плазмы крови было определено снижение данного параметра на 26–31 % во всех опытных группах лабораторных животных. Это однозначно свидетельствует о наличии нарушений структуры белка, хотя о природе таких нарушений остается догадываться или ориентироваться на результаты вышеописанных исследований. Кроме того, отсутствие статистически значимых отличий данного параметра у животных 2–4-й групп может указывать на небольшую его специфичность. Дополнить лабораторную картину изменений конформационного состояния белков плазмы крови можно путем исследования флуоресценции с использованием гидрофобного флуоресцентного зонда 1-анилино-8-нафталинсульфоновой кислоты (АНС). Результаты исследований зондовой флуоресценции показали снижение ее интенсивности у животных 3-й и 4-й групп, то есть в данном случае ведущее влияние оказывала алкогольная интоксикация. Нарушение связывания АНС с молекулой белка может быть связано с тем, что все места связывания заняты или эндотоксинами, или вследствие модификаций белка при его гликировании или окислении. Так как было ранее показано, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождается более выраженными проявлениями эндогенной интоксикации, чем окислительным стрессом, предпочтительным объяснением конформационных перестроек белков и

изменений параметров собственной или зондовой флуоресценции плазмы крови является связывание белков с некоторыми молекулами, входящими в понятие веществ со средней и низкой молекулярной массой, или ацилирование белков метаболитами этилового спирта.

Общим итогом первого раздела исследования является определение ведущего значения моделирования СД в развитии окислительного стресса и ключевой роли хронической алкоголизации животных в развитии эндогенной интоксикации. Экспериментальное моделирование сочетанного патологического процесса, включающего формирование аллоксан-индуцированного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации, сопровождалось интенсификацией окислительных процессов и эндогенной интоксикацией, характерных для изолированных форм патологических процессов. При этом общая выраженность данных нарушений в целом соответствовала изолированным формам изученных патологий с некоторыми особенностями, определяющими сочетанную форму как качественно новое состояние организма животного или коморбидное состояние. Наложение друг на друга эффектов метаболических нарушений у животных 4-й группы способствовало усилению основных лабораторных проявлений, характеризующих нарушения углеводного обмена и цитолитический синдром при поражении печени.

5.2. Результаты исследований коррекции метаболических нарушений в условиях моделирования хронической алкогольной интоксикации

Разработанный дизайн исследования эффективности использования серосодержащих веществ для коррекции повреждений печени имел несколько основных целей. Исследование эффективности активной формы метионина – S-аденозилметионина имело скорее цель формирования

эталонной группы, данный препарат (гептрал) был выбран для этого, так как в последнее время позиционируется как один из наиболее эффективных гепатопротекторов. Интерес представляет сравнение эффективности свободного метионина и аденозилметионина, поскольку первое вещество также часто заявляется в качестве гепатопротектора, но данных об его эффективности существенно меньше, хотя принципиальных отличий между этими веществами на первый взгляд не так много. Метионин и его активная форма – примеры тиоэфирных соединений, участвующих в реакциях трансметилирования в биосинтетических метаболических путях, дезинтоксикации ксенобиотиков и эндотоксинов. Другая, более обширная группа серосодержащих соединений – тиолсодержащие вещества, к которым относят липоевую кислоту. В организме человека и животных такие соединения выполняют различные функции, но отдельно выделяют их роль в регуляции редокс состояния клетки. Антиоксидантные свойства липоевой кислоты позволяет ей претендовать на роль цитопротектора, потенциально эффективного и при повреждении печеночной паренхимы.

Основное значение в определении эффективности гепатопротекции имеет лабораторная оценка выраженности цитолитического синдрома с помощью маркеров – ЛДГ и АЛТ. Активность АСТ не определяли, так как ранее было показано отсутствие ее изменений на фоне 2-х месячной алкоголизации крыс. В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее выраженной эффективностью обладает аденозилметионин, на фоне введения которого наблюдалось снижение активности ЛДГ до контрольных значений, а активность АЛТ превышала контрольные цифры на 31 % и была ниже показателя группы сравнения на 23 %. Введение свободного метионина не только не дублировало эффекты его активной формы, но и усугубляло поражение печени, что характеризовалось еще более значительным ростом активности ЛДГ, чем в группе сравнения. Введение же липоевой кислоты оказывало

незначительный эффект на лабораторные проявления цитолитического синдрома. Только при парентеральном введении данного препарата наблюдалось небольшое снижение активности ЛДГ и АЛТ в плазме крови животных. Небольшое (на 25–26 %) снижение только активности ЛДГ было характерно для смешанного введения, включающего парентеральную форму введения липоевой кислоты в первую неделю терапии. Дальнейшие исследования нарушений обмена веществ и особенностей изменений окислительного метаболизма были направлены на поиск объяснений результатов оценки влияния серосодержащих соединений на цитолиз гепатоцитов в условиях хронической алкогольной интоксикации у крыс.

Так как этиловый спирт оказывает влияние на углеводный и липидный обмен были исследованы концентрации глюкозы и общего холестерина плазмы крови экспериментальных животных. При этом не было выявлено изменений данных показателей у крыс группы сравнения, что было описано ранее. Также не было выявлено существенных изменений изученных параметров обмена веществ и на фоне введения исследуемых метаболических препаратов. Только в одном случае – на фоне введения аденозилметионина была определена увеличенная концентрация общего холестерина в плазме крови, что имеет некоторый интерес ввиду наиболее высокой гепатопротективной активности данного препарата. Тем более что чаще исследователи отмечают тенденцию к нормализации повышенного содержания холестерина сыворотки крови на фоне терапии с использованием гептрала. Применение этого вещества не отменяет эффекты этанола, связанные с усилением синтеза липидов в печени, но возможно разрешает нарушения транспортировки липидов из печени и явления холестаза, что может сопровождаться небольшим ростом уровня холестерина в крови. В данном случае это только предположение, требующее дальнейшей проверки.

Определение общей АОА плазмы крови показало сниженные ее значения только у животных группы сравнения, тогда как на фоне

проведения коррекции уровень данного показателя не отличался от контрольной группы. При этом наиболее высокие значения общей АОА были определены в крови животных, которым вводили липоевую кислоту по одной из предложенных схем. Очевидно, что не прослеживается связь между антиоксидантным потенциалом плазмы крови и выраженностью поражения печени. Это указывает на небольшие перспективы поиска эффективных гепатопротекторов среди веществ, являющихся по своему механизму прямыми гидрофильными антиоксидантами. Также интересным наблюдением является то, что общую АОА плазмы крови неплохо поддерживают метионин и аденозилметионин, не обладающие непосредственными антиоксидантными свойствами.

Определение содержания продуктов окислительных модификаций, показало увеличенное содержание ТБК-реактивных продуктов, диеновых и триеновых конъюгатов соответственно в эритроцитарной взвеси животных группы сравнения на 34 %, в 2,1 и в 4,4 раза. Исследование способов метаболической коррекции показало возможность снижения уровня ТБК-реактивных продуктов в крови до нормальных значений в условиях введения аденозилметионина и липоевой кислоты. В тоже время содержание промежуточных продуктов окислительных модификаций липидов снижалось на фоне проведения терапии, но оставалось увеличенным относительно контроля. Это может быть обусловлено поддержанием окислительного стресса низкой интенсивности, для окончательного снижения которого требуется исключение повреждающего фактора – хронического употребления этилового спирта. Отсутствие накопления конечных продуктов окислительных повреждений биомолекул может свидетельствовать о высокой скорости их выведения на фоне небольшой скорости образования, обратимости их продукции или репарации повреждений, что может быть также обусловлено высокой активностью системы антиоксидантной защиты. На этом же этапе исследования показано, что введение метионина

существенно не влияет на выраженность окислительных повреждений несмотря на увеличение общей АОА плазмы крови, что может указывать на отсутствие связи между усилением повреждения печени по данным маркеров цитолиза гепатоцитов и окислительным стрессом. Другим интересным наблюдением было сравнение эффективности снижения маркеров окислительного стресса при введении липоевой кислоты. Все три схемы введения октолипена одинаково влияли на уровень общей АОА, однако снижение концентрации ТБК-реактивных продуктов и диеновых конъюгатов наблюдалось только у животных 8-9-й групп, которым полностью или только на первом этапе вводили препарат внутривнутрибрюшинно. Более эффективным было влияние данных схем и на показатели цитолиза. Таким образом, с одной стороны парентеральное введение липоевой кислоты является предпочтительным, с другой стороны схема терапии, включающая предварительное в течение месяца внутривнутрибрюшинное введение препарата с последующим переходом на поддерживающее введение антиоксиданта в пероральной форме также эффективно, как и исключительно внутривнутрибрюшинное введение на протяжении всего эксперимента.

Исследование функциональной активности компонентов системы антиоксидантной защиты крови показало отсутствие существенного влияния средств метаболической направленности, в том числе липоевой кислоты, на концентрацию глутатиона, сниженную на 29 % на фоне хронической алкогольной интоксикации. Активность КАТ, также сниженная в эритроцитарной взвеси животных группы сравнения, увеличивалась на фоне введения аденозилметионина и липоевой кислоты в 8–9-й группах. К нормальным значениям возвращалась активность ГПО у животных всех групп, кроме 6-й. В данном случае это может свидетельствовать об обратимости изменений состояния ферментного звена системы антиоксидантной защиты крови, но большой выраженности нарушений, не способных восстановиться при введении используемых антиоксидантов.

Кроме того, как ранее было указано окислительный стресс на более низком уровне, но сохраняется, одним из проявлений этого может быть снижение наиболее чувствительного компонента регуляции клеточного редокс гомеостаза – восстановленного глутатиона.

