

**Грик Е. А.**

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

## **СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБАТА И ТОКОФЕРОЛА В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ НА ФОНЕ ЧРЕЗМЕРНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК**

**Резюме.** Употребление алкоголя и чрезмерные физические нагрузки (ЧФН) существенно влияют на нормальный метаболизм человека. Повреждение различных органов, в частности, почек, вызываемое ими, создает актуальность для раскрытия механизмов их воздействия. Согласно последним данным, изучаемые факторы провоцируют развитие состояния, подобного гипоксии, и вмешиваются в работу антиоксидантной системы. Поскольку витамины С и Е обладают антиоксидантными свойствами, нами была поставлена цель – определить содержание аскорбата и  $\alpha$ -токоферола в почках крыс при острой интоксикации этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок. Для исследования использовались 70 самцов белых крыс, разделенных на 6 групп (n=10–12): 1-я группа – интактные крысы; 2-я группа – контроль для ЧФН; 3-я группа – контроль для интоксикации; 4-я группа – ЧФН; 5-я группа – острая интоксикация этанолом; 6-я группа – ЧФН в сочетании с острой алкогольной интоксикацией. Результаты продемонстрировали, что комбинация двух исследуемых факторов вызвала более выраженное снижение содержания витаминов, чем изолированное воздействие ЧФН или острой алкогольной интоксикации: в 6-й группе содержание аскорбата было ниже на 29,5% по сравнению с 4-й группой и на 48,5% по сравнению с 5-й группой; содержание  $\alpha$ -токоферола было ниже на 47,3% по сравнению с 4-й группой и на 56,2% по сравнению с 5-й группой. Это свидетельствует о значительной роли витаминов С и Е в антиоксидантной защите и их участии в механизмах окислительного стресса.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система, аскорбат, токоферол, физические нагрузки, этанол, почки, крысы.

Одной из значительных проблем мирового здравоохранения является алкоголизм и вызванные им изменения в работе органов и систем. Известно, что острая или хроническая интоксикация этанолом ведет к нарушению энергетического баланса и кислородному голоданию клеток [1]. К подобным

изменениям приводят и чрезмерные физические нагрузки (ЧФН), которые запускают патофизиологические механизмы, связанные с гиперпродукцией свободных радикалов [6, 8]. Большую часть свободных радикалов составляют активные формы кислорода (АФК) [7].

Понимание связи гипоксических процессов при воздействии указанных факторов приобретает актуальность, поскольку употребление алкоголя для многих людей является инструментом социализации и средством для «снятия напряжения», в том числе для работников тяжелого физического труда, а также некоторых спортсменов и тяжелоатлетов. ЧФН активно расходуют энергетический резерв и вводят метаболизм в состояние стресса, связанного с деструктивной активностью АФК [6]. Принятие высоких доз этанола угнетает тканевое дыхание и синтез АТФ вплоть до торможения физиологической активности клеток, в том числе, головного мозга [1]. Ощущения при этом притупляются, наступает состояние, сходное наркотическому, и человек в напряжении чувствует относительное облегчение. Однако мы полагаем, что употребление алкоголя после ЧФН не только не снижает степень метаболических нарушений, но и способствует их усугублению.

Антиоксидантная система (АОС) организма предназначена для борьбы с АФК и продуктами свободнорадикального окисления. АОС условно делится на ферментативную и неферментативную. К ферментативной относится большое количество ферментов, среди которых можно выделить супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу и другие. К неферментативной относится глутатион, тиоредоксин и витаминные антиоксиданты (витамин С и Е) [7, 10].

Выяснение влияния острой интоксикации этанолом в сочетании с тяжелой физической нагрузкой на функционирование АОС позволит лучше понять механизмы нарушения функции органов при совместном воздействии данных факторов и откроет возможности для их терапии и профилактики. В данной работе мы акцентируем внимание на витаминных антиоксидантах, которым по сравнению с ферментами АОС уделяется относительно мало внимания в мировых источниках.

*Окислительный стресс.* АФК как участники патологических состояний имеют короткий жизненный период и огромный реактивный потенциал благодаря наличию неспаренного электрона [2]. В тканях организма АФК индуцируют процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембранных

структур, приводя к нарушению функции клеток и гибели по типу некроза или апоптоза [5, 7].

Защита мембран от АФК зависит от активности ферментов и уровня неферментативных антиоксидантов, составляющих АОС. При снижении активности ферментов и содержания низкомолекулярных антиоксидантов может развиваться окислительный стресс (ОС). ОС - состояние внутренней среды организма, при котором происходит дисбаланс в системе “прооксиданты-антиоксиданты” в сторону увеличения содержания и активности прооксидантов [7, 13]. Деструктивные свойства АФК могут проявиться при разнообразных стрессовых воздействиях, которые приводят к гипоксии [2, 7].

