

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
5- И 10%-НЫМ РАСТВОРОМ ЭТАНОЛА**

© Т. А. Попова, Г. Х. Хусаинова, В. Н. Перфилова,
И. С. Мокроусов, И. Н. Тюренков, В. В. Багметова, И. В. Малюженко,
Н. С. Ганзикова, О. В. Островский, Г. П. Дудченко

Волгоградский государственный медицинский университет,
Волгоград, Россия
E-mail: vnperfilova@mail.ru

При сравнительной оценке нарушений функционального состояния митохондрий в условиях хронической полупринудительной алкогольной интоксикации, вызванной заменой питьевой воды на 5- и 10%-ный раствор этанола, подслащенный сахарозой, в течение 6 месяцев у 11- и 24-месячных самок и самцов выявлено, что с возрастом чувствительность к алкоголю возрастает, на что указывают более выраженные изменения в митохондриях клеток головного мозга старых крыс, получавших 5%-ный раствор этанола, по сравнению с молодыми, несмотря на то что молодые потребляли статистически значимо больше алкоголя, чем старые. Молодые и старые самки потребляли больше 5%-ного раствора этанола, чем самцы. 10%-ный раствор этанола молодые самки и самцы потребляли в среднем в равном количестве, при этом повреждения митохондрий были одинаковой степени выраженности. У старых животных самки потребляли больше 10%-ного раствора этанола, чем самцы, однако нарушения функционирования митохондрий клеток головного мозга были более выражены у самцов. Вероятно, половые и возрастные различия в токсикокинетике этанола стали причиной его более существенных повреждающих эффектов у самцов, чем у самок, и у старых крыс, чем у молодых.

Ключевые слова: хроническая алкогольная интоксикация, митохондрии, возрастные и половые различия.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 3. С. 312—326. 2018

T. A. Popova, G. Kh. Khusainova, V. N. Perfilova, I. S. Mokrousov, I. N. Tyurenkov, V. V. Bagmetova, I. V. Malyuzhenko, N. S. Ganzikova, O. V. Ostrovskiy, G. P. Dudchenko. COMPARATIVE ESTIMATION OF CHANGES OF CEREBRUM CELLS' MITOCHONDRIAS' FUNCTIONAL INDICATORS OF RATS OF DIFFERENT SEX AND AGE AT CHRONIC INTOXICATION WITH 5 AND 10% ETHANOL SOLUTION. Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; e-mail: vnperfilova@mail.ru.

During the comparative estimation of mitochondrias' functional state disorders under the conditions of chronic semi-forced alcoholic intoxication caused by replacement of drinking water with 5 and 10% ethanol solution sweetened with sucrose in the span of 6 months with 11 and

24 months old females and males it was revealed that in the course of ageing sensitivity to alcohol increases, which is pointed at by more pronounced changes in cerebrum cells' mitochondria of old rats, which were getting 5% ethanol solution, in comparison with the young ones, in spite of the fact that the young ones were getting statistically significantly more alcohol than the old ones. As for sex differences, the young and the old females consumed more 5% ethanol solution than the males. Young females and males consumed 10% ethanol solution in equal amount on the average and mitochondrias' damages were of the same degree of markedness. Among the old animals females consumed more 10% ethanol solution than males, however, disorders in the functioning of cerebrum cells mitochondria of males were more pronounced. Probably, gender and age differences in toxicokinetics of ethanol have become the reason of more significant damaging effects with males than females and with old rats than with the young ones.

Key words: chronic alcoholic intoxication, mitochondria, age and gender differences.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 3. P. 312—326. 2018

Митохондрии продуцируют АТФ путем окислительного фосфорилирования и регулируют многие клеточные функции, включая окисление жирных кислот, метаболизм глутамата и мочевины, антиоксидантную защиту и апоптоз. Они являются главным источником активных форм кислорода (АФК), образующихся при утечке электронов из дыхательной цепи. В то же время митохондрии сами очень восприимчивы к окислительному стрессу, что приводит к их дисфункции, повреждению тканей, развитию болезней [8].

Этанол действует как мощный эпигенетический разрушитель и потенциально способен влиять на клеточный метаболизм и дифференцировку. Структурная формула его содержит этильную (-CH₂—CH₃) и гидроксильную группы (-OH), что придает ей идеальный гидрофильно-липофильный баланс, который вместе с небольшой массой молекулы создает огромный потенциал для распространения и распределения во всех жидкостях и тканях организма, способствует проникновению через гистогематические барьеры и клеточные мембраны, в том числе в центральной нервной системе (ЦНС) [11]. Имеются данные, что он изменяет структуру и функции митохондрий, нарушает окислительное фосфорилирование и синтез АТФ, приводит к развитию оксидативного стресса [9, 22, 31]. Митохондриальный протеом очень чувствителен к модификациям АФК, установлены дефекты в комплексах I, III, IV и V, связанные с алкогольной интоксикацией. АФК вызывают перекисное окисление липидов, что влияет на проницаемость наружной и внутренней мембраны митохондрий. Это ведет к открытию митохондриальной поры переходной проницаемости (МППП) и набуханию органелл в результате притока ионов и воды. Из митохондрий выходит цитохром c, что вызывает активацию каспаз и фрагментацию ДНК и ведет к индукции программированной клеточной смерти или апоптозу [20]. Кроме того, отмечено снижение ферментативной активности и концентрации супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы (ГлП), что может указывать на способность этанола влиять на посттранскрипционный уровень синтеза антиоксидантных ферментов или их внутриклеточную деградацию.

Считается, что нейровоспалительное и окислительное повреждение митохондрий и клеточных белков способствует прогрессированию неврологических нарушений, вызванных злоупотреблением алкоголя [14].

Анализ продаж алкогольных напитков в России в расчете на душу населения (л) показал, что лидируют продажи таковых с низким содержанием этанола — пиво (4—6 % этанола), различные вина и др. (9—15 % этанола) [5]. Ввиду этого, нам представлялось важным изучение эффектов хронического воздействия на митохондрии растворов этанола с 5- и 10%-ным содержанием этилового спирта.

На сегодняшний день накоплено много убедительных фактов о влиянии возраста и пола на чувствительность организма к действию патологических факторов, ксенобиотиков и фармакологических средств. Выявлены значительные половые и возрастные различия в течение психоневрологических, в том числе

нейродегенеративных, заболеваний, а также в чувствительности к нейрпсихотропным средствам [3]. В этой связи важным представляется изучение половых и возрастных различий в течение патологических процессов для оптимизации путей их коррекции.

Таким образом, целью исследования явилась сравнительная оценка изменений функциональных показателей митохондрий клеток головного мозга крыс разного пола и возраста при хронической интоксикации 5- и 10%-ными растворами этанола.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах разного пола и возраста: молодых половозрелых 5-месячных самцах с исходной массой 200—230 г и самках (190—210 г), а также старых 20-месячных самцах (420—480 г) и самках (280—310 г). Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово» (Ленинградская область) и содержались в условиях вивария ВолгГМУ. Уход за ними осуществлялся согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434—2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [The European Convention, 1986]. Исследование выполнено в соответствии с ГОСТ Р-53434—2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и требованиями директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Протокол экспериментального исследования был одобрен Региональным независимым этическим комитетом (ГУ Волгоградский медицинский научный центр) (протокол № 198-2014 от 25.04.2014 г.).