Определение уровня эндогенной интоксикации по содержанию веществ со средней и низкой молекулярной массой показало снижение данного показателя в плазме крови и эритроцитарной взвеси при использовании серосодержащих веществ. Более низкое содержание субстратов эндотоксикоза относительно группы сравнения было определено во всех группах лабораторных животных, которым вводили один из исследуемых препаратов. Уровень плазменной фракции веществ со средней и низкой молекулярной массой снижался до контрольных значений во всех группах, кроме 6-й, крысы которой получали метионин. У животных этой же группы был несколько выше уровень эритроцитарной фракции эндотоксинов. Результаты лабораторных исследований показали возможность снижения уровня эндогенной интоксикации при использовании различных серосодержащих соединений и даже введении метионина, который демонстрировал отрицательные результаты при оценке цитолитического синдрома. Также не отличались значения содержания веществ со средней и низкой молекулярной массой в биологических жидкостях крыс, получавших аденозилметионин или липоевую кислоту. Вероятно, что уменьшение проявлений эндотоксикоза – важный патогенетический аспект хронической алкогольной интоксикации, но недостаточный для защиты гепатоцитов от повреждений.

Определение показателей окислительного метаболизма в печени показало более значительные отличия между группами животных, получавших аденозилметионин и другие серосодержащие препараты. В частности, только введение аденозилметионина способствовало увеличению уровня общей АОА гомогената печени относительно значения показателя

группы сравнения, тогда как в других группах аналогичные показатели оставались такими же низкими, как и в 3-й группе. Следует отметить, что уровень общей АОА в плазме крови был увеличен во всех группах и особенно на фоне липоевой кислоты, которая практически не оказывала влияния на показатель гомогената печени. Вероятно, здесь играет ведущее значение косвенное влияние гептрала на систему антиоксидантной защиты через его метаболические эффекты в гепатоцитах. Заслуживают внимание данные, полученные при исследовании ферментов антиоксидантной защиты и концентрации глутатиона в гомогенате печени. Ожидаемо сниженная концентрация восстановленного глутатиона в ткани печени на фоне хронической алкогольной интоксикации статистически значимо увеличивалась только при введении аденозилметионина в качестве метаболического корректора. Рост содержания этого трипептида у крыс 5-й группы не достигал контрольного уровня, но превышал значение соответствующего показателя группы сравнения на 35 %. Практически полностью восстанавливалась нормальная активность КАТ и ГПО в гомогенате печени крыс, получавших аденозилметионин. В тоже время использование других серосодержащих препаратов также способствовало нормализации активности ферментов антиоксидантной защиты, но только частично.

Основные данные о состоянии энергетического обмена и функционального состояния митохондрий гепатоцитов были получены при исследовании способности изолированных митохондрий печени крыс генерировать мембранный потенциал при внесении в тест-систему сукцината натрия. Было показано, что митохондрии интактной печени крыс способны генерировать потенциал около 180 мВ (данные получены согласно расчетным теоретическим формулам). На фоне хронической алкогольной интоксикации данный параметр значительно снижался, достигая в среднем 113 мВ. Только введение аденозилметионина было способно обеспечить

увеличение анализируемого параметра до уровня 160 мВ, в то время как на фоне введения липоевой кислоты никаких статистически значимых изменений не было выявлено, а введение метионина оказывало негативный эффект на функциональное состояние митохондрий печени – среднее расчетное значение мембранного потенциала было снижено до 67 мВ.

Суммируя представленные следует отметить, что липоевая кислота оказывает существенное воздействие на метаболические системы крови, проявляющиеся в повышении общей антиоксидантной активности плазмы крови, снижении образования продуктов окислительных модификация биомолекул и частичном восстановлении функциональной активности ферментов антирадикальной защиты. На этом фоне отмечалось частичное снижение активности ЛДГ и АЛТ – маркеров цитолитического синдрома, отражающих выраженность поражения печени. При этом практически не было выявлено признаков влияния липоевой кислоты на метаболические системы самой печени. Сравнительная оценка разных схем введения этого серосодержащего соединения показала преимущество парентерально введения, что проявлялось в более значительном снижении интенсивности свободнорадикальных процессов и цитолиза гепатоцитов. Однако, одинаковые результаты были получены при изучении эффективности только внутрибрюшинного введения или предварительной терапии парентеральной формой липоевой кислоты в течение недели с последующим переходом на поддерживающую коррекцию с пероральной формой препарата. Похожие по влиянию на состояние антиоксидантной системы результаты были достигнуты не только при использовании вещества с прямой антиоксидантной активностью – липоевой кислоты, но и при введении тиоэфирных соединений – метионина и его активной формы. Однако в остальном эффекты этих веществ имели множество отличий. Аденозилметионин оказался наиболее эффективным цитопротектором, что выражалось в снижении активности АЛТ и ЛДГ практически до уровня

нормальных значений. Влияние активной формы метионина на некоторые показатели системы антиоксидантной защиты крови возможно были не такими значительными, как при использовании липоевой кислоты, зато только этот препарат оказывал заметное влияние на метаболические системы печени. Введение же свободного метионина оказывало эффекты ухудшения состояния цитолиза гепатоцитов, не способствовало снижению интенсивности образования продуктов перекисного окисления липидов и усиливало нарушения функционального состояния митохондрий печени. Такая разница в использовании метионина и его активной формы может быть обусловлена тем, что на фоне хронической алкогольной интоксикации нарушения энергообмена – гипоэнергетическое состояние, подтвержденное нарушением способности митохондрий печени генерировать мембранный потенциал, затрудняет образование S-аденозилметионина, требующего для этого молекулы АТФ и всех ее остатков фосфорной кислоты. При этом перегрузка печени метионином в таких условиях может не только не способствовать усилению детоксицирующей функции, но и в некоторой степени поддерживать радикально-цепные реакции. Эта аминокислота наряду с цистеином примерно в 100 раз чувствительнее к окислению даже такими сравнительно слабыми реагентами как гипохлорит ион. Известно, что при длительном введении высоких доз антиоксидантов может происходить трансформация их основного эффекта в прооксидантное действие [R. Sotler et al., 2019]. Это связано со способностью окисленной формы антиоксиданта участвовать в дальнейших реакциях образования радикалов и окислительного повреждения собственных структур. Мы предполагаем, что в данном случае так и может происходить при накоплении метионина в печени и трудности вовлечения его в трансметилирование на фоне гипоэнергетических состояний. Введение же сразу активной формы S-аденозилметионина лишено этого недостатка и позволяет в полной мере раскрыться гепатопротективному потенциалу этого соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выраженность метаболических нарушений у больных СД зависит от функционального состояния печени [О.В. Гулинская и соавт., 2015; И.В. Пальцев, 2016; J. Zuwala-Jagiello et al., 2017], что связано с ролью печени в поддержании уровня гликемии и её участием в патогенезе заболевания [О.В. Гулинская и соавт., 2014]. Первым органом, в который инсулин приносится с кровью является печень [Д.Н. Пеньков и соавт., 2013]. Известно, что гипогликемическое действие инсулина проявляется в том, что он активирует процесс запасания гликогена в печени и скелетных мышцах. Помимо прямого влияния на продукцию глюкозы или ее резервирование печенью, инсулин оказывает и опосредованное действие. На уровне α -клеток островкового аппарата поджелудочной железы инсулин ингибирует секрецию глюкагона, который усиливает мобилизацию гликогена и стимулирует процессы глюконеогенеза. В жировой ткани инсулин подавляет липолиз и, соответственно, концентрацию глицерола и свободных жирных кислот в крови, которые также поступают в печень [Н.А. Бабенко, В.С. Харченко, 2015; А.А. Dawood et al., 2017]. Снижение активности инсулина в печени обуславливает постоянную повышенную продукцию глюкозы печенью [М.А. Дербак и соавт., 2014]. Распространенность поражений печени при СД достаточно высока. Диабетические гепатопатии (ДГ) выявляются в 30–60 % всех случаев. По данным некоторых авторов ДГ занимают по частоте третье место среди осложнений СД, после диабетических нейро- и нефропатий [Е. Вовк, 2013]. Значительную роль в структуре заболеваний печени играют алкогольные гепатиты, что особенно актуально ввиду многократного увеличения токсического влияния этанола на метаболические системы организма при СД.

Важная роль в развитии СД и заболеваний печени отводится нарушениям нормального функционирования прооксидантно-

антиоксидантной системы. Окислительный стресс является одним из основных факторов развития и прогрессирования поздних осложнений СД [А.А. Спасов и соавт., 2016]. В ряде экспериментальных и клинических работ показана возможность антиоксидантной коррекции метаболических нарушений, как при СД, так и при гепатитах различного генеза [В.Я. Мокрый и соавт., 2015; S.W. Choi, C.K. Ho, 2017]. Исходя из вышеизложенного, следует признать актуальным изучение особенностей окислительного метаболизма и возможностей их коррекции при экспериментальном диабете на фоне алкогольных поражений печени.

Для решения этой проблемы было проведено экспериментальное исследование, включающее 155 белых половозрелых нелинейных крыс-самцов, разделенных на 9 групп. На первом этапе исследования был проведен анализ особенностей метаболических нарушений у животных с разными формами патологических процессов. Так была сформирована 2-я группа (n = 20), представленная животными с аллоксан-индуцированным СД, 3-я группа (n = 20), представленная крысами с хронической алкогольной интоксикацией и 4-я группа (n = 20), представленная животными, которым выполняли моделирование СД на фоне хронической алкогольной интоксикации. На втором этапе исследования исследовались способы коррекции метаболических нарушений, развивающихся на фоне хронической алкоголизации животных, с использованием различных серосодержащих соединений. Крысам 5-й группы (n = 15) вводили адеметионин 10 мг/сут, животным 6-й группы (n = 15) – метионин 100 мг/кг/сут перорально с питьевым рационом. Коррекцию начинали спустя месяц после начала моделирования патологического процесса и выполняли введение препаратов в течение месяца параллельно продолжению алкоголизации. Животные 7–9-й групп (также по 15 особей) в аналогичных экспериментальных условиях получали липоевую кислоту. Однако крысы 7-й группы получали липоевую кислоту перорально 100 мг/кг/сут с питьевым рационом, крысам 8-й группы

вводили препарат внутривенно 50 мг/кг/сут в первую неделю, затем переходили на пероральное введение. Животным 9-й группы вводили липоевую кислоту только внутривенно. Для оценки патобиохимических изменений в крови и гомогенате печени животных определяли ряд биохимических показателей, характеризующих состояние углеводного обмена, повреждения печени, прооксидантно-антиоксидантной системы, эндогенной интоксикации и функционального состояния митохондрий печени.

