

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭТАНОЛА НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ, СТРУКТУРУ ГЕНОМНОЙ ДНК И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТКАНЕЙ У КРЫС-САМОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Барышева Е.С.¹, Судакова Э.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: baryshevae@mail.ru

Было проведено изучение влияния этанола на крыс-самок линии Wistar, которые были разделены на две группы: опытную и контрольную. Животные опытной группы в течение 45 дней имели доступ к 15%-ному этанолу. По окончании эксперимента оценивали показатели каталазной активности, состояние структуры ДНК и морфофункциональное состояние тканей: желудка, легкого, тонкой кишки, селезенки, поджелудочной железы, почки, сердца, головного мозга, печени и матки. Таким образом, было установлено, что при длительном воздействии тестируемой дозы этанола на организм исследуемых животных активность каталазы снижалась в 2-2,5 раза относительно контроля. По результатам электрофоретической подвижности образцов ДНК у алкоголизированных крыс наблюдалось образование шмеров и их миграция на дальние расстояния по сравнению с контролем, это свидетельствовало о деградации ДНК до уровня олигонуклеотидов. При исследовании морфофункционального состояния тканей было выявлено, что этанол приводит к отеку стромы, усиленному некробиозу клеток и ядер, повышает проницаемость сосудистых стенок, вызывает дескваминацию эпителия и распад эндометрия.

Ключевые слова: этанол, каталаза, ДНК, гистология.

STUDY ON THE INFLUENCE OF ETHANOL CATALASE ACTIVITY, THE STRUCTURE OF THE GENOMIC DNA AND MORPHOFUNCTIONAL CONDITION OF THE TISSUE IN FEMALE RATS IN AN EXPERIMENT

Barysheva E.S.¹, Sudakova E.A.¹

¹Orenburg State University, Orenburg, e-mail: baryshevae@mail.ru

Ethanol study was conducted on the influence of female rats Wistar, which were divided into two groups: control and experimental. The experimental animals for 45 days had access to a 15% ethanol. By the end of the experiment catalase activity indicators are evaluated, the state of the structure of DNA and tissue morphology and condition: stomach, lung, small intestine, spleen, pancreas, kidneys, heart, brain, liver and uterus. Thus, it has been SET-Leno that prolonged exposure to the test dose of ethanol on the organism tested animals catalase activity was reduced by 2-2.5 times relative to controls. According to the results of electrophoretic mobility of DNA-tion images from alcoholized rats, observed the formation of the downward smearing and E grace over long distances compared with the control, this is indicative of DNA degradation to the level of oligonucleotides. In the study of morpho-functional state of tissues was vvyaleno that ethanol leads to swelling of the stroma, enhanced necrobiosis cells and nuclei, increases the permeability of the vascular walls, causing deskvaminatsiyu epithelium and the disintegration of the endometrium.

Keywords: ethanol, catalase, DNA, histological.

Этанол является наиболее потребляемым психоактивным веществом в мире, по данным ВОЗ, с чрезмерным употреблением алкоголя связано более 200 заболеваний. Степень пагубного воздействия алкоголя зависит не только от количества выпитого, но и сильно варьирует в зависимости от возраста и пола пьющего [7].

Этанол – это мембранотропное соединение, способное растворяться в липидном бислое мембран, нарушать трансмембранный перенос веществ и функции межклеточных контактов. Этиловый спирт имеет низкую диссоциацию, хорошо растворяется в воде, жирах и липоидных растворителях. Эти свойства алкоголя обуславливают легкость его

прохождения через биологические мембраны, способность вступать в связь с природными соединениями, задерживая и изменяя направление биохимических процессов, истощая ферментные системы, что негативно сказывается на состоянии отдельных органов и систем. Этиловый спирт вызывает необратимые изменения ДНК, при этом имеющаяся в клетках двухуровневая система защиты не всегда помогает от подобных повреждений [5]. Накопление токсичного соединения ацетальдегида, являющегося продуктом расщепления этилового спирта в организме, может также вызывать необратимые повреждения ДНК.

Метаболизм экзогенного этанола до ацетальдегида осуществляется тремя путями: алкогольдегидрогеназой, микросомальной этанолюкисляющей системой и каталазой. Под влиянием каталазы происходит окисление не более 5% этанола в организме. Однако роль этого пути окисления возрастает при более высоких концентрациях этилового спирта в организме.

Цель и задачи исследования

Цель: изучение влияния алкогольной интоксикации на ферментативную активность каталазы и структуру геномной ДНК тканей экспериментальных животных.