Хроническую полупринудительную алкогольную интоксикацию моделировали путем замены питьевой воды на 5- и 10%-ный раствор этанола, подслащенный сахарозой (5 или 10 г сахара (сахар-песок, ГОСТ 21-94, РУСАГРО, Россия) на 100 мл 5- или 10%-ного раствора этанола соответственно). Было сформировано 12 групп по 8 животных в каждой. С 1-й по 6-ю — молодые животные: 1-я и 2-я — интактные самцы и самки, не подвергавшиеся алкогольной интоксикации; 3-я и 4-я — самцы и самки, получавшие перорально 5%-ный раствор этанола, 5-я и 6-я — самцы и самки, получавшие перорально 10%-ный раствор этанола. Возраст животных в группах с 1-й по 6-ю составлял на момент окончания эксперимента 11 месяцев. Группы старых животных с 7-й по 12-ю формировались аналогично, возраст — 24 месяца (продолжительность алкогольной интоксикации была сокращена ввиду гибели большого количества животных).

В исследовании использовали этиловый спирт 95 % (раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм, ЗАО «РФК», Россия) 5- и 10%-ной концентрации. Вычисляли потребление растворов этанола и воды в г/кг массы тела животного/сутки. Исследование проводили преимущественно в холодное время года (октябрь—март), животные содержались в отапливаемых и вентилируемых помещениях вивария со стандартной температурой 20—22 °С, что исключало влияние на питьевую потребность климатических условий и температурных колебаний.

По окончании алкогольной интоксикации у наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг в дистиллированной воде, внутривенно однократно) животных забирали головной мозг, помещали его в ледяной 0.9%-ный раствор NaCl, тщательно отмывая от крови. После взвешивания мозг измельчали ножницами в чашке Петри. Гомогенизацию осуществляли в охлажденном гомогенизаторе Поттера—Эльвейема (стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком) объемом 20 мл с добавлением сахарозной среды выделения (в соотношении 1:5), содержащей (мМ): 220 маннита, 100 сахарозы, 1 ЭДТА, 4 KH_2PO_4 , 20 HEPES ,

pH 7.3. Митохондрии получали стандартным методом дифференциального центрифугирования в сахарозной среде.

Скорость поглощения кислорода митохондриями определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка и анализатора жидкостей Эконикс «Эксперт-01» (Эконика, Россия). Измерение проводили в среде полярографии, которая содержала (мМ): 300 сахарозы, 10 KCl, 5 K_2HPO_4 , 1 ЭДТА, 1.2 MgCl, 5 трис-HCl. pH 7.4. В качестве субстратов окисления были использованы 5 мМ сукцинат и 5 мМ малат/5 мМ глутамат. АДФ использовали в концентрации 200 мкМ, ротенон — 0.5 мкМ. Перед работой полярографическую среду и субстраты окисления термостатировали 20 мин при t 33 °C.

Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий проводили по работе [18]. В ячейку объемом 1 мл, заполненную полярографической средой, в условиях постоянного перемешивания с использованием магнитной мешалки последовательно добавляли: 100 мкл суспензии митохондрий, содержащей 1 мг белка; субстрат I комплекса дыхательной цепи — 5 мМ малат/5 мМ глутамат; 200 мкМ АДФ; субстрат II комплекса дыхательной цепи — 5 мМ сукцинат; 200 мкМ АДФ; ингибитор I комплекса — 0.5 мкМ ротенон; 200 мкМ АДФ.

Скорость поглощения кислорода выражали в нмоль O_2 /мг белка/мин и рассчитывали в следующих метаболических состояниях (по Чансу): V_1 — скорость эндогенного дыхания, V_2 — скорость субстрат-зависимого дыхания, V_3 — скорость потребления кислорода митохондриями при добавлении субстрата окисления и АДФ (состояние окислительного фосфорилирования), V_4 — скорость дыхания митохондрий в присутствии субстрата после расходования внесенного АДФ. Для оценки сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования был рассчитан коэффициент дыхательного контроля (отношение V_3/V_4) [10]. Концентрацию белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури [19].

Для оценки функционирования антиоксидантной системы в выделенных митохондриях определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). Диеновые конъюгаты (ДК) и дикетоны выражали в единицах оптической плотности по модифицированной методике [7]. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по методу И. Д. Стальной [6]. Активность глутатионпероксидазы (ГлП) оценивали по убыли восстановленного глутатиона в реакции с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) [4], каталазы — по методике, основанной на способности пероксида водорода образовывать окрашенный комплекс с молибдатом аммония [1]. Суммарную активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по степени торможения реакции окисления кверцетина [2].

Полученные значения подвергали статистической обработке с использованием методов вариационной статистики. При анализе результатов исследования определяли средние значения, стандартные отклонения, медианы выборки посредством пакета программ Microsoft Office Excel 2007. Распределение величин исследуемых параметров не соответствовало нормальному закону распределения (критерий Шапиро—Уилка, $p > 0.05$). Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовали U-критерий Манна—Уитни, для множественного сравнения применяли тест Крускала—Уоллиса с пост-тестом Данна ANOVA (Statistica). Статистически достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как у старых, так и у молодых самцов и самок крыс контрольной группы потребление воды было относительно равномерным на всех сроках исследования. Значительные половые и возрастные различия были выявлены в характере потребления растворов этанола как в абсолютных показателях, так и в пересчете на 95%-ный этиловый спирт. У молодых самцов и в большей степени самок, пив-