На первом этапе исследования была выполнена оценка выраженности повреждений печени в условиях формирования экспериментальных моделей. В результате проведенных исследований было установлено, что на фоне хронической алкоголизации животных происходит выброс ферментов – ЛДГ и АЛТ из ткани печени и наблюдается увеличение их активности в плазме крови в 1,7–2,2 раза. Одновременное моделирование аллоксанового диабета и хронической алкогольной интоксикации у животных 4-й экспериментальной группы ожидаемо сопровождалось еще более значительным увеличением маркеров цитолитического синдрома – активности АЛТ и ЛДГ. Активность ЛДГ в данном случае возрастала до уровня значений, превышающих контрольные в 3,3 раза. Активность АЛТ в плазме крови крыс 4-й группы превышала значение аналогичного показателя 1-й группы в 2,2 раза. Максимальные значения маркеров цитолиза гепатоцитов у животных 4-й группы наглядно демонстрируют влияние сопутствующего развития СД, проявляющееся в усилении поражения печени на фоне алкоголизации.

Определение концентрации глюкозы в плазме крови ожидаемо показало ведущее влияние моделирования аллоксанового диабета. У экспериментальных животных 2-й группы уровень данного показателя превышал значение контрольного параметра на 66 %, а для крыс 4-й группы было характерно еще более существенное возрастание уровня гликемии – до

цифр, превышающих контрольные в 2,0 раза. Таким образом, исследование основных лабораторных маркеров позволило установить, что развитие СД на фоне хронической алкогольной интоксикации у животных характеризуется обоюдным усилением и повреждением печени и нарушения углеводного обмена.

Изменения липидного профиля плазмы крови животных были в также продиктованы развитием аллоксанового диабета. У животных 2-й группы на фоне СД был статистически значимо увеличен уровень концентрации общего холестерина на 66 %, концентрация холестерина ЛПНП была увеличена в 2,0 раза. Аналогичные значения рассматриваемых показателей были определены и у крыс 4-й группы, которым моделировали аллоксановый диабет на фоне хронической алкоголизации. Кроме того, у животных всех опытных групп, включая крыс только с хронической алкогольной интоксикацией, была определена увеличенная на 54–71 % концентрация триглицеридов плазмы крови. Отсутствие статистически значимых отличий между параметрами липидного профиля 2-й и 4-й групп лабораторных животных может быть объяснено второстепенным участием обмена жиров в развитии и течении изученных патологических процессов.

Одной из сторон нарушения липидного обмена может быть перекисное окисление липидов, как часть окислительного стресса. Для интегральной оценки уровня оксидативного стресса была определена концентрация ТБК-реактивных продуктов в отмытой эритроцитарной взвеси. У всех основных групп лабораторных животных уровень данного показателя был статистически значимо выше уровня значения соответствующего параметра контрольной группы. Так на фоне хронической 2-х месячной алкоголизации животных содержание продуктов окислительных модификаций биомолекул было увеличено на 34 %. У крыс 2-й групп содержание ТБК-реактивных продуктов превышало уровень контрольных значений на 68 %, а для животных 4-й группы были характерны еще более высокие цифры – на 85 %

превышающие контрольные. Таким образом, максимальные значения были ассоциированы с развитием СД, что обусловлено более высоким уровнем окислительного стресса, что подтверждается и нашими данными и общими представлениями об участии свободнорадикальных процессов в развитии и прогрессировании осложнений. Такие выводы обоснованы также выявленными особенностями изменений активности ферментного звена. Исследование ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов лабораторных животных показало сниженные значения активности СОД и КАТ во всех опытных группах. На фоне моделирования аллоксанового диабета или хронической алкоголизации животных активность СОД в эритроцитарной взвеси была сниженной на 10–13 %, а у животных 4-й группы значение анализируемого показателя отставало от контрольных цифр на 29 %. Наиболее низкие значения активности КАТ, на 42 % ниже контрольных цифр, были определены у животных 2-й группы. На 31 % ниже контрольного уровня было значение активности анализируемого фермента антиоксидантной защиты в крови животных 3-й группы. В эритроцитах крыс 4-й группы каталазная активность снижена только на 19 %. Можно отметить ведущую роль СД в развитии окислительных повреждений, однако сочетанное течение аллоксан-индуцированного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации представляет собой качественно новое состояние, отличающееся в том числе по проявлениям окислительного стресса от изолированных форм патологических состояний.

Концентрация восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси животных основных экспериментальных групп составляла в среднем 1,66–1,69 мкмоль/мл, что было ниже контрольных значений соответствующего показателя на 31–32 %. Активность ферментов системы глутатиона имела тенденцию к увеличению в эритроцитах крыс основных групп. Так активность ГР у животных с аллоксан-индуцированным СД превышала контрольные цифры на 38 %, а у крыс, подвергавшихся

хронической алкоголизации в течение 2-х месяцев – на 88 %. В эритроцитарной взвеси животных 4-й группы активность ГР была увеличена на 30 %. Активность ГПО эритроцитов крыс 2–3-й групп была увеличена примерно в одинаковой степени – на 50–68 %. Сниженные значения активности КАТ и СОД при увеличенных значениях активности ГР и ГПО очевидно свидетельствуют о дисбалансе ферментного звена антиоксидантной системы, а увеличение содержания ТБК-реактивных продуктов – об интенсификации свободнорадикальных повреждений, что в совокупности составляет классические лабораторные признаки окислительного стресса. Однако высокие значения активности ферментов метаболизма глутатиона могут свидетельствовать о наличии компенсаторных явлений, которые вероятнее всего не справляются с интенсификацией продукции АФК. При этом сравнительно низкие значения активности ферментов тиолового гомеостаза у животных 4-й группы относительно параметров 2–3-й групп могут указывать на явления декомпенсации данного звена системы антиоксидантной защиты с дальнейшим прогрессированием окислительных повреждений и развитием осложнений.

Оценка эндогенной интоксикации показала увеличенное количество веществ со средней и низкой молекулярной массой в биожидкостях животных 2–4-й групп. Для животных 2-й группы было характерно увеличенное значение содержания эндотоксинов плазмы крови на 17 % и эритроцитарной взвеси – на 42 %. На фоне хронической алкогольной интоксикации уровень плазменной фракции веществ со средней и низкой молекулярной массой превышал контрольные значения на 27 %, а уровень эритроцитарной фракции был увеличен в 2,4 раза. Обнаружение резко увеличенного содержания эритроцитарной фракции субстратов токсиколиза свидетельствовало о компенсаторной фазе эндогенной интоксикации. Содержание субстратов эндотоксиколиза в крови крыс 4-й группы представляло собой среднее между значениями показателей групп с

изолированным моделированием СД или хронической алкогольной интоксикации. Исследование уровня эндогенной интоксикации показало, что в данном случае ведущее влияние оказывает моделирование хронической алкоголизации крыс. Сам этиловый спирт и его метаболиты являются токсическими субстратами, оказывающими прямое повреждающее действие на структуры печени, что способствует накоплению токсических веществ напрямую и за счет снижения активности системы дезинтоксикации, локализованной также преимущественно в печени.

Уровень интенсивности флуоресценции продуктов гликирования белков был резко увеличен у животных, которым выполняли моделирование аллоксан-индуцированного диабета. Так у животных 2-й группы были определены максимальные значения данного параметра, превышающие контрольные цифры на 69 %. У крыс 4-й группы содержание продуктов неферментного гликирования было несколько ниже и достигало значений, превышающих контрольные на 33 %. Возможно, что это связано с конкуренцией между процессами гликирования белков на фоне гипергликемического состояния и ацилирования белков с ацетальдегидом – продуктом метаболизма этилового спирта. Обе реакции преимущественно протекают по амидной группе остатков лизина в молекулах белка. Поэтому кажущееся снижение уровня неферментного гликирования белков в данном случае не является доказательством позитивного влияния этилового спирта на формирование поздних осложнений СД и в целом прогноз заболевания.

Содержание остатков битирозина было увеличено на 17–20 % также только у лабораторных животных 2-й и 4-й групп. Было зафиксировано снижение интенсивности собственной флуоресценции триптофанилов белков плазмы крови на 26–31 % у животных 2–4-й групп. В результате проведенной оценки интенсивности флуоресценции АНС было показано снижение данного параметра на фоне хронической алкогольной интоксикации на 11 % относительно нормальных значений, а у животных 4-й группы данный

показатель был на 17 % ниже контроля. Нарушение связывания АНС с молекулой белка может быть связано с тем, что все места связывания заняты или эндотоксинами, или вследствие модификаций белка при его гликировании или окислении. Так как было ранее показано, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождается более выраженными проявлениями эндогенной интоксикации первое предположение является более вероятным.

Общим итогом первого раздела исследования является определение ведущего значения моделирования СД в развитии окислительного стресса и ключевой роли хронической алкоголизации животных в развитии эндогенной интоксикации. Экспериментальное моделирование сочетанного патологического процесса, сопровождалось интенсификацией окислительных процессов и эндогенной интоксикации, при этом общая выраженность данных нарушений в целом соответствовала изолированным формам изученных патологий с некоторыми особенностями, определяющими сочетанную форму как качественно новое состояние организма животного или коморбидное состояние. Наложение друг на друга эффектов метаболических нарушений у животных 4-й группы способствовало усилению основных лабораторных проявлений, характеризующих нарушения углеводного обмена и цитолитический синдром при поражении печени.

