

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АЗОТИСТОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ПОСЛЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Потапов П.П.¹, Телушкин П.К.¹, Жаркова Н.В.¹, Стельмах А.Ю.¹, Медведева Н.Б.¹

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет Минздрава России», Ярославль, e-mail: medvedeva.natalija@rambler.ru

В экспериментах на крысах установлено, что у исходно здоровых животных через сутки после внутрибрюшинного введения 25% раствора этанола (суммарная доза этанола 4 г/кг массы тела) повышена концентрация мочевины в сыворотке крови и активность глутаматдегидрогеназы в печени, снижено содержание свободных жирных кислот в крови. Активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1), аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), аспартатаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), тирозинаминотрансферазы (КФ. 2.6.1.5), АМФ-дезаминазы (КФ 3.5.4.6) и глутаминазы (КФ 3.5.1.2) в печени не изменяется, как и активность ферментов в миокарде. У крыс с аллоксановым сахарным диабетом (30 суток) через сутки после введения этанола в сыворотке крови увеличена концентрация глюкозы и мочевины, а содержание аминокислот, мочевой кислоты, триглицеридов, свободных жирных кислот и лактата соответствует норме. В печени и миокарде повышается концентрация гликогена. В печени повышена активность аспартатаминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы. Активность АМФ-дезаминазы в печени снижается. В миокарде уменьшается активность аминотрансфераз. Таким образом, через сутки после развития острой алкогольной интоксикации у животных с аллоксановым диабетом не выявлено специфических нарушений, свидетельствующих о существенном неблагоприятном потенцирующем эффекте двух воздействий на энергетический и азотистый обмен, однако полной стабилизации азотистого обмена не происходит.

Ключевые слова: острая алкогольная интоксикация, аллоксановый диабет, печень, миокард, кровь, обмен.

RECOVERY OF PARAMETERS OF NITROGEN AND ENERGY METABOLISM AFTER ALCOHOL INTOXICATION AT RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES

Potapov P.P.¹, Telushkin P.K.¹, Zharkova N.V.¹, Stelmach A.Yu.¹, Medvedeva N.B.¹

¹Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, e-mail: medvedeva.natalija@rambler.ru

Studies in rats demonstrated that a day after intraperitoneal administration of 25% ethanol (total dose of ethanol was 4 g/kg body weight) to initially healthy animals, there were increased serum urea concentration, elevated glutamate dehydrogenase activity in the liver, decreased blood level of free fatty acids. The activity of succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1), alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2), aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1), tyrosine aminotransferase (EC 2.6.1.5), AMP deaminase (EC 3.5.4.6) and glutaminase (EC 3.5.1.2) were unchanged, as well as the activity of enzymes in the myocardium. In rats with alloxan diabetes (30 days), in a day after ethanol administration, serum concentrations of glucose and urea increased, whereas serum concentrations of amino acids, uric acid, triacylglycerols, free fatty acids and lactate were normal. Glycogen concentration in the liver and myocardium was elevated. The activity of aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase and succinate dehydrogenase in the liver increased. The activity of AMP deaminase in the liver reduced. Aminotransferase activity in heart decreased. Therefore, in a day after the development of acute alcohol intoxication in animals with alloxan diabetes, there were no specific disturbances that would indicate a significant adverse potentiating effect of two actions on energy and nitrogen metabolism. Nonetheless, there was no complete stabilisation of the nitrogen metabolism.

Keywords: acute alcoholic intoxication, alloxan diabetes, liver, heart, blood, metabolism.

При сахарном диабете в значительной степени нарушается обеспечение клеток основными субстратами пластического и энергетического обмена и активность внутриклеточных ферментных систем гепатоцитов. В связи с этим уменьшаются функциональные возможности печени по поддержанию адекватного уровня метаболитов в крови, что сказывается на пластическом и энергетическом обмене других тканей, в том числе

миокарда [1; 2]. Прием алкоголя вызывает выраженный метаболический стресс [3]. Поэтому алкогольная интоксикация, приводящая к интенсификации катаболических процессов, может усиливать нарушения обмена, наблюдаемые при сахарном диабете [4-6]. В раннем периоде алкогольной интоксикации, вызываемой у животных с экспериментальным аллоксановым диабетом, были обнаружены признаки активизации процессов катаболизма азотсодержащих соединений [7].