Задачи:

- 1) оценить влияние алкогольной интоксикации на ферментативную активность каталазы у лабораторных животных;
- 2) методом горизонтального электрофореза установить повреждающее действие этанола на структуру ДНК в организме исследуемых животных;
- 3) выявить морфофункциональные изменения в исследуемых образцах экспериментальных животных.

Материалы и методы

Данное исследование выполнено на базе экспериментально-биологической клиники (вивария) Института степи УрОРАН, г. Оренбург. Эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с требованиями Женевской конвенции [8].

Исследование проводилось на 20 самках крыс линии Wistar с четырехмесячного возраста. Животные содержались на основном сбалансированном рационе при свободном доступе к пище и воде [3]. Животные были разделены на 2 группы: опытную и контрольную, по 10 особей в каждой. В течение 45 дней крысы опытной группы, находясь в обычных клетках, имели свободный доступ к алкоголю, помимо поилки с водой присутствовала дополнительная поилка с 15%-ным водным раствором этанола. Схема эксперимента представлена в таблице 1.

Схема проведения эксперимента

Объект исследования, крысы линии Wistar	Группа	Периоды продолжительности опыта (сутки)	
		уравнительный	учетный
		14	45
n=10	Опытная	ОР	ОР + 15%-ный этанол, 10 мг/сут.
n=10	Контрольная	ОР	ОР

Примечание: ОР – основной сбалансированный рацион.

По истечении срока учетного периода производился убой экспериментальных животных путем декапитации нембуталовым наркозом.

Для исследования активности каталазы, структуры ДНК и морфофункционального состояния тканей у животных были изъяты органы каждой из систем организма: головной мозг, легкое, сердце, селезенка, желудок, поджелудочная железа, кишечник, почка, печень, матка.

Для проведения анализа количественного определения активности каталазы использовался титриметрический метод, основанный на титровании избытка перекиси водорода, нерасщепленного каталазой, перманганатом калия в кислой среде [2].

Исследование ДНК производилось после её выделения из исследуемого образца, с помощью комплекта реагентов – ПРОБА ЦТАБ фирмы ООО «ДНК – технология» (г. Москва) по предложенной производителем технологии (МУК 4.2.1913–04). Определение состояния структуры ДНК проводилось методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Для этого были использованы, электрофоретическая камера «SE–2» производства ООО «НПФ Биоклон» (Россия, Москва) и источник питания «Эльф–8» производства ООО «НПО ДНК – Технология» (Россия, Москва). Окраска ДНК проводилась добавлением в гель и электрофорезный буфер бромистого этидия. Результаты электрофореза визуализировались трансиллюминатором, изготовленным фирмой Vilber Lourmat (Франция), при длине волны 254 нм. Фотографии электрофореграмм обрабатывались программой ImageJ.

Изучение морфофункционального состояния тканей лабораторных животных проводилось с применением методов световой микроскопии. Для этого проводили стандартную гистологическую пробоподготовку, после чего изготавливали парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи

приложения Excel из программного пакета OfficeXP, включая определение средней арифметической величины (M), стандартной средней ошибки (m), оценку достоверности различий по Стьюденту [4; 6].

Результаты исследования

Экспериментальная часть была проведена в три этапа. Первый этап включал в себя исследования по изучению каталазной активности в тканях органов исследуемых животных.

При длительном употреблении раствора этанола у исследуемых животных наблюдается достоверное снижение уровня каталазной активности во всех тканях органов: головной мозг - в 2,5 раза ($p \leq 0,01$); желудок – в 2,2 раза ($p \leq 0,01$); легкое - в 2,4 раза ($p \leq 0,01$); тонкая кишка и селезенка - в 1,8 раза ($p \leq 0,05$); сердце - в 1,8 раза ($p \leq 0,01$); поджелудочная железа, почка, печень и матка - в 2,1 раза ($p \leq 0,01$). По результатам данного исследования было установлено, что у животных в условиях алкогольной интоксикации активность каталазы является недостаточной для окисления этанола и усиленного перекисного окисления липидов (ПОЛ). Показатели каталазной активности исследуемых групп отображены в таблице 2.

Таблица 2

Сравнение показателей каталазной активности в тканях крыс ($M \pm m$), ед/л

Наименование образца	Каталазная активность (ед/л)	
	Опытная группа	Контрольная группа
Желудок	6,00±0,48**	13,51±0,58
Легкое	5,51±0,53**	13,55±0,35
Тонкая кишка	10,42±1,82*	14,48±0,83
Селезенка	9,77±1,59*	13,26±0,86
Поджелудочная железа	6,63±0,68**	14,11±0,84
Почка	6,65±0,46**	13,84±0,61
Сердце	6,73±0,57**	12,77±0,58
Головной мозг	5,52±0,40**	14,33±0,40
Печень	7,09±0,47**	15,00±0,47
Матка	6,63±0,37**	13,87±0,37

Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – достоверная разница между группами, относительно контроля.