Исследование эффективности использования серосодержащих препаратов для снижения цитолиза гепатоцитов показало неоднозначные результаты. Введение гептрала животным с моделированием хронической алкогольной интоксикации показало наиболее высокую эффективность, заключающуюся в способности снижать проявления цитолитического синдрома. Активность ЛДГ в плазме крови крыс 5-й группы статистически значимо не отличалась от значения контрольного показателя, активность АЛТ в плазме крови превышала контрольные цифры только на 31 %. На фоне

введения метионина активность ЛДГ в плазме крови достигала средних значений почти 300 ед/л, что было в 1,5 раза выше уровня животных группы сравнения, активность АЛТ также была увеличена и достигала уровня, превышающего значения показателя группы сравнения на 20 %. Введение липоевой кислоты по какой-либо из схем оказывало слабое влияние на маркеры повреждения печени у крыс 7–9 групп. Только у животных 9-й группы активность обоих изученных лабораторных маркеров была ниже значений соответствующих показателей группы сравнения : активность ЛДГ была снижена на 25 %, а активность АЛТ – на 14 %. Дальнейшие исследования нарушений обмена веществ и особенностей изменений окислительного метаболизма были направлены на поиск объяснений результатов оценки влияния серосодержащих соединений на цитолиз гепатоцитов в условии хронической алкогольной интоксикации.

В результате проведенных исследований влияния серосодержащих соединения на состояние окислительного гомеостаза было установлено, что у животных группы сравнения значение общей АОА плазмы крови было снижено на 23 % относительно показателя контрольной группы. Проведение коррекции любым из способов способствовало увеличению анализируемого показателя до уровня контрольной группы. При этом наиболее высокие значения общей АОА были определены в крови животных, которым вводили липоевую кислоту по одной из предложенных схем. Очевидно, что не прослеживается связь между антиоксидантным потенциалом плазмы крови и выраженностью поражения печени. Это указывает на небольшие перспективы поиска эффективных гепатопротекторов среди веществ, являющихся по своему механизму прямыми гидрофильными антиоксидантами. Анализ маркеров окислительного стресса показал, что в крови крыс группы сравнения содержание ТБК-реактивных продуктов было увеличено на 34 %, диеновых конъюгатов – в 2,1 раза, а триеновых конъюгатов – в 4,4 раза. На фоне введения адеметионина концентрация

ТБК-реактивных продуктов не отличалась от уровня контрольных цифр, содержание диеновых соответствовало уровню аналогичного показателя группы сравнения, а содержание триеновых конъюгатов было ниже на 40 %. Использование метионина с целью метаболической коррекции способствовало снижению содержания только триеновых конъюгатов на 28 %. Введение липоевой кислоты демонстрировало в целом хороший эффект, направленный на снижение образование продуктов окислительных модификаций биомолекул. Наиболее эффективным оказалось снижение рассматриваемых показателей на фоне введения липоевой кислоты в парентеральной форме животным 8-й и 9-й групп. В данном случае уровень ТБК-реактивных продуктов эритроцитарной массы был снижен до уровня контрольной группы.

Исходно сниженная на 29 % концентрация глутатиона эритроцитарной взвеси животных группы сравнения оставалась на таком же уровне и в условиях проведения коррекции с использованием различных серосодержащих веществ. Активность ферментов антиоксидантной защиты изменялась у крыс разных групп на фоне коррекции более сложным образом. Как уже было указано ранее активность КАТ у животных группы сравнения на фоне хронической алкогольной интоксикации была сниженной на 31 %, а активность ГПО эритроцитарной взвеси наоборот была увеличена на 50 %. Проведение метаболической коррекции с использованием S-аденозилметионина в составе гептрала способствовало наиболее выраженным изменениям активности анализируемых ферментов – их активность в эритроцитарной взвеси возвращалась к нормальным значениям. В крови животных 6-й группы, получавших свободный метионин, наблюдалось дальнейшее снижение каталазной активности, которая была ниже контрольного уровня в 2,3 раза, активность ГПО при этом оставалась на уровне значения показателя животных группы сравнения. У животных 8-й и 9-й групп каталазная активность была существенно увеличена и даже превышала уровень контрольных цифр на

20–53 %. Активность другого фермента – ГПО при этом снижалась относительно соответствующего показателя 3-й группы и достигала в крови крыс 8-й и 9-й групп уровня контрольных значений.

Проведение терапии с использованием серосодержащих средств в разной степени способствовало снижению концентрации веществ со средней и низкой молекулярной массой. Во всех группах животных концентрация субстратов эндотоксикоза в плазме крови снижалась в равной степени и достигала уровня контрольных цифр. В эритроцитарной взвеси резко увеличенное содержание потенциально токсических субстратов на фоне терапии заметно снижалось. На фоне введения метионина данный показатель был снижен на 45 % относительно группы сравнения. Введение аденозилметионина или липоевой кислоты по пероральной схеме способствовало снижению рассматриваемого параметра на 51 %. Наиболее высокая эффективность была выявлена при использовании липоевой кислоты у животных 8-й и 9-й групп. Результаты исследований показали возможность снижения уровня эндогенной интоксикации при использовании различных серосодержащих соединений и даже метионина, который демонстрировал отрицательные результаты при оценке цитолиза. Не отличались значения содержания эндотоксинов в биожидкостях крыс, получавших адеметионин или липоевую кислоту. Вероятно, что уменьшение проявлений эндотоксикоза – важный патогенетический аспект хронической алкогольной интоксикации, но недостаточный для защиты гепатоцитов от повреждений.

Определение показателей окислительного метаболизма в печени показало более значительные отличия между группами животных, получавших аденозилметионин и другие серосодержащие препараты. Исследование общей АОА гомогената печени показало снижение значения данного показателя на 31 % на фоне развития хронической алкогольной интоксикации. Только введение адеметионина способствовало увеличению уровня общей АОА гомогената печени относительно значения показателя

группы сравнения, тогда как в других группах аналогичные показатели оставались такими же низкими, как и в 3-й группе. Учитывая, что уровень общей АОА в плазме крови был увеличен во всех опытных группах, здесь большее значение имеет косвенное влияние адеметионина на систему антиоксидантной защиты через его метаболические эффекты в гепатоцитах.

При определении маркеров состояния системы антиоксидантной защиты печени была определена сниженная на 39 % концентрация глутатиона на фоне развития хронической алкогольной интоксикации у крыс. Только коррекция с использованием адеметионина сопровождалась ростом данного показателя на 35 % относительно группы сравнения. Активность ферментов системы антиоксидантной защиты печени крыс на фоне хронической алкоголизации имела отчетливую тенденцию к увеличению. Так активность ГПО паренхимы печени животных 3-й группы была увеличена в 2,0 раза, а активность КАТ превышала контрольные цифры уже в 3,6 раз. На фоне проведения метаболической коррекции активность рассматриваемых ферментов имела тенденцию к снижению. Наиболее существенное снижение активности ГПО было зафиксировано на фоне введения адеметионина. У животных остальных групп уровень активности ГПО оставался выше контрольных цифр, но все же ниже, чем в группе сравнения. Активность КАТ у животных на фоне проведения терапии также стремилась к снижению в сторону уровня 1-й группы, кроме показателя 7-й группы лабораторных животных. На фоне введения гептрала активность КАТ гомогената печени, как и ГПО, возвращалась к нормальным значениям. У животных 6-й и 9-й групп каталазная активность гомогената печени была ниже аналогичного показателя группы сравнения в 2,1–2,3 раза, но оставалась выше контрольных цифр в 1,6–1,7 раза.

Основные данные о состоянии энергетического обмена и функционального состояния митохондрий гепатоцитов были получены при исследовании способности изолированных митохондрий печени крыс

генерировать мембранный потенциал при внесении в тест-систему сукцината натрия. Было показано, что митохондрии интактной печени крыс способны генерировать потенциал около 180 мВ (данные получены согласно расчетным теоретическим формулам). На фоне хронической алкогольной интоксикации данный параметр значительно снижался, достигая в среднем 113 мВ. Только введение аденозилметионина было способно обеспечить увеличение анализируемого параметра до уровня 160 мВ, в то время как на фоне введения липоевой кислоты никаких статистически значимых изменений не было выявлено, а введение метионина оказывало негативный эффект на функциональное состояние митохондрий печени – среднее расчетное значение мембранного потенциала было снижено до 67 мВ.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности коррекции и метаболических нарушений, и повреждения печени в условиях хронической алкогольной интоксикации с использованием различных серосодержащих средств. Несомненно, наиболее высокую эффективность, особенно в области решения основной задачи – гепатопротекции, продемонстрировал аденозилметионин. Использование метионина в целом показало противоположные результаты, а введение липоевой кислоты по одной из исследуемых схем в основном оказывало действие, направленное на поддержку функциональной активности антиоксидантной системы крови, но не способствовало усилению данного звена системы неспецифической резистентности печени. Сравнительная оценка разных схем введения липоевой кислоты показала преимущество парентерально введения, что проявлялось в более значительном снижении интенсивности свободнорадикальных процессов и цитолиза гепатоцитов. Однако, одинаковые результаты были получены при изучении эффективности только внутрибрюшинного введения или предварительной терапии парентеральной формой липоевой кислоты в течение недели с последующим переходом на поддерживающую коррекцию с пероральной формой препарата.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальное моделирование сахарного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации у крыс сопровождается усилением повреждения печени и нарушений углеводного обмена. Это подтверждено превышением активности ЛДГ и АЛТ в плазме крови крыс с сочетанной формой патологического процесса на 48 % и 26 % соответственно при сравнении с показателями животных с хронической алкогольной интоксикацией, а также увеличенным содержанием глюкозы плазмы крови на 21 % относительно значения соответствующего показателя крыс с аллоксановым диабетом.