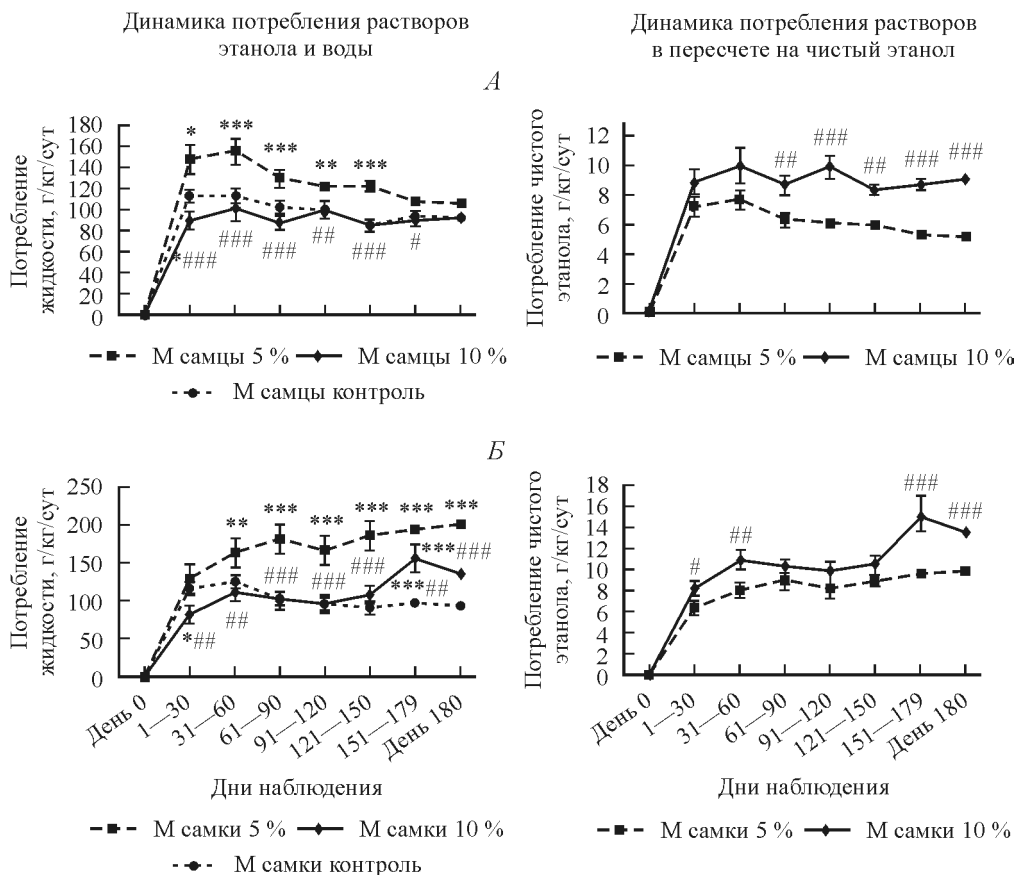


Рис. 1. Динамика потребления 5- и 10%-ного раствора этанола у крыс разного пола и возраста в условиях хронической алкогольной интоксикации ($n = 8$).

A — молодые самцы; B — молодые самки; B — старые самцы; Г — старые самки. n — количество животных в группах; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ — различия статистически значимы по сравнению с показателем контрольной группы животных соответствующего пола и возраста; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ — различия статистически значимы по сравнению с показателем группы животных, получавших 5%-ный этанол, соответствующего пола и возраста (ранговый однофакторный анализ Краскела—Уоллиса, апостериорный критерий Данна).

ших 5%-ный этанол, на всех сроках интоксикации количество потребляемой жидкости было больше, чем у контрольных крыс. Высокие показатели потребления 5%-ного этанола у молодых самцов и самок крыс могут быть связаны с повышением питьевой мотивации из-за использования в качестве вкусовой добавки подсластителя — сахарозы. Молодые животные как женского, так и мужского пола потребляли статистически значимо меньшее количество 10%-ного этанола по сравнению с количеством 5%-ного этанола практически на всех этапах исследования. Возможно, более концентрированный и более сладкий 10%-ный раствор этилового спирта был менее приятен на вкус и не вызывал повышения питьевой мотивации у животных в отличие от менее крепкого и менее подслащенного 5%-ного раствора. В течение почти всего времени интоксикации количество потребляемого 10%-ного этанола у животных обоего пола не имело статистически значимых различий с количеством потребляемой воды контрольными группами крыс соответствующего пола, лишь у самок на шестом месяце интоксикации отмечалось возрастание потребления 10%-ного спирта, что может быть след-

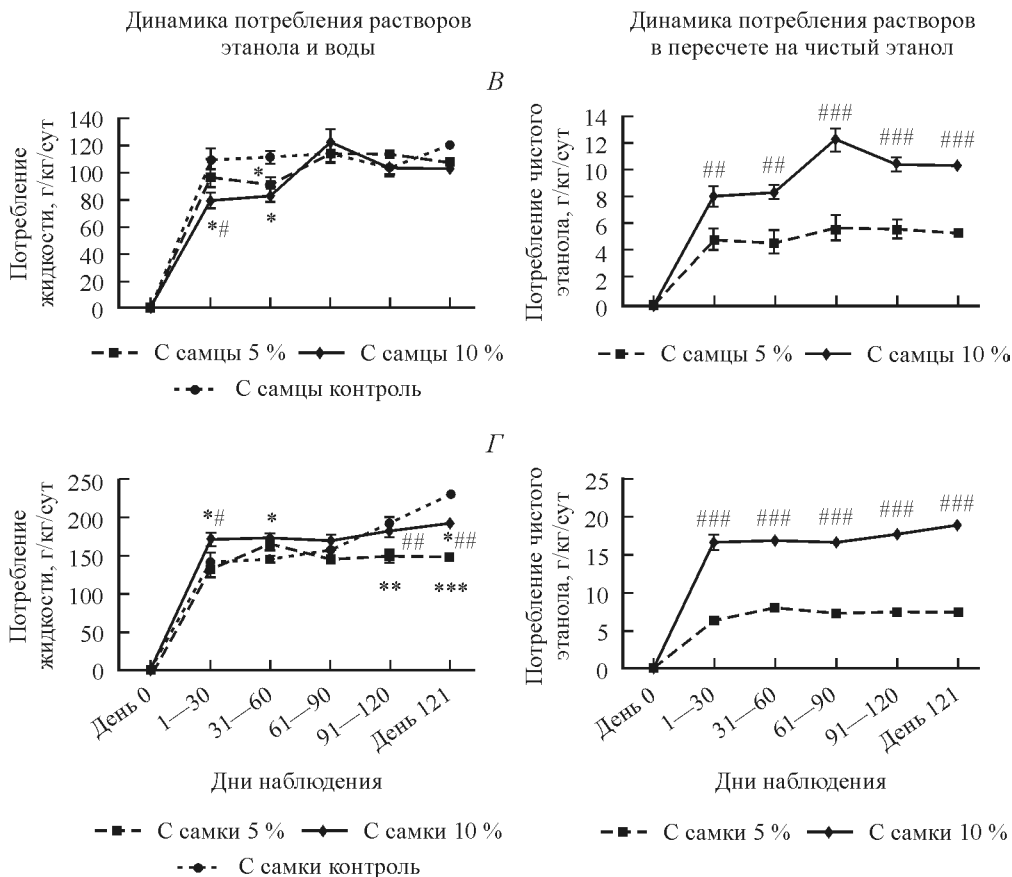


Рис. 1 (продолжение).

ствием развития толерантности к нему. У молодых самцов и самок крыс на всех этапах интоксикации потребление чистого этанола с раствором 10%-ной концентрации было выше, чем с 5%-ным раствором, что противоположным образом соотносится с различиями в потреблении растворов в абсолютных показателях. В большей степени данные различия проявились в группах молодых крыс мужского пола. Молодые самки потребляли большее количество как 5-, так и 10%-ного этанола, чем самцы того же возраста (рис. 1).