Согласно источникам, к кислородному голоданию тканей могут по отдельности приводить алкогольная интоксикация и ЧФН [1, 7, 8].

Ацетальдегид, являющийся продуктом метаболизма этанола, вносит значительный вклад в ОС путем инактивации ферментов дыхательной цепи, цикла Кребса, глутатионпероксидазы, блокирования каталазы, модификации гемоглобина, а также изменения состава мембран, что приводит к ПОЛ [1]. В целом, дефицит кислорода при данных состояниях приводит к доминированию анаэробного гликолиза, что ведет к накоплению лактата. Молочная кислота изменяет рН среды и вызывает ацидоз, который, как известно, нарушает метаболизм мононуклеотидов и вызывает образование АФК [1, 3, 4, 6, 7, 8]. Это приводит к интенсификации ПОЛ мембран и нарушению функционирования АОС [7, 8].

При алкогольной интоксикации происходит торможение физиологической активности клеток за счет снижения резервов энергии в виде АТФ [1], тогда как при ЧФН АТФ задействована в режиме усиленного потребления [3, 4]. Поэтому в условиях сочетанного воздействия указанных факторов активность ОС предполагается максимальной.

По данным исследований, частыми причинами развития и усугубления ОС является дефицит витаминных антиоксидантов [12, 13].

*Роль витаминов С и Е в антиоксидантной защите.* Витамин С (аскорбиновая кислота) является водорастворимым витамином, проявляет свои антиоксидантные свойства в цитоплазме и межклеточном пространстве. Аскорбиновая кислота обладает возможностью защищать мембранные структуры от ПОЛ, снижая концентрацию АФК, а также путем одноэлектронного восстановления радикалов гидроперекисей липидов. Кроме того, она способна защищать белки от алкилирования путем

образования электрофильных метаболитов, источником которых служат продукты ПОЛ [14]. Витамин Е (токоферолы, наиболее биологически активным из которых является  $\alpha$ -токоферол) - главный антиоксидант мембранных структур.  $\alpha$ -токоферол также реагирует с гидроперекисями липидов с образованием токофероксила радикала. Токоферолы способны захватывать кислородные радикалы, в особенности синглетный кислород (путем необратимого окисления токоферола) [10, 14].

Известно, что аскорбиновая кислота и альфа-токоферол, играющие роль в антиоксидантной защите, способны эффективно реагировать только в синергизме. Витамин Е снижает интенсивность свободнорадикального ПОЛ, но запасы антиоксиданта быстро исчерпываются из-за его окисления в отсутствие аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота участвует в восстановлении токофероксила до активной формы витамина Е, окисляясь до аскорбила радикала, который может восстанавливаться с помощью системы глутатиона [10, 14]. Исследования Wawrzyniak A. et al., 2013 указывают на то, что экзогенное употребление витаминов уменьшает показатели ОС [16].

Таким образом, вполне вероятно, что окислительный каскад с участием АФК не только нарушает функцию ферментативной части АОС [7], но также истощает пул витаминов, что приводит к усугублению ОС. Для того, чтобы подтвердить вклад данного механизма и убедиться, что сочетание ЧФН и алкогольной интоксикации ведёт к более тяжёлым нарушениям метаболизма, мы исследовали содержание аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола в почках крыс под действием изучаемых факторов ОС.

Цель исследования: определить уровень аскорбата и  $\alpha$ -токоферола в почках крыс при острой интоксикации этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок.

**Материал и методы.** Эксперимент проводился на 70 белых крысах-самцах массой 180–200 г в течение 5 недель. При проведении эксперимента соблюдались требования директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Методом случайной выборки крыс делили на 6 групп: 1-ю группу составили интактные крысы (n=12); 2-ю группу – контрольные животные, которые плавали без груза по усредненному времени (3-5 минут) (n=12); 3-ю – контрольные крысы, получавшие физиологический раствор вместо этанола (n=12); 4-ю – крысы, подвергнутые ЧФН по методу В. В. Корняковой с соавт. [4], плававшие с грузом 10% от массы тела до полного утомления, притом на протяжении первых трех недель животные

плавали через день, а последние две – ежедневно, температура воздуха в виварии составляла 19–21, воды при плавании – 28–30°C (n=12); 5-ю – крысы, получавшие этиловый спирт (n=10); 6-ю – крысы, подвергнутые ЧФН в сочетании с острой алкогольной интоксикацией (n=12). Введение этанола крысам 5-й и 6-й групп осуществлялось перорально при помощи металлического катетера в дозе 4 г/кг массы тела. При этом необходимо отметить, что крысы 6-й группы получали этанол после развития у них ЧФН. По истечении двух часов после введения спирта, животных выводили из эксперимента.