2. Изменения липидного профиля и нарушения окислительного метаболизма в условиях сочетанного моделирования хронической алкогольной интоксикации и аллоксан-индуцированного диабета в основном связаны с развитием сахарного диабета, тогда как алкоголизация животных оказывает основное влияние на развитие эндогенной интоксикации. При этом общая выраженность данных нарушений в целом соответствовала изолированным формам изученных патологий с некоторыми особенностями, определяющими сочетанную форму как качественно новое состояние организма животного. Сочетание метаболических эффектов алкоголизации и сахарного диабета способствует усилению основных лабораторных проявлений, характеризующих нарушения углеводного обмена и цитолитический синдром.

3. Введение S-аденозилметионина животным с хронической алкогольной интоксикацией показало выраженные цитопротективные способности, что выразилось в снижении активности АЛТ и ЛДГ практически до уровня нормальных значений. Это в основном было связано с влиянием на метаболические системы печени, поскольку использование только этого препарата сопровождалось повышением общей

антиоксидантной активности на 43 %, увеличением концентрации глутатиона на 35 %, восстановлением функционального состояния ферментов антирадикальной защиты и нормализацией энергетического метаболизма в гепатоцитах.

4. Введение свободного метионина оказывало в основном негативные эффекты, связанные с дополнительным усилением цитолиза гепатоцитов и увеличением активности ЛДГ и АЛТ на 54 % и 20 % соответственно, не способствовало снижению интенсивности образования продуктов перекисного окисления липидов и усиливало нарушения функционального состояния митохондрий печени. Это может быть связано с нарушением активации метионина, требующим затраты АТФ на фоне гипоэнергетического состояния, подтверждающегося снижением на 63 % способности митохондрий генерировать мембранный потенциал.

5. Использование липоевой кислоты оказывает существенное воздействие на метаболические системы крови, проявляющиеся в повышении общей антиоксидантной активности плазмы крови на 42 %, снижении образования продуктов окислительных модификация биомолекул на 27–50 % и восстановлении функциональной активности ферментов антирадикальной защиты. Тем не менее этого было недостаточно для реализации цитопротективных свойств, характерных для тиоэфирного соединения – S-аденозилметионина. Для разработки эффективных способов гепатопротекции более перспективным направлением является поиск соединений, обладающих не только прямой антиоксидантной активностью, но и обеспечивающих усиление детоксикационной функции печени.

6. Сравнительная оценка разных схем введения липоевой кислоты показала преимущество парентерально введения, что проявлялось в значительном снижении интенсивности свободнорадикальных процессов и цитолиза гепатоцитов. Однако, одинаковые результаты были получены при изучении эффективности только внутрибрюшинного введения или

предварительной терапии парентеральной формой липоевой кислоты в течение недели с последующим переходом на поддерживающую коррекцию с пероральной формой препарата, что позволяет обосновано рекомендовать эту схему терапии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для коррекции нарушений антиоксидантного статуса крови при хронической алкогольной интоксикации можно использовать липоевую кислоту, которую на начальном этапе (в течение недели) необходимо вводить в парентеральной форме с дальнейшим переходом на поддерживающую терапию в пероральной форме этого препарата. При этом целесообразно дополнять такую схему терапии средствами с доказанной гепатопротекторной направленностью действия.

2. С целью коррекции повреждений печени, развивающихся на фоне хронической алкогольной интоксикации целесообразно использовать активную форму метионина – аденозилметионин, который направленно действует на метаболические системы печени. При этом свободный метионин вводить не рекомендуется, так как он только усиливает повреждение гепатоцитов, что подтверждается увеличением маркеров цитолитического синдрома.

3. При сочетанном течении сахарного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации для повышения информативности оценки метаболических нарушений и прогнозирования течения заболевания следует учитывать изменения маркеров окислительного стресса (содержание ТБК-реактивных продуктов, активность КАТ и СОД в эритроцитах, уровень тиоловых групп и битирозина в плазме крови), основной вклад в которые вносит сахарный диабет, и эндогенной интоксикации (ВСиНММ плазмы крови и эритроцитов, флуоресценция 1,8-АНС в плазме крови), ведущее значение в изменении которых имеет алкоголизация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОА	– антиоксидантная активность
АОС	– антиоксидантная система
ГПО	– глутатионпероксидаза
ГР	– глутатионредуктаза
КАТ	– каталаза
МСиНММ	– молекулы со средней и низкой молекулярной массой
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
СОД	– супероксиддисмутаза
ТБЧ	– тиобарбитуровое число
GSH	– восстановленный глутатион

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабенко, Н.А. Влияния старения и экспериментально вызванных модификаций сигнальных путей на инсулининдуцированные сдвиги обмена глюкозы в коре головного мозга крыс / Н.А. Бабенко, В.С. Харченко // *Нейрофизиология*. – 2015. – Т. 47. – № 1. – С. 19–25.

2. Бортникова, А.К. Влечение к этанолу у алкоголизированных крыс и уровень гликемии, выраженность кетоза / А.К. Бортникова, Т.И. Панова // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2014. – № 1 (09). – С. 52–61.

3. Бортникова, А.К. Влияние уровня гликемии на потребление этанола и глюкозы алкоголь-зависимыми крысами / А.К. Бортникова, Т.И. Панова // *Университетская клиника*. – 2013. – Т. 9. – № 1. – С. 20–25.

4. Бортникова, А.К. Снижение способности мозга алкогользависимых крыс утилизировать глюкозу / А.К. Бортникова // *Архив клинической и экспериментальной медицины*. – 2013. – Т. 22. – № 1. – С. 20–23.

5. Буеверов, А.О. Поражение печени при сахарном диабете 1-го типа / А.О. Буеверов, А.В. Зилов // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2021. – Т. 31. – № 2. – С. 7–13.

6. Быков, И.М. Изменение биохимических и иммунологических показателей у больных воспалительными заболеваниями органов малого таза при проведении антиоксидантной коррекции / И.М. Быков, К.А. Попов, И.А. Егорова [и др.] // *Аллергология и иммунология*. – 2018. – Т. 19. – № 1. – С. 21–25.

7. Вовк, Е. Гастроинтестинальные осложнения сахарного диабета / Е. Вовк // *Врач*. – 2013. – № 12. – С. 6–18.

8. Высокогорский, В.Е. Роль гидроперекисей в окислительном стрессе при алкоголизации на фоне экспериментального сахарного диабета / В.Е. Высокогорский, О.Ю. Жукова, Л.Ф. Панченко // *Наркология*. – 2007. – № 12. – С. 41–45.

9. Гулинская, О.В. Клинико-морфологические особенности хронического гепатита с при сахарном диабете 2-го типа / О.В. Гулинская, В.М. Цыркунов, Н.И. Прокопчик // *Здравоохранение (Минск)*. – 2015. – № 3. – С. 4–8.

10. Гулинская, О.В. Прогнозирование развития сахарного диабета 2-го типа у пациентов с хроническим гепатитом С / О.В. Гулинская // *Гепатология и гастроэнтерология*. – 2017. – Т. 1. – № 1. – С. 89–92.

11. Дербак, М.А. Состояние углеводного обмена у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с вирусом гепатита С / М.А. Дербак, Э.Й. Архий, О.Н. Москаль, О.Т. Олексик // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2014. – № 2 (102). – С. 70а.

12. Жаркова, Н.В. Изменения показателей азотистого обмена при острой алкогольной интоксикации у крыс с аллоксановым диабетом / Н.В. Жаркова, П.П. Потапов, А.Ю. Стельмах // *Биомедицинская химия*. – 2012. – Т. 58. – № 2. – С. 220–223.

13. Жукова, О.Ю. Влияние острой алкогольной интоксикации на хемилюминесценцию митохондрий печени при экспериментальном сахарном диабете / О.Ю. Жукова, В.Е. Высокогорский // *Успехи современного естествознания*. – 2005. – № 10. – С. 54–56.

14. Жукова, О.Ю. Прогрессирование окислительного стресса при семидневной алкоголизации на фоне сахарного диабета в эксперименте / О.Ю. Жукова, В.Е. Высокогорский, Т.В. Притыкина // *Современные наукоемкие технологии*. – 2005. – № 7. – С. 41–43.

15. Индутный, А.В. Манифестация и патохимические предпосылки повреждения миокарда при сочетании хронической интоксикации алкоголем и сахарного диабета / А.В. Индутный, В.Е. Высокогорский, Д.Е. Быков // *Наркология*. – 2009. – № 2. – С. 57–61.

16. Индутный, А.В. Уровень продуктов свободнорадикального окисления в сердце и плазме крови при сахарном диабете в сочетании с

хронической алкогольной интоксикацией / А.В. Индутный, Д.Е. Быков, В.Е. Высокогорский // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56. – № 2. – С. 257–265.

17. Индутный, А.В. Характеристика проявления окислительного стресса у больных сахарным диабетом типа 2, злоупотребляющих алкоголем / А.В. Индутный, В.Е. Высокогорский, Л.Н. Индутная // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50. – № 1. – С. 100–103.

18. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Справочник / В.С. Камышников. – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.

19. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 2002. – 600 с.

20. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.И. Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.

21. Лелевич, С.В. Функциональное состояние некоторых путей метаболизма глюкозы в печени крыс при хронической алкогольной интоксикации / С.В. Лелевич // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – № 6. – С. 727–733.

22. Мокрый, В.Я. Нарушения системы перекисного окисления липидов при сахарном диабете 2-го типа (обзор литературы) / В.Я. Мокрый, С.В. Зяблицев, Р.Н. Борис // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2015. – № 7 (71). – С. 41–44.

23. Морковин, Е.И. Коррекция токсических эффектов этанола у крыс при помощи перорального введения ацетилцистеина / Е.И. Морковин, Н.А. Осадченко, Д.В. Куркин [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2019. – № 4. – С. 43–46.