Целью исследования является изучение возможности восстановления параметров азотистого и энергетического обмена в период реституции после острой алкогольной интоксикации (ОАИ) у животных с экспериментальным сахарным диабетом.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 42 белых крысах-самцах массой 220-250 г. Экспериментальный сахарный диабет создавали путем двукратного внутрибрюшинного введения 5% раствора аллоксана в дозе 135 мг/кг массы тела после 12-14-часового голодания. Вторая инъекция производилась через 12 суток после первой. Развитие сахарного диабета контролировали, определяя концентрацию глюкозы в крови и наличие кетоновых тел в моче. Острую алкогольную интоксикацию вызывали внутрибрюшинной инъекцией 25% этилового спирта в дозе 4 г/кг массы тела натощак, в таких условиях развивается выраженная алкогольная интоксикация [7].

Подопытные животные были разделены на 3 группы. 1-я группа - исходно здоровые крысы, у которых вызывали ОАИ, 2-я группа – животные, обследованные на 30-е сутки после первого введения аллоксана, 3-я группа – животные, у которых вызывали ОАИ на 30-е сутки аллоксанового диабета. Одновременно с подопытными животными были обследованы интактные крысы. Объединенная контрольная группа включала 18 крыс, в экспериментальных группах было по 7-9 животных.

Подопытных животных 1-й и 3-й группы забивали декапитацией через 24-26 ч после введения этанола. К этому времени концентрация этанола (определяли с помощью газового хроматографа «Кристалл 5000.2») в крови животных обеих групп возвратилась к нормальным значениям. В сыворотке крови с использованием стандартных биохимических методов определяли концентрацию глюкозы, лактата, мочевины, мочевой кислоты (МК), суммарное содержание свободных аминокислот (САК), триацилглицеролов (ТАГ) и свободных жирных кислот (СЖК). В гомогенатах печени определяли концентрацию гликогена и активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1), аланиновой аминотрансферазы (АлАТ, КФ 2.6.1.2), аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ, КФ 2.6.1.1), АМФ-дезаминазы (КФ 3.5.4.6) и глутаминазы (КФ 3.5.1.2), глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.3) [8], тирозиновой аминотрансферазы (ТАТ, КФ. 2.6.1.5) [9]. Те же показатели (за исключением глутаминазы и ТАТ) определяли в миокарде (левый желудочек).

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Через сутки после введения этанола исходно здоровым животным (1-я экспериментальная группа) большинство исследованных показателей приближалось к нормальным значениям. Наблюдалось лишь весьма значительное (почти в 4 раза по сравнению с контролем, $p < 0,01$) увеличение содержания мочевины в сыворотке крови, снижение концентрации СЖК и повышение (на 36% по сравнению с контролем, $p < 0,05$) активности ГДГ в ткани печени.

В проведенных нами ранее исследованиях было установлено [7], что у животных с аллоксановым диабетом через 6 часов после введения алкоголя (содержание этанола в крови повышено в 10-13 раз) наблюдается умеренно выраженная продукционная азотемия, повышается распад аминокислот и пуриновых нуклеотидов, нарушается утилизация амидов дикарбоновых аминокислот в печени.

Через 24-26 часов после введения алкоголя животным с аллоксановым диабетом (3-я экспериментальная группа) в сыворотке крови уровень мочевой кислоты и показатели липидного обмена были нормальными, а содержание мочевины в сыворотке крови оставалось значительно повышенным (таблица 1). Концентрация свободных аминокислот также была близка к нормальным значениям, т.е. повысилась (на 45%, $P < 0,01$) в сравнении с величинами, характерными для крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Такие изменения могут быть обусловлены повышением продукции аминокислот в результате распада белков. Колебания уровня молочной кислоты в сыворотке крови у животных 2-й и 3-й групп могут свидетельствовать об изменениях способности печени и миокарда утилизировать лактат при ОАИ.