Второй этап исследования был направлен на изучение структуры ДНК тканей экспериментальных животных. Исследования электрофоретической подвижности препаратов ДНК показали, что образцы ДНК опытной группы животных образуют шмеры, которые мигрируют дальше контрольного образца и более вытянуты. Это свидетельствует о повреждении структуры ДНК, ее деградации до уровня олигонуклеотидов. Данные о пройденном расстоянии ДНК представлены в таблице 3.

Сравнение пройденного расстояния ДНК в опытной и контрольной группах
экспериментальных животных

№ образца	Название образца ткани	Расстояние, пройденное ДНК (по программе ImageJ в пикселях)	
		Опытная группа	Контрольная группа
1	Головной мозг	1548,05	726
2	Селезенка	1560,01	744,02
3	Тонкая кишка	1380,47	756,02
4	Матка	1602	720
5	Сердце	1152,02	750,02
6	Маркер ДНК	1602,04	582
7	Легкое	1572,1	756,1
8	Желудок	1614,01	360,05
9	Почка	1572	270,07
10	Печень	1572,01	702
11	Поджелудочная железа	1692,04	1180,4

Данные электрофореграммы контрольной группы (рис. 1) указывают на отсутствие шмеров в исследуемых образцах, так как ДНК находилась в нативном состоянии и не подвергалась действию выбранного химического вещества. ДНК сконцентрирована в определённых областях и не растянута по всей протяжённости трека, то есть ДНК находится в образце в виде полимерных цепочек.

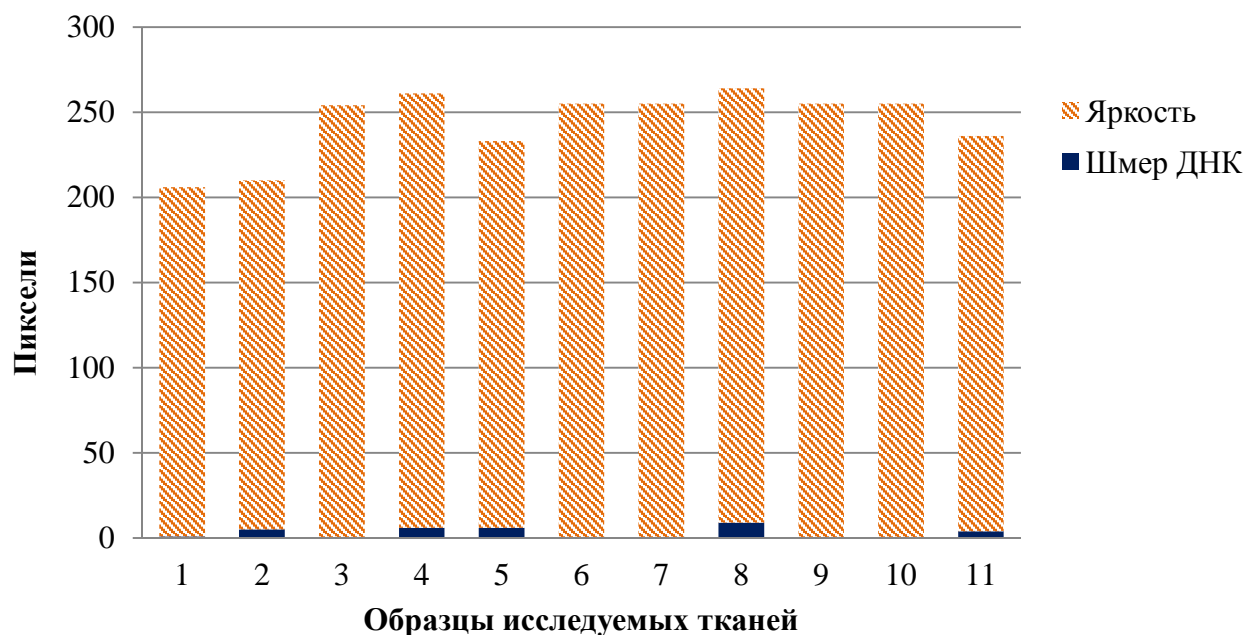


Рис. 1. Результаты электрофореграммы ДНК исследуемой контрольной группы. Графики построены на основании выводов программы ImageJ