24. Пальцев, И.В. Сывороточный ферритин-предиктор сахарного диабета 2 типа у пациентов с хроническими гепатитами / И.В. Пальцев,

А.Л. Калинин, Е.Н. Сницаренко // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – № 2 (48). – С. 65–68.

25. Панов, А.В. Практическая митохондриология / А.В. Панов. – Новосибирск, 2015. – doi : 10.13140/2.1.1599.3127.

26. Панченко, Л.Ф. Окислительный стресс при алкогольной болезни печени / Л.Ф. Панченко, Б.В. Давыдов, Н.Н. Теребилина, В.Ю. Баронец, А.С. Журавлева // Биомедицинская химия. – 2013. – Т. 59. – № 4. – С. 452–458.

27. Пеньков, Д.Н. Связь инсулиновой резистентности с адипогенезом : роль транскрипционных и секретируемых факторов / Д.Н. Пеньков, А.Д. Егоров, М.Н. Мозговая, В.А. Ткачук // Биохимия. – 2013. – Т. 78. – № 1. – С. 14–26.

28. Перевощикова, И.В. Сафранин О как флуоресцентный индикатор мембранного потенциала митохондрий : исследование на уровне суспензии и уровне отдельных митохондрий / И.В. Перевощикова, А.И. Сорочкина, Д.Б. Зоров, Ю.Н. Антоненко // Биохимия. – 2009. – Т. 74 (6). – С. 814–824.

29. Попов, К.А. Способ оценки резистентности организма к воздействию прооксидантных факторов / К.А. Попов, М.И. Быков, А.А. Басов, И.А. Егорова, Е.Е. Есауленко, Е.А. Алескеенко, С.Р. Федосов, И.А. Севостьянов // Патент на изобретение RU 2629391. МПК G01N 33/49. – Заявл. 10.03.2017; опубл. 29.08.2017. – Бюл. № 25. – 16 с.

30. Пронько, П.С. Влияние потребления алкоголя на риск развития метаболического синдрома / П.С. Пронько // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі № 3 2016 Серыя медыцынскіх навук. – 2016. – № 3. – С. 117–125.

31. Спасов, А.А. Терапевтический потенциал разрывателей поперечных сшивок гликированных белков / А.А. Спасов, А.И. Ращенко // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – № 1 (57). – С. 12–15.

32. Чещевик, В.Т. Мембранный потенциал митохондрий гепатоцитов крыс при токсическом поражении печени / В.Т. Чещевик // Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук. – 2010. – № 2. – С. 75–80.

33. Чигринский, Е.А. Метаболические нарушения в органах репродуктивной системы крыс при острой алкогольной интоксикации на фоне интенсивных физических нагрузок / Е.А. Чигринский, В.Д. Конвай, Т.В. Герунов, Л.К. Герунова // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. – Т. 12. – № 1. – С. 55–60.

34. Якубовский, С.В. Окислительная модификация белков сыворотки крови у больных острым холециститом / С.В. Якубовский, С.В. Ткачев // Медицинский журнал. – 2008. – № 1 (23). – С. 84–86.

35. Addolorato, G. Treatment of alcohol use disorders in patients with alcoholic liver disease / G. Addolorato, A. Mirijello, P. Barrio, A. Gual // Journal of Hepatology. – 2016. – Vol. 65 (3). – P. 618–630.

36. Al Hannan, F. Human resistin and the RELM of inflammation in diabetes / F. Al Hannan, K.G. Culligan // Diab. Metab. Syndr. – 2015. – Vol. 7. – P. 54.

37. Al-Humadi, H.W. The impact of low alcohol consumption on the liver and inflammatory cytokines in diabetic rats / H.W. Al-Humadi, R. Al-Saigh, A. Sahib // Adv. Clin. Exp. Med. – 2019. – Vol. 28 (3). – P. 331–337.

38. Anne, R. Role of inflammation in diabetic retinopathy / R. Anne, P. Sonia, F. Patrice // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19. – P. 942–973.

39. Anstee, Q.M. Genetic factors that affect risk of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease / Q.M. Anstee, D. Seth, C.P. Day // Gastroenterology. – 2016. – Vol. 150 (8). – P. 1728–1744.

40. Arneth, B. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes / B. Arneth, R. Arneth, M. Shams // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20 (10). – P. 2467.

41. Ayala, A. Lipid Peroxidation : Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal / A. Ayala,

M.F. Muñoz, S. Argüelles // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 31.

42. Butkowski, E.G. Diabetes, oxidative stress and cardiovascular risk / E.G. Butkowski, L.M. Brix, H.A. Al-Aubaidy, H. Kiat, H.J. Jelinek // *J. Med. Clin. Sci.* – 2016. – Vol. 5 (1). – P. 17–23.

43. Butkowski, E.G. Hyperglycaemia, oxidative stress and inflammation markers / E.G. Butkowski, H.F. Jelinek // *Redox Rep.* – 2017. – Vol. 22. – P. 257–264.

44. Calabrese, V. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes / V. Calabrese, C. Cornelius, V. Leso et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1822 (5). – P. 729–736.

45. Carresio C. The effect of natural antioxidants in the development of metabolic syndrome : focus on bergamot polyphenolic fraction / C. Carresi, M. Gliozzi, V. Musolino, M. Scicchitano, F. Scarano, F. Bosco, S. Nucera, J. Maiuolo, R. Macrì, S. Ruga, F. Oppedisano, M.C. Zito, L. Guarnieri, R. Mollace, A. Tavernese, E. Palma, E. Bombardelli, M. Fini, V. Mollace // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12 (5). – P. 1504.

46. Cederbaum, A.I. Alcohol metabolism / A.I. Cederbaum // *Clin. Liver Dis.* – 2012. – Vol. 16 (4). – P. 667–685.

47. Ceni, E. Pathogenesis of alcoholic liver disease : role of oxidative metabolism / E. Ceni, T. Mello, A. Galli // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20 (47). – P. 17756–17772.

48. Chang, B. Short- or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver injury in mice : An important role for CXCL1 / B. Chang, M.J. Xu, Z. Zhou, Y. Cai, M. Li, W. Wang, D. Feng, A. Bertola, H. Wang, G. Kunos, B. Gao // *Hepatology*. – 2015. – Vol. 62. – P. 1070–1085.

49. Choi, S.W. Antioxidant properties of drugs used in Type 2 diabetes management : could they contribute to, confound or conceal effects of antioxidant therapy? / S.W. Choi, C.K. Ho // *Redox Rep.* – 2018. – Vol. 23 (1). – P. 1–24.

50. Cunningham, C.C. Ethanol consumption and liver mitochondria function / C.C. Cunningham, S.M. Bailey // *Biol. Signals Recept.* – 2001. – Vol. 10 (3-4). – P. 271–282.

51. Das, S. Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis / S. Das, J.S. Maras, M.S. Hussain, S. Sharma, P. David, S. Sukriti, S.M. Shasthry, R. Maiwall, N. Trehanpati, T.P. Singh, S.K. Sarin // *Hepatology.* – 2017. – Vol. 65. – P. 631–646.

52. Dawood, A.A. Factors associated with improved glycemic control by direct-acting antiviral agent treatment in egyptian type 2 diabetes mellitus patients with chronic hepatitis C genotype 4 / A.A. Dawood, M.Z. Nooh, A.A. Elgamal // *Diabetes Metab. J.* – 2017. – Vol. 41. – P. 316–321.

53. Dayre, A. Diabetes increases inflammation and oxidative stress / A. Dayre, C. Pouvreau, E.G. Butkoswki, B. de Jong, H.F. Jelinek // *Int. J. Pharm. Sci. Dev. Res.* – 2016. – Vol. 2. – P. 012–018.

54. Dewidar, B. Metabolic liver disease in diabetes – From mechanisms to clinical trials / B. Dewidar, S. Kahl, K. Pafili, M. Roden // *Metabolism.* – 2020. – Vol. 111S. – P. 154299.

55. Dhalla, N.S. Role of oxidative stress in metabolic and subcellular abnormalities in diabetic cardiomyopathy / N.S. Dhalla, A.K. Shah, P.S. Tappia // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (7). – P. 2413.

56. Dinh, Q.N. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension / Q.N. Dinh, G.R. Drummond, C.G. Sobey, S. Chrissobolis // *BioMed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 11.

57. Dlodla, P.V. The impact of coenzyme Q₁₀ on metabolic and cardiovascular disease profiles in diabetic patients : A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / P.V. Dlodla, T.M. Nyambuya, P. Orlando, S. Silvestri, V. Mxinwa, K. Mokgalaboni, B.B. Nkambule, J. Louw, C.J.F. Muller, L. Tiano // *Endocrinol. Diabetes Metab.* – 2020. – Vol. 3 (2). – P. e00118.

58. Donnadieu-Rigole, H. Follow-up of alcohol consumption after liver transplantation : Interest of an addiction team? / H. Donnadieu-Rigole, L. Olive, B. Nalpas et al. // *Alcoholism : Clinical and Experimental Research*. – 2017. – Vol. 41 (1). – P. 165–170.

59. Dunn, W. Pathogenesis of alcoholic liver disease / W. Dunn, V.H. Shah // *Clin. Liver Dis*. – 2016. – Vol. 20 (3). – P. 445–56.

60. Edenberg, H.J. Alcohol dehydrogenases, aldehyde dehydrogenases, and alcohol use disorders : a critical review / H.J. Edenberg, J.N. McClintick // *Alcohol Clin. Exp. Res*. – 2018. – Vol. 42 (12). – P. 2281–2297.

61. Engler, P.A. Alcohol use of diabetes patients : the need for assessment and intervention / P.A. Engler, S.E. Ramsey, R.J. Smith // *Acta Diabetol*. – 2013. – Vol. 50 (2). – P. 93–99.

62. Esser, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes / N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A.J. Scheen, N. Paquot // *Diabetes Res. Clin. Pract*. – 2014. – Vol. 105. – P. 141–150.