У старых крыс количество потребляемых 5- и 10%-ных растворов было приближено к количеству воды, выпитой старыми крысами контрольной группы соответствующего пола, статистически значимая разница отмечалась относительно редко по сравнению с молодыми животными. На всех сроках интоксикации старые самки потребляли большее количество жидкости — как воды (контрольные), так и растворов этанола (опытные), чем старые самцы. Среди животных, потреблявших 5%-ный этанол, возрастные различия в количестве потребляемых растворов имели сходные тенденции и выглядели следующим образом: молодые самки и в меньшей мере самцы потребляли большее количество раствора (как в абсолютных значениях, так и в пересчете на чистый этанол), чем старые. Выраженные возрастные различия в потреблении 10%-ного этанола регистрировались у самок. Так, старые самки во все периоды наблюдений потребляли большее количество как раствора, так и чистого этанола, чем молодые. На последних сроках интоксикации старые самки потребляли статистически значимо большее количе-

ство 10%-ного этанола, чем 5%-ного, в отличие от молодых самок, которые на всех этапах исследования потребляли больше 5%-ного этанола, чем 10%-ного. У самцов, пивших 10%-ный этанол, возрастные различия были существенно менее выражены, чем у самок. У старых животных обоего пола различия в потреблении чистого этанола были более выражены, чем у молодых — на всех этапах интоксикации животные получали статистически значимо большее количество чистого этанола с раствором 10%-ной концентрации, чем с 5%-ной (рис. 1).

В митохондриях клеток мозга интактных молодых самцов и самок достоверных различий в скорости стимулированного дыхания АДФ (V_3) не было выявлено. У молодых самцов (11 месяцев), подвергавшихся интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола, V_3 в присутствии малата/глутамата и сукцината снизилась на 38, 39 % и 53, 53.5 % соответственно по сравнению с интактной группой. В группе 11-месячных самок, принимавших 5- и 10%-ный раствор этанола, V_3 для I комплекса снизилась на 36 и 44 %, а для II — на 57 и 64 % соответственно. У старых (24-месячных) самцов существенное изменение скорости потребления кислорода в состоянии V_3 наблюдалось только при интоксикации 10%-ным раствором этанола. Для I комплекса дыхательной цепи данный показатель увеличился на 18 %, а для II — на 80 % по сравнению с интактной группой. В митохондриях мозга старых самок, подвергавшихся интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола, скорость стимулированного дыхания для I комплекса увеличилась на 23 и 22 % соответственно, а для II комплекса на 14 и 83 % по сравнению с аналогичными показателями самок интактных групп (рис. 2).

При сравнении V_3 у 24-месячных самцов и самок, получавших 5- и 10%-ный раствор этанола, достоверной разницы не выявлено.

Были обнаружены возрастные отличия скорости стимулированного дыхания: в группах интактных молодых животных данный показатель был на 93 и 90 % выше для I комплекса и на 114 и 80 % ($p < 0.05$) — для II по сравнению с 24-месячными самцами и самками соответственно, в группе молодых самок, получавших 10%-ный раствор этанола, показатель был выше на 20 и 50 % для I и II комплексов соответственно по сравнению с аналогичной группой старых самок (рис. 2).

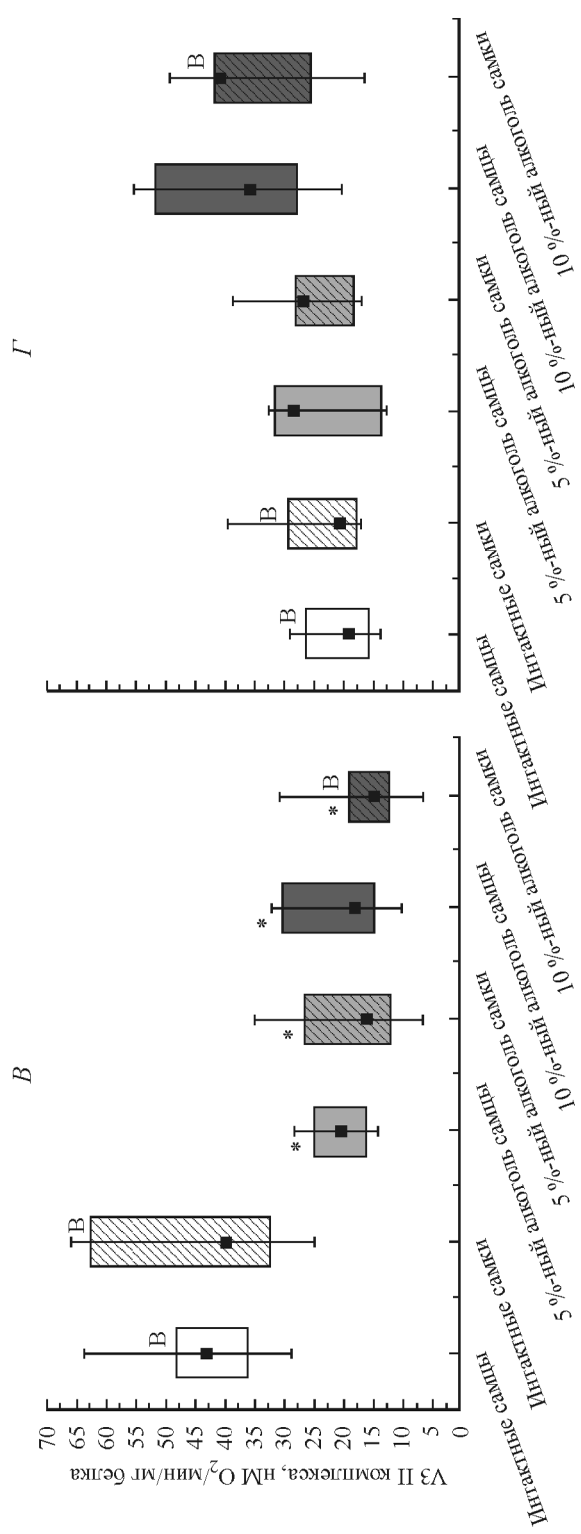
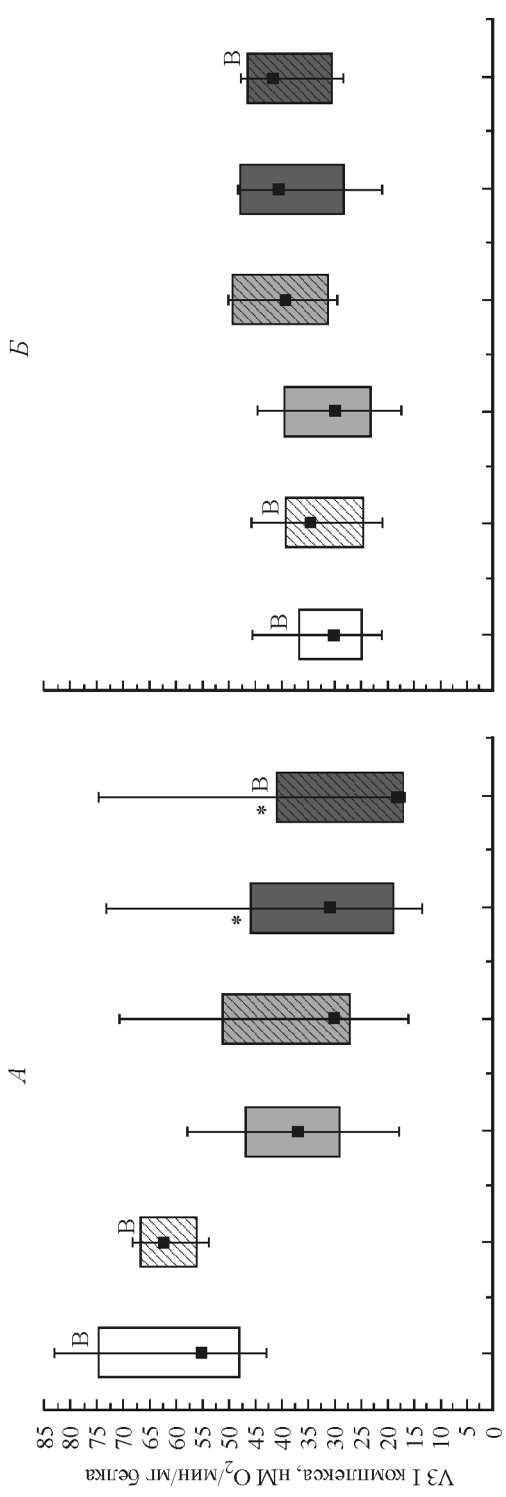
Скорость V_4 в митохондриях клеток головного мозга 11-месячных самцов, длительно получавших 5- и 10%-ный раствор этанола, для I комплекса практически не изменилась, а для II — снизилась на 17 и 8 % по сравнению с интактной группой. У молодых самок, подвергавшихся алкогольной интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола, показатель V_4 при окислении малата/глутамата снизился на 33.7 и 37 %, сукцината — на 32 и на 34 % соответственно.