Обозначения: 1 – головной мозг; 2 – селезенка; 3 – тонкая кишка; 4 – матка; 5 – сердце; 6 – маркер ДНК; 7 – легкое; 8 – желудок; 9 – почка; 10 – печень; 11 – поджелудочная железа

Результаты электрофореграммы опытной группы (рис. 2) указывают на наличие шмеров во всех исследуемых образцах, кроме маркера ДНК. Это говорит о том, что ДНК растянута по всей протяжённости трека, то есть ДНК в образце находится в разрушенном состоянии до олигонуклеотидов. Шмеры образцов тканей опытной группы по длине пройденного пути и по массе молекул ДНК примерно соответствуют четко оформленным шмерам образцов тканей контрольной группы, имея недостоверные отличия. Это указывает на то, что в образцах контрольной и опытной групп было выделено приблизительно одинаковое количество ДНК.

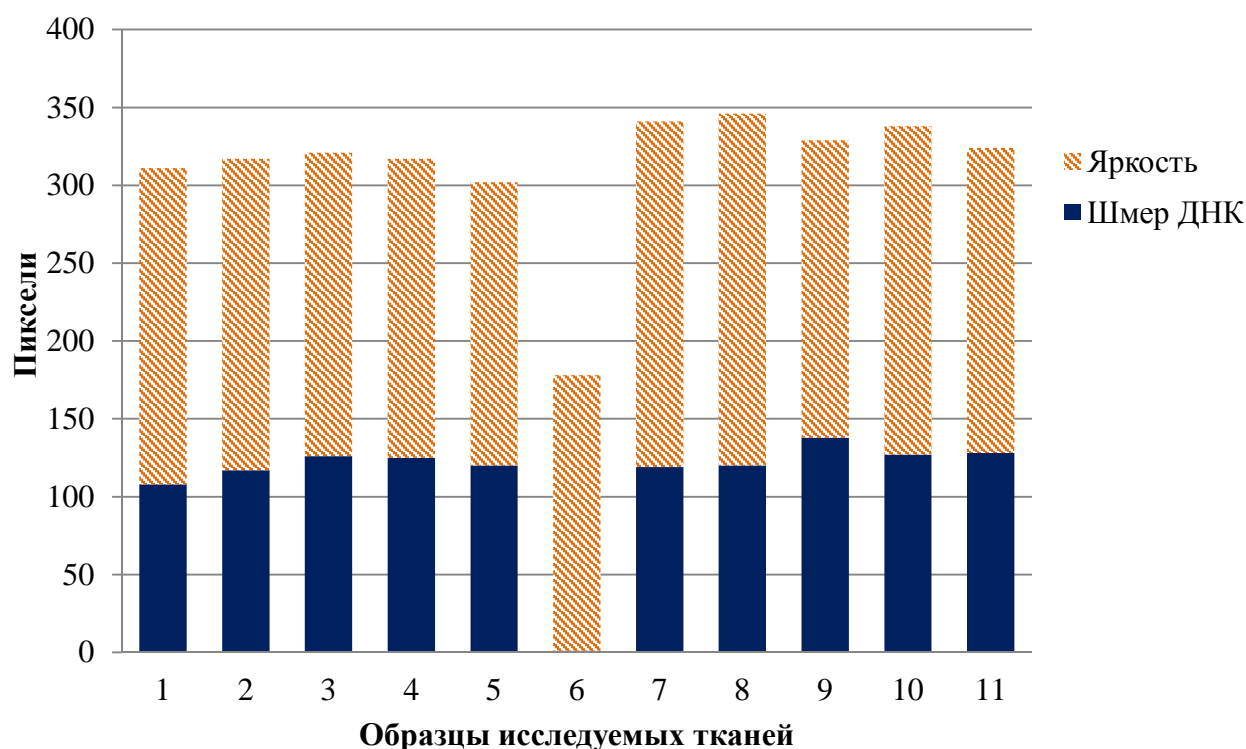


Рис. 2. Результаты электрофореграммы ДНК исследуемой опытной группы. Графики построены на основании выводов программы ImageJ

Обозначения: 1 – головной мозг; 2 – селезенка; 3 – тонкая кишка; 4 – матка; 5 - сердце; 6 – маркер ДНК; 7 –легкое; 8 - желудок; 9 - почка; 10 - печень; 11 - поджелудочная железа

Третий этап исследования заключался в оценке морфофункционального состояния исследуемых тканей животных. При микроскопическом исследовании гистологических препаратов в головном мозге крыс под влиянием 15%-ного этанола наблюдался выраженный отек мягкой мозговой оболочки, полнокровие сосудов, интенсивный отек межклеточного вещества мозга с расширением пространства вокруг клеток и сосудов, увеличение нейронов в объеме.