63. Fransen, M. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism : implications for human disease / M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang, O. Apanasets // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. – 2012. – Vol. 1822 (9). – P. 1363–1373.

64. Fujita, T. Hepatic stellate cells relay inflammation signaling from sinusoids to parenchyma in mouse models of immune-mediated hepatitis / T. Fujita, K. Soontrapa, Y. Ito et al. // *Hepatology*. – 2016. – Vol. 63 (4). – P. 1325–1339.

65. Ganesan, M. Acetaldehyde accelerates HCV-induced impairment of innate immunity by suppressing methylation reactions in liver cells / M. Ganesan, J. Zhang, T. Bronich et al. // *American Journal of Physiology : Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2015. – Vol. 309 (7). – P. G566–G577.

66. Ganesan, M. Role of apoptotic hepatocytes in HCV dissemination : Regulation by acetaldehyde / M. Ganesan, S.K. Natarajan, J. Zhang et al. //

American Journal of Physiology : Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2016. – Vol. 310 (11). – P. G930–G940.

67. Gao, B. Animal models of alcoholic liver disease : pathogenesis and clinical relevance / B. Gao, M.J. Xu, A. Bertola, H. Wang, Z. Zhou, S. Liangpunsakul // Gene Expr. – 2017. – Vol. 17 (3). – P. 173–186.

68. Gar, C. Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes / C. Gar, M. Rottenkolber, C. Prehn, J. Adamski, J. Seissler, A. Lechner // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. – 2018. – Vol. 55 (1). – P. 21–32.

69. García-Sánchez, A. The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases / A. García-Sánchez, A.G. Miranda-Díaz, E.G. Cardona-Muñoz // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2020. – Vol. 2020. – P. 2082145.

70. Gomes, B.F. Immunoinflammatory mediators in the pathogenesis of diabetes mellitus / B.F. Gomes, C.M. Accardo // Einstein (Sao Paulo). – 2019. – Vol. 17 (1). – P. eRB4596.

71. Guasch-Ferré, M. Metabolomics in prediabetes and diabetes : a systematic review and meta-analysis / M. Guasch-Ferré, A. Hruby, E. Toledo, C.B. Clish, M.A. Martínez-González, J. Salas-Salvadó, F.B. Hu // Diabetes Care. – 2016. – Vol. 39. – P. 833–846.

72. Hojs, R. Markers of inflammation and oxidative stress in the development and progression of renal disease in diabetic patients / R. Hojs, R. Ekart, S. Bevc, N. Hojs // Nephron. – 2016. – Vol. 133. – P. 159–62.

73. Hosseini, A. Diabetic neuropathy and oxidative stress : therapeutic perspectives / A. Hosseini, M. Abdollahi // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2013. – Vol. 2013. – P. 168039.

74. Hu, F.B. Curbing the diabetes pandemic : The need for global policy solutions / F.B. Hu, A. Satija, J.E. Manson // JAMA. – 2015. – Vol. 313. – P. 2319–2320.

75. International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas. 3rd edition. Brussels, Belgium : International Diabetes Federation; 2017.

76. Jelinek, H.F. Glutathione : Glutathione sulfide redox imbalance in early impaired fasting glucose / H.F. Jelinek, H.A. Al-Aubaidy, L. Maschirow, S. Meidinger, D.A. Jamil, E. Butkowski // *Cardiol. Angiol.* – 2014. – Vol. 2 (4). – P. 223–229.

77. Juchniewicz, H. Oxygen-Ozone (O₂-O₃) Therapy in peripheral arterial disease (PAD) : a review study / H. Juchniewicz, A. Lubkowska // *Ther. Clin. Risk Manag.* – 2020. – Vol. 16. – P. 579–594.

78. Jung, Y.C. Alcohol : intoxication and poisoning – diagnosis and treatment / Y.C. Jung, K. Namkoong // *Handb. Clin. Neurol.* – 2014. – Vol. 125. – P. 115–121.

79. Kamat, P.K. Homocysteine, alcoholism, and its potential epigenetic mechanism / P.K. Kamat, C.J. Mallonee, A.K. George, S.C. Tyagi, N. Tyagi // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2016. – Vol. 40 (12). – P. 2474–2481.

80. Kim, S.H. Superoxide dismutase gene (SOD1, SOD2, and SOD3) polymorphisms and antituberculosis drug-induced hepatitis / S.H. Kim, S.H. Kim, J.H. Lee et al. // *Allergy, Asthma & Immunology Research.* – 2015. – Vol. 7 (1). – P. 88–91.

81. Kirpich, I.A. Alcoholic liver disease : Update on the role of dietary fat / I.A. Kirpich, M.E. Miller, M.C. Cave et al. // *Biomolecules.* – 2016. – Vol. 6 (1). – P. 1.

82. Kosakowska, O. Antioxidant and Antibacterial Activity of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) Dry Extracts / O. Kosakowska, K. Bączek, J.L. Przybył, E. Pióro-Jabrucka, W. Czupa, A. Synowiec, M. Gniewosz, R. Costa, L. Mondello, Z. Węglarz // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23 (7). – P. 1767.

83. Kubiak-Tomaszewska, G. Molecular mechanisms of ethanol biotransformation : enzymes of oxidative and nonoxidative metabolic pathways in human / G. Kubiak-Tomaszewska, P. Tomaszewski, J. Pachecka, M. Struga,

W. Olejarz, M. Mielczarek-Puta, G. Nowicka // *Xenobiotica*. – 2020. – Vol. 50 (10). – P. 1180–1201.

84. Le Daré, B. Ethanol and its metabolites : update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects / B. Le Daré, V. Lagente, T. Gicquel // *Drug Metab. Rev.* – 2019. – Vol. 51 (4). – P. 545–561.

85. Le Daré, B. Therapeutic applications of ethanol : a review / B. Le Daré, T. Gicquel // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2019. – Vol. 22 (1). – P. 525–535.

86. Lecube, A. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients : A case-control study / A. Lecube, C. Hernández, J. Genescà, R. Simó // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29 (5). – P. 1096–1101.

87. Levy, R.E. Ethnic differences in presentation and severity of alcoholic liver disease / R.E. Levy, A.M. Catana, B. Durbin-Johnson, et al. // *Alcoholism : Clinical and Experimental Research*. – 2015. – Vol 39 (3). – P. 566–574.

88. Li, M. MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6-p47phox-oxidative stress pathway in neutrophils / M. Li, Y. He, Z. Zhou, T. Ramirez, Y. Gao, Y. Gao, R.A. Ross, H. Cao, Y. Cai, M. Xu, D. Feng, P. Zhang, S. Liangpunsakul, B. Gao // *Gut*. – 2017. – Vol. 66. – P. 705–715.

89. Liangpunsakul, S. Alcoholic liver disease in Asia, Europe, and North America / S. Liangpunsakul, P. Haber, G.W. McCaughan // *Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 150. – P. 1786–1797.

90. Liguori, I. Oxidative stress, aging, and diseases / I. Liguori, G. Russo, F. Curcio et al. // *Clinical Interventions in Aging*. – 2018. – Vol. 13. – P. 757–772.

91. Liyanagamage, D.S.N.K. Role of Mitochondrial Stress Protein HSP60 in Diabetes-Induced Neuroinflammation / D.S.N.K. Liyanagamage, R.D. Martinus // *Mediators Inflamm.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 8073516.

92. Lu, Y. Cytochrome P450s and alcoholic liver disease / Y. Lu, A.I. Cederbaum // *Curr. Pharm. Des.* – 2018. – Vol. 24 (14). – P. 1502–1517.

93. Maschirow, L. Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes – Biomarkers as a possible tool for early disease

detection for rural screening / L. Maschirow, K. Khalaf, H.A. Al-Aubaidy, H.F. Jelinek // *Clin. Biochem.* – 2015. – Vol. 48 (9). – P. 581–585.

94. Mathews, S. Invariant natural killer T cells contribute to chronic-plus-binge ethanol-mediated liver injury by promoting hepatic neutrophil infiltration / S. Mathews, D. Feng, I. Maricic, C. Ju, V. Kumar, B. Gao // *Cell. Mol. Immunol.* – 2016. – Vol. 13. – P. 206–216.

95. Matyas, C. Chronic plus binge ethanol feeding induces myocardial oxidative stress, mitochondrial and cardiovascular dysfunction, and steatosis / C. Matyas, Z.V. Varga, P. Mukhopadhyay, J. Paloczi, T. Lajtos, K. Erdelyi, B.T. Nemeth, M. Nan, G. Hasko, B. Gao, P. Pacher // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2016. – Vol. 310. – P. 1658–1670.

96. McDonnell-Dowling, K. The role of oxidative stress in methamphetamine-induced toxicity and sources of variation in the design of animal studies / K. McDonnell-Dowling, J.P. Kelly // *Curr. Neuropharmacol.* – 2017. – Vol. 15. – P. 300–314.

97. McMurray, F. Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity-recent findings and empirical approaches / F. McMurray, D.A. Patten, M.-E. Harper // *Obesity.* – 2016. – Vol. 24 (11). – P. 2301–2310.

98. Miliara, X. Intra-mitochondrial signaling : interactions among mitoKATP, PKC ϵ , ROS, and MPT / X. Miliara, J.A. Garnett, T. Tatsuta, F. Abid Ali, H. Baldie, I. Pérez-Dorado, P. Simpson, E. Yague, T. Langer, S. Matthews // *EMBO Rep.* – 2015. – Vol. 16. – P. 824–835.

99. Minzer, S. The effect of alcohol on cardiovascular risk factors : is there new information? / S. Minzer, R.A. Losno, R. Casas // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12 (4). – P. 912.

100. Mirończuk-Chodakowska, I. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body / I. Mirończuk-Chodakowska, A.M. Witkowska, M.E. Zujko // *Advances in Medical Sciences.* – 2018. – Vol. 63 (1). – P. 68–78.