При сравнении скорости нестимулированного дыхания в митохондриях клеток головного мозга молодых самцов и самок, достоверные отличия были выяв-



Рис. 2. Скорость поглощения кислорода митохондриями клеток головного мозга крыс при хронической интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола ($n = 8$).

n — количество животных в группах. А, В, Д, Ж — 11-месячные животные; Б, Г, Е, З — 24-месячные животные. На графике представлены медианы показателей скорости поглощения кислорода с указанием границ интерквартильного размаха и границ диапазона, включающего 90 % значений, выраженных в нмоль O_2 /мг белка/мин. Измерения проводились для I комплекса ЦПЭ в присутствии малата, для II комплекса ЦПЭ — в присутствии малата, сукцината и ротенона. V_3 (по Чансу) — скорость стимулированного АДФ дыхания митохондрий; V_4 (по Чансу) — скорость дыхания митохондрий после истощения АДФ. Интактная группа — митохондрии, выделенные из мозга здоровых крыс (белые прямоугольники). 5 % алкоголь — митохондрии, выделенные из мозга крыс, подвергавшихся алкоголизации 5%-ным раствором этанола (светло-серые прямоугольники); 10 % алкоголь — митохондрии, выделенные из мозга крыс с экспериментальной алкоголизацией 10%-ным этанолом (темно-серые прямоугольники). Самцы — прямоугольники без штриховки, самки — косая штриховка. * $p < 0.05$ по сравнению с интактной группой по критерию Крускала—Уоллиса с пост-тестом Данна для множественных сравнений. В — $p < 0.05$ при сравнении групп разного возраста по критерию Манна—Уитни; П — $p < 0.05$ при сравнении групп разного пола по критерию Манна—Уитни.



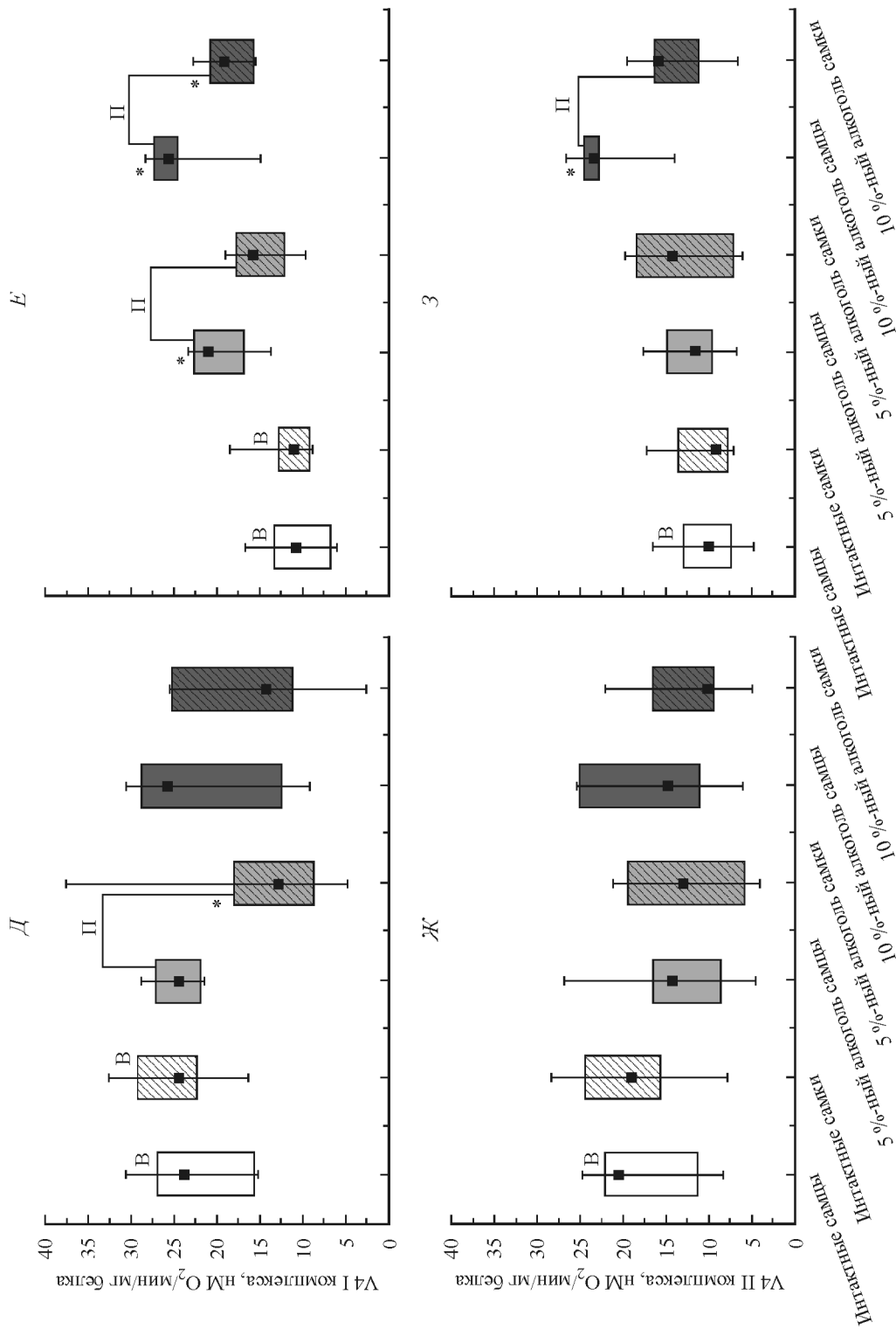


Рис. 2 (продолжение).