После завершения эксперимента проводилось извлечение почек, которые позднее подвергались гомогенизации на 0,15 M растворе хлорида калия (КСl) в стеклянном гомогенизаторе Поттера при температуре 0–2°C. В супернатанте гомогенатов определяли содержание аскорбата и  $\alpha$ -токоферола.

Аскорбиновую кислоту определяли по методике Omaye et al., 1971, описанной в книге [15]. Принцип метода основан на количественной оценке интенсивности восстановления железа аскорбиновой кислотой с образованием дипиридилного комплекса. Содержание  $\alpha$ -токоферола определяли по методу Desai (1984) [11]. Принцип метода основан на восстановлении ионов железа в присутствии токоферола с образованием комплексного соединения с батофенантролином.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 фирмы «StatSoft Inc.» (США). Экспериментальные данные обрабатывали при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как *Me* – медиана, *Q<sub>1</sub>* – нижний квартиль, *Q<sub>3</sub>* – верхний квартиль.

**Результаты.** В ходе эксперимента мы установили, что у крыс 4-й группы наблюдается снижение уровня аскорбата (37,4%) и  $\alpha$ -токоферола (40,7%) в сравнении с контролем (*группа № 2*). Острая алкогольная интоксикация приводит к изменению уровня  $\alpha$ -токоферола (снижение на 24,5% в сравнении с контролем). Изменение уровня аскорбиновой кислоты нами замечено не было. Однако поскольку аскорбиновая кислота синтезируется в организме крыс из глюкозы, в отличие от человека, в отдаленные сроки после длительной интоксикации (несколько часов) возможны изменения.

Сочетанное влияние ЧФН и интоксикации алкоголем приводит к более выраженному снижению аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола. Содержание аскорбата у крыс 6-й группы на 29,5% ниже в сравнении с 4-й группой, а в

сравнении с 5-й группой на 48,5%. Содержание  $\alpha$ -токоферола у крыс 6-й группы на 47,3% ниже в сравнении с 4-й группой, а в сравнении с 5-й группой на 56,2%.

**Таблица 1. Изменение содержания аскорбата и  $\alpha$ -токоферола в почках крыс, подвергнутых острой интоксикации этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок,  $Me (Q_1-Q_3)$**

Группа	Показатель	
	Аскорбат, мкг/мг белка	$\alpha$ -Токоферол, мкг/мг белка
<b>1-я</b> (И) <i>n</i> =12	<b>8,705</b> (5,77–10,4)	<b>2,17</b> (1,41–2,58)
<b>2-я</b> (КЧ) <i>n</i> =12	<b>8,44</b> (5,62–10,5)	<b>2,16</b> (1,39–2,99)
<b>3-я</b> (КА) <i>n</i> =12	<b>8,23</b> (5,93–10,95)	<b>2,045</b> (1,69–2,68)
<b>4-я</b> (ЧФН) <i>n</i> =12	<b>5,28</b> (3,66–6,18) <i>p</i> [1]=0,0074 <i>p</i> [2]=0,0093	<b>1,28</b> (0,765–1,56) <i>p</i> [1]=0,0072 <i>p</i> [2]=0,0181
<b>5-я</b> (ОАИ) <i>n</i> =10	<b>7,22</b> (5,38–9,55) <i>p</i> [1]=0,5983 <i>p</i> [3]=0,3732	<b>1,54</b> (0,75–1,92) <i>p</i> [1]=0,0473 <i>p</i> [3]=0,0521
<b>6-я</b> (ЧФН+ОАИ) <i>n</i> =12	<b>3,72</b> (1,56–5,15) <i>p</i> [1]=0,0001 <i>p</i> [4]=0,0351 <i>p</i> [5]=0,0012	<b>0,675</b> (0,51–1,03) <i>p</i> [1]=0,0001 <i>p</i> [4]=0,0283 <i>p</i> [5]=0,0194

*Примечание:* *p*[1] – уровень статистической значимости различий в сравнении с группой 1, *p*[2] – в сравнении с группой 2 и т.п., И – интактные, КЧ – контроль нагрузки, КА – контроль интоксикации, ЧФН – чрезмерные физические нагрузки, ОАИ – острая алкогольная интоксикация.