В печени у крыс 3-й группы (таблица 2) сохранялась значительно повышенная, как и при 6-часовой алкогольной интоксикации [7], активность ГДГ. Изменения составили 30% по сравнению с контролем ($p < 0,05$), по сравнению с животными 2-й группы показатель повышался почти в 2 раза ($p < 0,05$). Была также увеличена по сравнению с контрольной группой активность АсАТ. Активность ТАТ, стимулируемой стероидными гормонами, повышалась на 29% ($p < 0,01$) в сравнении с животными 2-й группы и достигла уровня контроля.

Таблица 1

Изменения концентрации метаболитов в сыворотке крови крыс при аллоксановом диабете и в период реституции после ОАИ ($M \pm m$)

| Показатель | Контрольная | 1-я группа | 2-я группа | 3-я группа |
|------------|-------------|------------|------------|------------|
|------------|-------------|------------|------------|------------|

| | группа | | | |
|-------------------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| Глюкоза, ммоль/л | 4,8±0,5 | 5,6±0,7 P _к >0,05 | 12,5±0,5 P _к <0,01 | 10,8±0,7 P ₂₋₃ <0,05 P ₂₋₃ >0,05 |
| СЖК, мкмоль/л | 290±15 | 190±10 P _к <0,01 | 272±9 P _к >0,05 | 256±34 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |
| Лактат, ммоль/л | 1,44±0,03 | 1,54±0,09 P _к >0,05 | 1,20±0,05 P _к <0,01 | 1,47±0,04 P _к >0,05 P ₂₋₃ <0,05 |
| ТАГ, ммоль/л | 0,74±0,06 | 0,81±0,20 P _к >0,05 | 0,71±0,05 P _к >0,05 | 0,62±0,04 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |
| Мочевина, ммоль/л | 5,02±0,29 | 19,1±4,0 P _к <0,01 | 10,6±0,6 P _к <0,01 | 17,3±3,4 P _к <0,01 P ₂₋₃ >0,05 |
| САК, ммоль/л | 4,88±0,17 | 4,91±0,40 P _к >0,05 | 3,90±0,10 P _к <0,01 | 5,66±0,33 P _к >0,05 P ₂₋₃ <0,01 |
| МК, мкмоль/л | 115±3 | 107±15 P _к >0,05 | 123±2 P _к >0,05 | 127±2 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |

Примечания. Здесь и в табл. 2 и 3: 1) в объединенной контрольной группе было 18 животных, в экспериментальных группах представлены результаты, полученные при обследовании 7-8 животных; 2) P_к - характеристика достоверности различий между животными экспериментальных групп и контрольной группой. P₂₋₃ – характеристика достоверности различий между животными 2-й и 3-й групп.

Таблица 2

Изменения содержания гликогена и активности ферментов в ткани печени крыс при аллоксановом диабете и в период реституции после ОАИ (M±m)

| Показатель | Контрольная группа | 1-я группа | 2-я группа | 3-я группа |
|------------|--------------------|------------|------------|------------|
|------------|--------------------|------------|------------|------------|

| | | | | |
|---------------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Гликоген, мг*г ткани ⁻¹ | 4,28±0,31 | 4,78±0,32 P _к >0,05 | 4,65±0,63 P _к >0,05 | 7,59±0,62 P _к <0,01 P ₂₋₃ <0,01 |
| АлАТ | 29,4±2,5 | 26,1±2,8 P _к >0,05 | 38,0±4,1 P _к >0,05 | 34,5±1,7 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |
| АсАТ | 48,1±2,1 | 44,8±1,9 P _к >0,05 | 59,9±3,9 P _к <0,05 | 58,7±1,9 P _к <0,01 P ₂₋₃ >0,05 |
| ГДГ | 2,10±0,12 | 2,85±0,22 P _к <0,05 | 1,43±0,17 P _к <0,05 | 2,74±0,17 P _к <0,05 P ₂₋₃ <0,01 |
| Глутаминаза | 628±47 | 581±22 P _к >0,05 | 807±74 P _к >0,05 | 713±28 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |
| ТАТ | 162± 8 | 181±8 P _к >0,05 | 126±7 P _к <0,01 | 163±5 P _к >0,05 P ₂₋₃ <0,01 |
| АМФ-дезаминаза | 263±8 | 279±16 P _к >0,05 | 257±16 P _к >0,05 | 194±8 P _к <0,01 P ₂₋₃ <0,05 |
| СДГ | 3,17±0,22 | 3,06±0,24 | 4,07±0,47 | 4,35±0,09 P _к <0,01 P ₂₋₃ >0,05 |

Примечания. Активность аминотрансфераз, ГДГ и СДГ – в мкмоль*г ткани⁻¹*мин⁻¹, активность глутаминазы, АМФ-дезаминазы и ТАТ - в нмоль*г ткани⁻¹*мин⁻¹.