лены только для I комплекса при интоксикации 5%-ным раствором этанола, у самцов данный показатель был на 50 % ($p < 0.05$) выше, чем у самок.

В митохондриях клеток головного мозга 24-месячных самцов при интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола скорость потребления кислорода после истощения АДФ для I комплекса увеличилась на 81 и 122 %, для II — на 16 и 123 % относительно интактной группы. При сравнении данного показателя у 11- и 24-месячных самцов отличия были выявлены и в интактных группах и составили 100 ($p < 0.05$) и 70 % ($p < 0.05$) для I и II комплексов соответственно.

У старых самок, подвергавшихся алкогольной интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола, скорость нестимулированного дыхания в митохондриях клеток головного мозга увеличилась при окислении малата/глутамата на 25 и 56 %, сукцината — на 21 и 67 % соответственно. Достоверные отличия были выявлены при сравнении показателя V_4 между молодыми и старыми самками только в интактной группе для I комплекса, у молодых самок он был выше на 107 % ($p < 0.05$).

При половом сравнении у старых животных было выявлено, что V_4 на 26 % ($p < 0.05$) выше для I и II комплексов в группах самцов, подвергшихся интоксикации 10%-ным раствором этанола, 5%-ным раствором этанола — на 30 % только для II комплекса (рис. 2).

Дыхательный контроль для I комплекса в группе молодых самцов, подвергавшихся алкогольной интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола, снизился в 1.8 и 1.7 раза, а для II комплекса в 1.4 и 1.9 раза соответственно по сравнению с интактной группой. У 11-месячных самок при алкогольной интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола для I комплекса данный показатель снизился в 1.5 раза, а для II комплекса — в 1.4 и 1.8 раза соответственно относительно интактной группы (рис. 3). При сравнении данного показателя у молодых самцов и самок достоверных отличий не было выявлено.

Коэффициент дыхательного контроля в митохондриях клеток головного мозга старых самцов, подвергшихся интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола, снизился для I комплекса дыхательной цепи в 2.5 и 2.7 раза, а для II комплекса — в 1.4 и 1.5 раза соответственно по сравнению с интактными животными.

У 24-месячных самок дыхательный контроль при интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола для I комплекса дыхательной цепи был в 1.4 и 1.5 раза ниже, а для II комплекса практически не изменялся относительно интактной группы. Дыхательный контроль у старых самок был в 1.3 ($p < 0.05$) раза выше по сравнению с аналогичными показателями молодых самок и в 1.5 ($p < 0.05$) раза выше, чем у самцов.

Сравнение дыхательного контроля у 11- и 24-месячных животных показало, что он выше у старых самок в 1.4 ($p < 0.05$) раза для I комплекса в обеих группах, подвергавшихся интоксикации раствором этанола, для II комплекса — только у животных, получавших 10%-ный раствор этанола.

Сравнение содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — диеновых конъюгатов в митохондриях клеток головного мозга молодых интактных крыс — показало, что у самок он выше, чем у самцов. У старых животных половые отличия отсутствовали. При сравнении 2 возрастных групп оказалось, что с возрастом концентрация ДК повышается у самцов и не изменяется у самок. Уровень дикетонов у молодых самок всех групп был достоверно выше, чем у самцов. У старых животных отличия выявлены только у группы животных, получавших 10%-ный раствор этанола, при этом концентрация дикетонов у самцов была выше. Содержание их во всех группах с возрастом снижалось, за исключением группы самцов с интоксикацией 10%-ным раствором этанола, у которой наблюдалась обратная зависимость (см. таблицу).

При сравнении уровня вторичных продуктов перекисного окисления липидов — малонового диальдегида — по половому и возрастному критерию достоверных отличий не было выявлено. Однако у старых животных с увеличением концентрации этанола уровень малонового диальдегида повышался, в то время

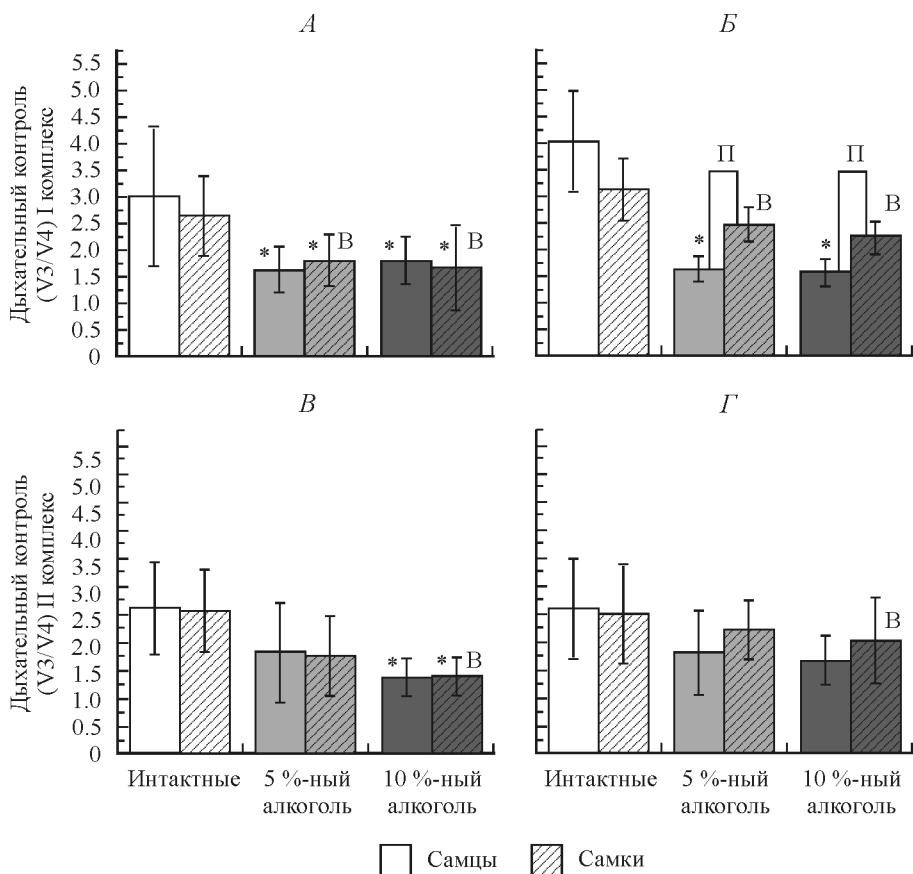


Рис. 3. Коэффициент дыхательного контроля (V_3/V_4) митохондрий клеток головного мозга крыс при хронической интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола ($n = 8$).