**Обсуждение результатов.** Установленное нами снижение уровня витаминных антиоксидантов может быть связано с усилением прооксидантных систем в условиях гипоксии, индуцированной ЧФН и алкогольной интоксикацией, в частности активацией ксантиноксидазной реакции [8]. Аскорбат и  $\alpha$ -токоферол интенсивно вовлекаются в реакции

инактивации АФК и токсичных продуктов перекисного окисления липидов и белков. Кроме того, аскорбат может снижаться из-за использования его в реакциях, связанных с регенерацией токоферола [10, 13]. Для подтверждения данной гипотезы необходимо исследовать содержание маркеров ПОЛ при ЧФН в сочетании с алкогольной интоксикацией, таких как малоновый диальдегид и пр.

Другой причиной снижения уровня аскорбиновой кислоты может являться ее активное использование в реакциях восстановления глутатиона, дефицит которого в условиях ОС был отмечен нами ранее [8]. Данный процесс катализируется глутатион-дигидроаскорбатредуктазой.

Витамин Е обладает способностью связывать синглетный кислород, образованный в результате реакции дисмутации супероксидного анион радикала, катализируемой ферментом АОС - супероксиддисмутазой. Чтобы проверить вклад данного механизма необходимо параллельно с измерением  $\alpha$ -токоферола на фоне стрессорных факторов изучить активность данного фермента.

Поскольку в литературе имеются сведения о том, что изначальный дефицит витаминов С и Е приводит к формированию окислительного стресса при различных факторах [12, 13], можно заключить, что животные в состоянии дефицита данных веществ, имели бы меньшую толерантность к физическим нагрузкам и более выраженное снижение активности АОС. Чтобы проверить эту гипотезу необходимо исследовать активность ферментативных компонентов АОС и маркеры ПОЛ в условиях ЧФН и алкогольной интоксикации у крыс с дефицитом витаминов С и Е.

Как и предполагалось, сочетанное воздействие изучаемых факторов на экспериментальных животных (6-я группа) привело к более выраженным изменениям в АОС, чем влияние одних ЧФН или острой интоксикации этанолом. В данном случае можно сделать вывод о том, что употребление алкоголя ведёт к более интенсивному ОС, если оно происходит на фоне ЧФН.

Наблюдаемые изменения можно в том числе объяснить истощением пула АТФ на фоне недостатка его синтеза вследствие угнетения процессов аэробного гликолиза ацетальдегидом [1], а также повышенным потреблением энергии в условиях ЧФН [8]. Стоит отметить, что механизмы ОС и активации АОС, соответственно, могут различаться при различных стрессорных факторах. Поэтому в дальнейшем стоит продолжать изучение влияния ЧФН и алкогольной интоксикации на метаболиты ОС как по отдельности, так и при одновременном воздействии.

Результаты данного исследования согласуются с предыдущими работами по изучению механизмов антиоксидантной защиты [7, 8], а также с другими исследованиями, утверждающими в пользу уменьшения выраженности ОС при помощи препаратов витаминов С и Е [16]. Насколько эффективным может оказаться использование экзогенных витаминов для снижения активности свободнорадикального окисления и ПОЛ при ЧФН и алкогольной интоксикации на данный момент только предстоит изучить.

**Заключение.** Проведенное нами исследование указывает на то, что острая интоксикация этанолом на фоне чрезмерных физических нагрузок приводит к снижению концентрации витаминных антиоксидантов (аскорбиновая кислота и  $\alpha$ -токоферол). Стоит отметить, что в условиях их сочетанного воздействия снижение содержания витаминов гораздо более выражено, чем при воздействии изолированной острой этаноловой интоксикации. Результаты исследования поддерживают гипотезу о критическом влиянии употребления алкоголя на фоне чрезмерных физических нагрузок. Подтверждение роли данного механизма открывает возможности для патогенетической терапии последствий окислительного стресса, а также позволит проводить дальнейшие исследования для уточнения взаимосвязи между участниками процессов антиоксидантной защиты.