101. Mukhopadhyay, P. PARP inhibition protects against alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis / P. Mukhopadhyay, B. Horvath, M. Rajesh, Z.V. Varga et al. // *J. Hepatol.* – 2017. – Vol. 663. – P. 589–600.

102. Oguntibeju, O.O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation : examining the links / O.O. Oguntibeju // *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology.* – 2019. – Vol. 11 (3). – P. 45–63.

103. Opazo-Ríos, L. Lipotoxicity and Diabetic Nephropathy : Novel Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities / L. Opazo-Ríos, S. Mas, G. Marín-Royo, S. Mezzano, C. Gómez-Guerrero, J.A. Moreno, J. Egido // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (7). – P. 2632.

104. Osna, N.A. Alcoholic Liver Disease : Pathogenesis and Current Management / N.A. Osna, T.M.Jr. Donohue, K.K. Kharbanda // *Alcohol Res.* – 2017. – Vol. 38 (2). – P. 147–161.

105. Otamas, A. Diabetes and atherothrombosis : The circadian rhythm and role of melatonin in vascular protection / A. Otamas, P.J. Grant, R.A. Ajjan // *Diab. Vasc. Dis. Res.* – 2020. – Vol. 17 (3). – P. 1479164120920582.

106. Packer, M. Autophagy-dependent and -independent modulation of oxidative and organellar stress in the diabetic heart by glucose-lowering drugs / M. Packer // *Cardiovasc. Diabetol.* – 2020. – Vol. 19 (1). – P. 62.

107. Phaniendra, A. Free radicals : Properties, sources, targets, and their implication in various diseases / A. Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy // *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* – 2015. – 30 (1). – P. 11–26.

108. Poblete-Aro, C. Exercise and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus / C. Poblete-Aro, J. Russell-Guzmán, P. Parra, M. Soto-Muñoz, B. Villegas-González, C. Cofré-Bolados, T. Herrera-Valenzuela // *Rev. Med. Chil.* – 2018. – Vol. 146 (3). – P. 362–372.

109. Poblete-Aro, C. Oxidative stress in diabetes mellitus / C. Poblete-Aro, J. Russell-Guzmán, P. Parra, M. Soto-Muñoz, B. Villegas-González, C. Cofré-

Bolados, T. Herrera-Valenzuela // *Int. J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 9. – P. 92–109.

110. Pohanka, M. Toxicology and the biological role of methanol and ethanol : Current view / M. Pohanka // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* – 2016. – Vol. 160 (1). – P. 54–63.

111. Popov, K. Peculiarities of evaluation of the oral fluid antioxidant activity in patients with local or systemic diseases / K. Popov, N. Bykova, O. Shvets, T. Kochkonian, I. Bykov, N. Sulashvili // *Georgian Medical News.* – 2021. – № 2 (311). – P. 68–73.

112. Pourhanifeh, M.H. Melatonin : new insights on its therapeutic properties in diabetic complications / M.H. Pourhanifeh, A. Hosseinzadeh, E. Dehdashtian, K. Hemati, S. Mehrzadi // *Diabetol. Metab. Syndr.* – 2020. – Vol. 12. – P. 30.

113. Rehman, K. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus : how are they interlinked? / K. Rehman, M.S.H. Akash // *J. Cell. Biochem.* – 2017. – Vol. 118. – P. 3577–3585.

114. Ren, Z. Chronic plus binge ethanol exposure causes more severe pancreatic injury and inflammation / Z. Ren, F. Yang, X. Wang, Y. Wang, M. Xu, J.A. Frank, Z.J. Ke, Z. Zhang, X. Shi, J. Luo // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 308. – P. 11–19.

115. Roberts, L.D. Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes : Progress from the metabolome / L.D. Roberts, A. Koulman, J.L. Griffin // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 65–75.

116. Schmidt, F.M. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity / F.M. Schmidt, J. Weschenfelder, C. Sander et al. // *PloS one.* – 2015. – Vol. 10 (3). – P. e0121971.

117. Shearn, C.T. Deletion of GSTA4-4 results in increased mitochondrial post-translational modification of proteins by reactive aldehydes following chronic

ethanol consumption in mice / C.T. Shearn, K.S. Fritz, A.H. Shearn et al. // *Redox Biology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 68–77.

118. Sotler, R. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health / R. Sotler, B. Poljšak, R. Dahmane, T. Jukić, D. Pavan Jukić, C. Rotim, P. Trebše, A. Starc // *Acta Clin. Croat.* – 2019. – Vol. 58 (4). – P. 726–736.

119. Suraweera, D.B. Alcoholic hepatitis : The pivotal role of Kupffer cells / D.B. Suraweera, A.N. Weeratunga, R.W. Hu et al. // *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. – 2015. – Vol. 6 (4). – P. 90–98.

120. Thakkar, M.M. Alcohol disrupts sleep homeostasis / M.M. Thakkar, R. Sharma, P. Sahota // *Alcohol*. – 2015. – Vol. 49 (4). – P. 299–310.

121. Tousoulis, D. Diabetes mellitus-associated vascular impairment : novel circulating biomarkers and therapeutic approaches / D. Tousoulis, N. Papageorgiou, E. Androulakis, G. Siasos, G. Latsios, K. Tentolouris, C. Stefanadis // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 667–676.

122. Van de Wiel, A. Diabetes mellitus and alcohol / A. van de Wiel // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2004. – Vol. 20 (4). – P. 263–267.

123. Varga, Z.V. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy / Z.V. Varga, Z. Giricz, L. Liaudet, G. Haskó, P. Ferdinandy, P. Pacher // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – Vol. 1852. – P. 232–242.

124. Wang, C.H. Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca²⁺ homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes / C.H. Wang, Y.H. Wei // *J. Biomed. Sci.* – 2017. – Vol. 24 (1). – P. 70.

125. Wang, S. A mechanistic review of cell death in alcohol-induced liver injury / S. Wang, P. Pacher, R.C. De Lisle, H. Huang, W.X. Ding // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2016. – Vol. 40. – P. 1215–1223.

126. Wilkin, R.J. Murine models of acute alcoholic hepatitis and their relevance to human disease / R.J. Wilkin, P.F. Lalor, R. Parker, P.N. Newsome // *Am. J. Pathol.* – 2016. – Vol. 186. – P. 748–760.

127. Younossi, Z. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality / Z. Younossi, L. Henry // *Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 150. – P. 1778–1785.

128. Younossi, Z.M. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes : A systematic review and meta-analysis / Z.M. Younossi, P. Golabi, L. de Avila, J.M. Paik, M. Srishord, N. Fukui, Y. Qiu, L. Burns, A. Afendy, F. Nader // *J. Hepatol.* – 2019. – Vol. 71 (4). – P. 793–801.

129. Zaccardi, F. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus : a 90-year perspective / F. Zaccardi, D.R. Webb, T. Yates, M.J. Davies // *Postgrad. Med. J.* – 2016. – Vol. 92 (1084). – P. 63–69.

130. Zheng, Y. Weight-loss diets and 2-y changes in circulating amino acids in 2 randomized intervention trials / Y. Zheng, U. Ceglarek, T. Huang, L. Li, J. Rood, D.H. Ryan, G.A. Bray, F.M. Sacks, D. Schwarzfuchs, J. Thiery et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2016. – Vol. 103. – P. 505–511.

131. Zuwala-Jagiello, J. Influence of diabetes on circulating apoptotic microparticles in patients with chronic hepatitis C / J. Zuwala-Jagiello, M. Pazgan-Simon, E. Murawska-Cialowicz, K. Simon // *In Vivo*. – 2017. – Vol. 31 (5). – P. 1027–1034.

ПРИЛОЖЕНИЕ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4 тел. (861) 268-36-84 факс (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК ТОФК 010349101

№ _____ от " 02 " 09 2022г. на № _____ от " _____ " _____ 2022г.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-исследовательской
работе ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России,

д.м.н., профессор

А.Н. Редько

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: способ экспериментального моделирования сахарного диабета на фоне хронической алкогольной интоксикации.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация "Особенности метаболических нарушений на фоне хронической алкогольной интоксикации и возможности их коррекции (экспериментальное исследование)".
3. Исполнитель: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Бербериди Христина Панаевна.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
5. Место внедрения: отдел клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории.
6. Дата использования предложения: с января 2022 года.
7. Эффективность внедрения:
Предложенный способ моделирования аллоксан-индуцированного диабета на фоне предварительно сформированной хронической алкогольной интоксикации у крыс позволяет в эксперименте создать патологический процесс, максимально приближенный к клиническим условиям развития заболеваний. Это позволяет в эксперименте апробировать новые подходы к лабораторной диагностике и медикаментозной терапии.

И.о. заведующего Центральной
научно-исследовательской лабораторией
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н.

А.А. Вережкин

Автор предложения

Х.П. Бербериди

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

ФГБОУ ВО КубГМУ

Минздрава России, д.м.н., профессор



Т.В. Гайворонская

2.09

20 22 г.

об использовании предложения в учебном процессе

1. Наименование предложения: раздел «Патобиохимия алкогольной интоксикации» дисциплины «Клиническая биохимия»
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Особенности метаболических нарушений на фоне хронической алкогольной интоксикации и возможности их коррекции (экспериментальное исследование)».
3. Исполнитель: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Бербериди Христина Панаетовна.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
5. Дата использования предложения: с января 2022 года.
6. Эффективность внедрения: материалы диссертационного исследования используются для чтения лекций и проведения семинарских занятий по темам «Патобиохимия алкогольной интоксикации» и «Лабораторная диагностика окислительного стресса и эндогенной интоксикации» со студентами 6-го курса лечебного и педиатрического факультетов по дисциплине «Клиническая биохимия».

Заведующий кафедрой
фундаментальной и клинической биохимии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

И.М. Быков

Автор предложения

Х.П. Бербериди