n — количество животных в группах. А, В — 11-месячные животные; Б, Г — 24-месячные животные. На графике представлены средние значения $M \pm \sigma$, рассчитанные как отношение скоростей поглощения кислорода V_3/V_4 (по Чансу). Измерения проводились для I комплекса ЦПЭ в присутствии малата, для II комплекса ЦПЭ — в присутствии малата, сукцината и ротенона. * $p < 0.05$ по сравнению с интактной группой по критерию Крускала—Уоллиса с пост-тестом Данна для множественных сравнений. В — $p < 0.05$ при сравнении групп разного возраста по критерию Манна—Уитни; II — $p < 0.05$ при сравнении групп разного пола по критерию Манна—Уитни.

как в группах молодых животных отличия были выявлены только у самцов при интоксикации 5%-ным раствором этанола.

Активность СОД у 24-месячных животных была ниже, чем у 11-месячных, однако достоверные отличия были только у самцов с интоксикацией 10%-ным раствором этанола. У самок данный показатель был незначительно выше, чем у самцов.

Активность каталазы с возрастом несколько снижалась, особенно выражено при интоксикации 10%-ным раствором этанола. При сравнении данного показателя по половому признаку достоверные отличия наблюдались только у молодых животных с интоксикацией 5%-ным раствором этанола, у самок он был выше, чем у самцов.

У старых животных активность глутатионпероксидазы (ГлП) была ниже, чем у молодых. У 24-месячных самок с алкогольной интоксикацией 10%-ным раствором этанола данный показатель был выше, чем у самцов, у остальных групп отличий не было (см. таблицу).

Изменение показателей процессов перекисного окисления липидов в митохондриях мозга крыс при хронической интоксикации 5- и 10%-ным раствором этанола ($M \pm \sigma$) ($n = 8$)

Показатель	Возраст, месяцы	Пол	Группа животных		
			интактная	5%-ный алкоголь	10%-ный алкоголь
Малоновый диальдегид, мМ/мг белка	11	Самцы	0.68 ± 0.18	1.22 ± 0.28*	1.04 ± 0.42
		Самки	0.65 ± 0.28	0.88 ± 0.4	0.97 ± 0.48
	24	Самцы	0.55 ± 0.28	1.25 ± 0.33*	1.7 ± 1.22*
		Самки	0.57 ± 0.16	1.16 ± 0.38*	1.36 ± 0.63*
Диеновые конъюгаты, D ₂₃₃ /мг белка	11	Самцы	1.25 ± 0.25 ^{ПВ}	1.28 ± 0.55 ^{ПВ}	1.47 ± 0.42 ^{ПВ}
		Самки	2.13 ± 0.32	2.6 ± 0.78 ^В	2.52 ± 0.93 ^В
	24	Самцы	2.3 ± 0.87	4.33 ± 1.72*	4.85 ± 2.51*
		Самки	2.92 ± 0.73	4.07 ± 0.62	4.03 ± 2.02
Дикетоны, D ₂₇₈ /мг белка	11	Самцы	0.33 ± 0.1 ^П	0.35 ± 0.18 ^П	0.36 ± 0.08 ^{ПВ}
		Самки	0.52 ± 0.08	0.64 ± 0.16	0.65 ± 0.15
	24	Самцы	0.27 ± 0.18	0.34 ± 0.1*	0.82 ± 0.4* ^П
		Самки	0.39 ± 0.2	0.40 ± 0.27	0.41 ± 0.19
Супероксиддисмутаза, усл. ед./мг белка	11	Самцы	40.8 ± 12.5	33.8 ± 13.7	35.7 ± 15.7 ^В
		Самки	40.3 ± 15.6	37.6 ± 10.4	35.5 ± 18.6
	24	Самцы	43.58 ± 8.38	27.14 ± 18.25*	19.61 ± 8.74*
		Самки	39.9 ± 15.45	33.56 ± 12.01	31.73 ± 18.55
Каталаза, мг H ₂ O ₂ /мин/мг белка	11	Самцы	12.9 ± 0.74	13.0 ± 0.24 ^П	12.9 ± 0.34 ^В
		Самки	13.7 ± 2.2	15.2 ± 3.4	13.8 ± 2.6 ^В
	24	Самцы	13.37 ± 2.9	12.19 ± 5.43	6.83 ± 3.48*
		Самки	12.08 ± 5.46	10.98 ± 4.06	9.69 ± 2.5
Глутатионпероксидаза, мМ глутатиона/мин/мг белка	11	Самцы	21.4 ± 6.0 ^В	10.15 ± 5.0	16.2 ± 8.9 ^В
		Самки	26.4 ± 6.2 ^В	11.9 ± 9.5	11.5 ± 6.6
	24	Самцы	12.44 ± 3.79	5.05 ± 2.25*	2.96 ± 1.32* ^П
		Самки	10.81 ± 2.37	7.19 ± 2.31	7.02 ± 2.83

Примечание. n — количество животных в группах; * $p < 0.05$ по сравнению с интактной группой по критерию Крускала—Уоллиса с пост-тестом Данна для множественных сравнений; В — $p < 0.05$ при сравнении групп разного возраста по критерию Манна—Уитни; П — $p < 0.05$ при сравнении групп разного пола по критерию Манна—Уитни.

Содержание продуктов ПОЛ в митохондриях мозга увеличивалось пропорционально дозе принятого этанола. Концентрация диеновых конъюгатов с возрастом достоверно повышалась, тогда как уровень дикетонов незначительно снижался, малонового диальдегида — практически не изменялся. При сравнении концентрации продуктов ПОЛ у самок и самцов было установлено, что содержание малонового диальдегида незначительно выше в митохондриях самцов. При этом уровень дикетонов и ДК достоверно выше у самок, за исключением группы 24-месячных животных с 10%-ной алкогольной интоксикацией, у которой уровень первичных продуктов ПОЛ был выше у самцов.

Оценка параметров АОС показала, что интоксикация 10%-ным раствором этанола вызывает более выраженное повреждение митохондрий, чем 5%-ным, что сопровождается значительным снижением активности ферментов. В целом динамика биохимических показателей АОС митохондрий мозга крыс характеризуется возрастным снижением активности ферментов. При половом сравнении было установлено, что активность ферментов АОС у самцов обоих возрастов достоверно ниже, чем у аналогичных групп самок (см. таблицу).