Такие изменения, а также заметное снижение активности АМФ-дезаминазы (на 26% по сравнению с контролем, $p<0,01$) свидетельствуют о том, что процессы азотистого обмена через сутки после введения алкоголя не стабилизировались. Сохранялись некоторые признаки увеличения катаболизма белков и аминокислот, из числа тех, которые обнаруживались в ранние сроки ОАИ [10]. Однако необходимо отметить, что только высокая активность ГДГ характерна именно для ОАИ, подобных изменений не наблюдалось в исходном состоянии (30-суточный экспериментальный сахарный диабет). У животных 3-й группы в сравнении с животными 2-й группы этот показатель был повышен почти в 2 раза ($p<0,01$). Это свидетельствует об интенсификации процессов дезаминирования аминокислот

в печени. В то же время активность глутаминазы не отличается от уровня контроля. Поэтому можно предполагать, что утилизация транспортных форм аммиака в печени через 24-26 часов после введения алкоголя нормализуется.

Таблица 3

Изменения содержания гликогена и активности ферментов в миокарде крыс при аллоксановом диабете и в период реституции после ОАИ (M±m)

| Показатель | Контрольная группа | 1-я группа | 2-я группа | 3-я группа |
|------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Гликоген, мг*г ткани ⁻¹ | 2,65±0,17 | 3,21±0,43 P _к >0,05 | 2,92±0,14 P _к >0,05 | 3,54±0,24 P _к <0,01 P ₂₋₃ <0,01 |
| АлАТ | 3,18±0,24 | 3,00±0,12 P _к >0,05 | 4,20±0,40 P _к >0,05 | 2,54±0,26 P _к >0,05 P ₂₋₃ <0,01 |
| АсАТ | 25,1±1,0 | 29,6±1,6 P _к >0,05 | 32,9±2,1 P _к <0,01 | 25,2±0,8 P _к >0,05 P ₂₋₃ <0,01 |
| ГДГ | 129±14 | 132±38 P _к >0,05 | 165±23 P _к >0,05 | 159±11 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |
| АМФ-дезаминаза | 625±24 | 688±25 P _к >0,05 | 657±55 P _к >0,05 | 661±35 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |
| СДГ | 5,49±0,39 | 6,75±0,28 P _к >0,05 | 5,25±0,32 P _к >0,05 | 3,98±0,23 P _к >0,05 P ₂₋₃ >0,05 |

Примечания. Активность аминотрансфераз и СДГ – в мкмоль*г ткани⁻¹*мин⁻¹, активность ГДГ и АМФ-дезаминазы - в нмоль*г ткани⁻¹*мин⁻¹.

У животных 3-й группы повышение в ткани печени активности СДГ, являющейся маркерным ферментом митохондрий, может свидетельствовать об увеличении относительного количества митохондрий в печени и являться отражением реакции окислительных систем печени на алкогольную интоксикацию, развивающуюся на фоне сахарного диабета [11].

Обращает на себя внимание заметное повышение концентрации гликогена в обеих тканях у животных 3-й группы. Эти изменения наблюдались только через 24-26 часов после

введения алкоголя животным с экспериментальным сахарным диабетом. Такие изменения могут рассматриваться как неблагоприятные. При ОАИ увеличивается продукция глюкокортикоидов [12; 13]. Результатом этого может быть увеличение (как и при сахарном диабете [1]) глюконеогенеза из аминокислот в печени и снижение использования углеводов миокардом, что и приводит к повышению концентрации гликогена в тканях в отдаленные сроки после ОАИ.