На фоне воздействия этанола в желудке крыс наблюдается резкое набухание клеток

слизистого слоя, утрата ядер, в подслизистом и мышечном слое выраженный отек стромы. В поджелудочной железе произошло набухание ядер панкреоцитов, резкий отек стромы с рассеянным кровоизлиянием. В тонкой кишке местами были обнаружены отек и лейкоциты в слизистом и подслизистом слое, а также регистрировались выраженное набухание ворсин, утрата ядер и распад клеток.

При морфологическом исследовании микропрепарата сердца было обнаружено, что в условиях алкогольной интоксикации происходит набухание саркоплазмы и участки фрагментации миоцитов, неравномерное кровенаполнение сосудов миокарда.

При исследовании гистологического препарата легкого было зарегистрировано скопление серозно-лейкоцитарного экссудата и очаговые кровоизлияния в просветах альвеол, а также наблюдалось выраженное набухание альвеолярного и бронхиального эпителия, образование участков десквамации эпителия. Отмечается нечеткая структура ядер.

При длительном употреблении этанола в печени отмечается выраженное набухание цитоплазмы и ядер печеночных клеток. В органе преобладают процессы некробиоза клеток и ядер. Наблюдаются лимфоидные скопления в паренхиме печени.

В почках регистрируется неравномерное кровенаполнение капиллярных петель клубочков. Отмечается резкое набухание и вакуолизация эпителия почечных канальцев. В просветах канальцев было зарегистрировано высокое содержание белковой массы, единичные лейкоциты и соли кальция. В мозговой части почек наблюдается диффузная лимфоидная и лейкоцитарная инфильтрация.

При гистологическом исследовании селезенки крыс под влиянием этилового спирта регистрировалось полнокровие пульпы. Фолликулы были уменьшены в размере.

В матке экспериментальной крысы на фоне воздействия этанола наблюдается дистрофическое изменение эндометрия, утрата контуров клеток и ядер. В миометрии отмечается полнокровие сосудов.

Выводы:

1. В результате проведенного исследования было установлено, что у исследуемых животных в условиях алкогольной интоксикации наблюдается достоверное снижение уровня каталазной активности во всех тканях органов: головной мозг - в 2,5 раза ($p \leq 0,01$); желудок – в 2,2 раза ($p \leq 0,01$); легкое - в 2,4 раза ($p \leq 0,01$); тонкая кишка и селезенка - в 1,8 раза ($p \leq 0,05$); сердце - в 1,8 раза ($p \leq 0,01$); поджелудочная железа, почка, печень и матка- в 2,1 раза ($p \leq 0,01$).
2. Выявлено, что этиловый спирт способен вызывать повреждение структуры ДНК и ее деградацию до уровня олигонуклеотидов, о чем свидетельствует наличие шмеров и миграция исследуемых образцов ДНК на дальние расстояния от линии старта.

3. Воздействие на организм 15%-ного этанола приводит к отеку стромы, усиленному некробиозу клеток и ядер, проницаемости сосудистых стенок, десквамации эпителия и распаду эндометрия.

Список литературы

1. Бонитенко Ю.Ю. Острые отравления алкоголем и его суррогатами. - СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2005. – 224 с.
2. Воскресенская О.Л., Алябышева Е.А., Половников М.Г. Большой практикум по биоэкологии : учеб. пособие. – Йошкар-Ола : Марийск. гос. ун-т, 2006. – 107 с.
3. ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. – Введ. 1994-01-01. – М. : Издательство стандартов, 1992. – 8 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия : учебное пособие для биол. спец. вузов. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : Высшая школа, 1990. - 352 с.
5. Алкоголь необратимо повреждает ДНК // Наука и разработки : электронный путеводитель [М.], 12.07.2011. - URL: http://test.v1.rnd.cnews.ru/news/line/alkogol_neobratimo_povrezhdaet_dnk (дата обращения: 10.04.2016).
6. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. – М. : Изд-во РАМН, 2000. – 52 с.
7. Ряховский А.Е., Фаткуллин К.В., Еникеев Д.А., Байков Д.Э., Рамазанов В.О. Динамика концентрации этанола в крови у крыс различных возрастных групп // Инновации в науке. – 2015. - № 4. - С. 40-41.
8. International guiding principles for biomedical research involving animals. - Accepted 2012-12-01. - CIOMS, ICLAS, 2012. - 4 p.