#### **Библиографический список:**

1. Зезеров Е.Г. Биохимические механизмы острого и хронического действия этанола на организм человека // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 1998. № 2. С. 47–55.
2. Кольтовер, В. К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк // Усп. геронтол. 2000. № 4. С. 33–40.
3. Конвай В.Д., Чигринский Е.А., Корнякова В.В., Рейс Б.А. Активность антиоксидантных ферментов эритроцитов при интенсивных физических нагрузках на фоне приема D-рибозы // Вопросы питания. 2011. Т. 80, № 3. С. 75–79.
4. Конвай В.Д., Рейс Б.А., Чигринский Е.А. Роль дефицита рибозы для метаболизма семенников крыс в условиях перетренировки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 150, № 11. С. 582–585.
5. Корнякова В.В., Конвай В.Д., Величко Г.Н. Роль нарушения метаболизма пуринов в развитии повреждений эритроцитов, вызванных чрезмерными физическими нагрузками // Проблема сохранения здоровья в Сибири и в условиях Крайнего

- Севера: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции (Омск, 16–19 октября 2007 г.). Омск: СибГУФК, 2007. С. 315 – 320.
6. Корнякова В.В., Конвай В.Д., Рейс Б.А., Дятлова А.Ю. Утомление после чрезмерных физических нагрузок: механизмы развития, коррекция // Теория и практика физической культуры. 2009. № 3. С. 23–25.
  7. Чигринский Е.А. Антиоксидантная система семенников крыс при физических нагрузках разной интенсивности: дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2010. 150 с.
  8. Чигринский Е.А., Конвай В.Д., Ефременко Е.С., Соснин М.И. Активность ферментов системы глутатиона в почках крыс при чрезмерных физических нагрузках // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 4; URL: [www.science-education.ru/118-13884](http://www.science-education.ru/118-13884) (дата обращения: 13.05.2018).
  9. Chigrinski E.A., Conway V.D. Protective effect of D-ribose against inhibition of rats testes function at excessive exercise // J. Stress Physiol. Biochem. 2011. Vol. 7, No 3. P. 242–249.
  10. Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstadt, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review // Annals of Botany, 2003. Vol. 91, No. 2. P. 179–194.
  11. Desai I. D. Vitamin E analysis method for animal tissues // Meth. Enzymol. 1984. Vol. 105. P. 138–147.
  12. Harrison, F. E., Meredith, M. E., Dawes, S. M., Saskowski, J. L., & May, J. M. Low ascorbic acid and increased oxidative stress in gulo<sup>-/-</sup> mice during development // Brain Research. 2010. Vol. 1349, P. 143–152.
  13. Harrison, F. E., Yu, S. S., Van Den Bossche, K. L., Li, L., May, J. M., & McDonald, M. P. Elevated oxidative stress and sensorimotor deficits but normal cognition in mice that cannot synthesize ascorbic acid // Journal of Neurochemistry. 2008. Vol. 106 No. 3, P. 1198–1208.
  14. Traber, M. G., & Stevens, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective // Free Radical Biology & Medicine. 2011. Vol. 51, No. 5. P. 1000–1013.
  15. Varley H. Practical clinical biochemistry // New Delhi CBS publisher, 1988. 438 p.
  16. Wawrzyniak A. et al.  $\alpha$ -Tocopherol, ascorbic acid, and  $\beta$ -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress // Nutr Res. 2013. Vol. 33, No. 10. P. 868–875.

**Grik E. A.**

FSFEI HE «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russia, Omsk, Russia

## **ASCORBATE AND TOCOPHEROL IN RATS' KIDNEYS AFTER EXCESSIVE EXERCISE AND ACUTE ETHANOL INTOXICATION**

**Abstract.** Alcohol consumption and excessive exercise (EE) substantially affect normal human metabolism. Impairment of parenchymal organs, including kidneys, they cause breeds ground for decoding of the mechanisms underlying their exposure. According to the recent data, these factors provoke hypoxia-like condition and interfere with antioxidants' function. Vitamins C and E obtain antioxidant activity. We aimed at measuring ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol levels change under EE followed by acute ethanol intoxication. Thus, we linked the vitamins' levels with the oxidative stress happening in this condition. We tested 70 white male rats in 6 experimental groups (randomly sampled; n=10–12): 1st group – intact rats; 2nd – control exercise group; 3rd – control intoxication group; 4th – EE group; 5th – acute ethanol intoxication group; 6th – rats exposed to EE and acute ethanol intoxication. The results demonstrated that combined application of factors cause more significant decrease in vitamins' levels than isolated intoxication or EE: in group 6 ascorbate decreased by 29.5% comparing to group 4 and by 48.5% comparing to group 5;  $\alpha$ -tocopherol decreased by 47.3% comparing to group 4 and by 56.2% comparing to group 5. It suggests that vitamins C and E have a crucial role in antioxidant defense and significantly affect oxidative cascade mechanisms.

**Key words:** antioxidant system, ascorbate, tocopherol, excessive exercise, ethanol, kidneys, rats.