При исследовании миокарда не было выявлено каких-либо признаков повреждения исследованных ферментных систем азотистого обмена в результате алкогольной интоксикации у исходно здоровых животных (таблица 3). Активность ферментов, катализирующих конечные реакции дезаминирования (ГДГ и АМФ-дезаминаза), а также активность СДГ не изменялась во всех экспериментальных группах. У крыс 3-й группы ОАИ вызывала заметное снижение активности АлАТ (на 40%, $p < 0,01$) и АсАТ (на 23%, $p < 0,01$) в сравнении с животными 2-й группы. Но активность этих ферментов не выходила за пределы нормальных значений. В норме аминокислоты играют незначительную роль в энергообеспечении миокарда. Тем не менее механизм и значимость изменений процессов трансаминарования для субстратного обеспечения синтеза белка в миокарде нуждаются в дальнейшем изучении.

Заключение

Оценивая в целом полученные результаты, можно отметить, что в период реституции после однократной алкогольной интоксикации, вызываемой у исходно здоровых животных и у животных с экспериментальным сахарным диабетом, наблюдается сходная динамика изменений показателей азотистого обмена. Не было обнаружено специфических стойких нарушений, которые могли бы свидетельствовать о существенном потенцировании повреждающего эффекта двух воздействий на азотистый и энергетический обмен. Можно лишь предполагать, что ОАИ, вызываемая на фоне аллоксанового диабета, обуславливала несколько более выраженный метаболический ответ на изменения продукции глюкокортикоидов. Полной стабилизации азотистого обмена в течение суток после оказанного воздействия не происходит.

Список литературы

1. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика / Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. М.: Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011. 808 с.
2. Каттайл В.М., Арки Р.А. Патопфизиология эндокринной системы. М.: Издательство БИНОМ, 2019. 336 с.

3. Таганович А.Д., Олецкий Э.И., Котович И.Л. Патологическая биохимия / Под общ. ред. А.Д. Тагановича. М.: Издательство БИНОМ, 2015. 448 с.
4. Лелевич В.В., Леднева И.О., Лелевич С.В. Метаболические эффекты хронической алкогольной интоксикации // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2017. т. 15. № 3. С. 314.
5. Kim J.Y., Lee D. Y., Lee Y.J., Park K.J., Kim K.H., Kim J.W., Kim W. Chronic alcohol consumption potentiates the development of diabetes through pancreatic β -cell dysfunction. World Journal of Biological Chemistry. 2015. Vol. 6. Iss. 1. P. 1-15.
6. Tatsumi Y., Morimoto A., Asayama K., Sonoda N., Miyamatsu N., Ohno Y., Miyamoto Y., Izawa S., Ohkubo T. Association between alcohol consumption and incidence of impaired insulin secretion and insulin resistance in Japanese: The Saku study. Diabetes Research and Clinical Practice. 2018. Vol. 135. P. 11-17.
7. Жаркова Н.В., Потапов П.П., Стельмах А.Ю. Изменения показателей азотистого обмена при острой алкогольной интоксикации у крыс с аллоксановым диабетом // Биомедицинская химия. 2012. Т. 58. Вып. 2. С. 220-223.
8. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под ред. М.И. Прохоровой. Л.: Издательство Ленинградского университета, 1982. 272 с.
9. Левин Ф.Б. Простой спектрофотометрический метод определения активности тирозинаминотрансферазы // Вопросы медицинской химии. 1969. Т. 15. № 3. С. 315-317.
10. Жаркова Н.В., Потапов П.П., Стельмах А.Ю. Показатели азотистого обмена при острой алкогольной интоксикации у крыс с экспериментальным сахарным диабетом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 152. №7. С. 36-39.
11. Панченко Л. Ф., Давыдов Б. В., Терехина Н. Н., Баронец В. Ю., Наумова Т. А. Окислительный стресс в патогенезе алкогольной болезни печени // Вопросы наркологии. 2013. № 2. С. 82-91.
12. Blaine S.K., Milivojevic V., Fox H., Sinha R. Alcohol effects on stress pathways: impact on craving and relapse risk. The Canadian Journal of Psychiatry. 2016. Vol. 61. no. 3. P.145-153.
13. Steiner J.L., Crowell K.T., Lang C.H. Impact of alcohol on glycemic control and insulin action. Biomolecules. 2015. Vol. 5. Iss. 4. P. 2223-2246.