Хроническое потребление алкоголя вызывает многочисленные биохимические и биофизические изменения в головном мозге, при этом митохондрии являются органеллами, наиболее чувствительными к его повреждающему действию [17, 27]. Алкоголь изменяет свойства митохондриальной мембраны, активирует развитие окислительного стресса и приводит к снижению активности I, III, IV комплексов дыхательной цепи, повреждению ДНК и дисфункции митохондрий [27], что усугубляет окислительный стресс в клетке и приводит к накоплению повреждения клеточных структур, которое увеличивается с возрастом [15], функция митохондрий снижается [33]. Согласно митохондриальной свободнорадикальной теории старения, АФК, продуцируемые митохондриями, нарушают функции различных молекул, что приводит к старению [24]. Злоупотребление алкоголем вызывает преждевременное окислительное старение митохондриальной ДНК [21]. В работе Н. К. Seitz и соавт. [30] демонстрируются половые и возрастные различия в реакции организма на этанол. Показано более выраженное токсическое действие алкоголя у пожилых самцов по сравнению с молодыми, но не у самок, ассоциированное с задержкой элиминации алкоголя и снижением активности ферментов, биотрансформирующих этанол и ацетальдегид [29]. Возможно, это связано со снижением уровня НАД⁺ во время алкогольной интоксикации, что приводит к деструкции органов, потому что НАД⁺-зависимые ферменты, например сиртуины — класс гистоновых деацетилаз, не могут полноценно функционировать. В результате ограничивается эпигенетическая регуляция экспрессии генов, ответственных за синтез белков, влияющих на обменные процессы и защищающих клетки от повреждения [13]. В целом ряде исследований было установлено, что грызуны женского пола демонстрируют более высокие показатели потребления и предпочтения этанола, чем особи мужского пола, при этом у самок регистрируется более высокая скорость всасывания, распределения и элиминации этанола, чем у самцов [12, 16, 28]. В работе E. Mezey и соавт. [23] показано, что активность желудочной алкогольдегидрогеназы у самок выше, чем у самцов, аналогичные данные получены и в отношении печеночной фракции фермента [25]. Показано также, что тестостерон и дигидротестостерон подавляют активность алкогольдегидрогеназы [26, 32], а эстрадиол повышает активность фермента [26].

В нашем исследовании интоксикация 5%-ным раствором этанола приводила к уменьшению скорости V_3 , V_4 и дыхательного контроля в митохондриях клеток головного мозга у молодых животных по сравнению с интактной группой, что обратно коррелировало со вторичными продуктами ПОЛ. Половые отличия были обнаружены для V_4 I комплекса — у молодых самок показатель был ниже. Концентрация диеновых конъюгатов и дикетонов в митохондриях клеток головного мозга у самок этого возраста была выше, чем у самцов. Возможно, у самок окислительное повреждение дыхательной цепи было более выражено потому, что и у интактных животных уровень продуктов ПОЛ был выше.

У старых животных, получавших 5%-ный раствор этанола, V_4 возрастала по отношению к интактным, что сопровождалось снижением дыхательного контроля и повышением продуктов ПОЛ в митохондриях клеток головного мозга. Половые различия были выявлены для I комплекса дыхательной цепи — у самцов V_4 был выше, а дыхательный контроль ниже, чем у самок. Повышение уровня V_4 можно объяснить «утечкой» электронов из дыхательной цепи.

В группе, получавшей 10%-ный раствор этанола, у молодых животных в митохондриях клеток головного мозга снижались V_3 и дыхательный контроль независимо от пола, у старых наблюдались половые различия — у самцов повреждающее действие этанола было более выражено, что проявлялось в достоверном увеличении V_4 , снижении дыхательного контроля и повышении содержания дикетонов в митохондриях.

Таким образом, с возрастом чувствительность к алкоголю возрастает, на что указывают более выраженные изменения в митохондриях клеток головного мозга старых крыс, получавших 5%-ный раствор этанола, по сравнению с молодыми, несмотря на то что молодые потребляли статистически значимо больше алкоголя, чем старые. Что касается половых различий, молодые и старые самки потребляли больше 5%-ного раствора этанола, чем самцы. 10%-ного раствора этанола молодые самки и самцы потребляли в среднем в равном количестве, при этом повреждения митохондрий были одинаковой степени выраженности. У старых животных самки потребляли больше 10%-ного раствора этанола, чем самцы, однако нарушения функционирования митохондрий клеток головного мозга были более выражены у самцов. Вероятно, половые и возрастные различия в токсикокинетике этанола стали причиной его более существенных повреждающих эффектов у самцов, чем у самок, и у старых крыс, чем у молодых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г.* Методы определения активности каталазы. Лаб. дело. (1): 16—19. 1988.
- [2] *Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вopr. мед. химии. (2): 88—91. 1990.
- [3] *Манвелян Э. А.* Половая диссимилиция эффектов психотропных средств. Ставрополь. Изд-во СГУ. 2008.
- [4] *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лаб. дело. (12): 12—16. 1986.
- [5] *Потребление алкоголя в России.* Инфографика. АО «Аргументы и факты». Официальный сайт. [Электронный ресурс]. 25 января, 2017. URL: http://www.aif.ru/dontknows/infographics/potreblenie_alkogolya_v_rossii_infografika (дата обращения 28.07.2017).
- [6] *Стальная И. Д., Гаршивили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М. Медицина. 66—68. 1977.
- [7] *Ушколова В. Н., Иоанидис Н. В., Кадочникова Г. Д., Деева З. М.* Контроль перекисного окисления липидов. Новосибирск. Изд-во Новосиб. ун-та. 1993.
- [8] *Akbar M., Essa M. M., Daradkeh G., Abdelmegeed M. A., Choi Y., Mahmood L., Song B. J.* Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitrooxidative stress. *Brain Res.* 1637: 34—55. 2016.
- [9] *Al-Bagdadi F., Young M. J., Geaghan J. P., Yao S., Barona H. M., Martinez-Ceballos E., Yoshimura M.* Observation on the ultrastructure morphology of HeLa cells treated with ethanol: Statistical analysis. *Ultrastruct. Pathol.* 40(6): 324—332. 2016.
- [10] *Brand M. D., Nicholls D. G.* Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435(2): 297—312. 2011.
- [11] *Costardi J. V. V., Nampo R. A. T., Silva G. L., Ribeiro M. A. F., Stella H. J., Stella M. B., Malheiros S. V. P.* A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 61(4): 381—387. 2015.
- [12] *Crippens D., White M. L., George M. A., Jaworski J. N., Brunner L. J., Lancaster F. E., Gonzales R. A.* Gender differences in blood levels, but not brain levels, of ethanol in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23(3): 414—420. 1999.
- [13] *French S. W.* Chronic alcohol bingeing injures the liver and other organs by reducing NAD⁺ levels required for sirtuin's deacetylase activity. *Exp. Mol. Pathol.* 100(2): 303—306. 2016.
- [14] *Haorah J., Ramirez S. H., Floreani N., Gorantla S., Morsey B., Persidsky Y.* Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic. Biol. Med.* 45(11): 1542—1450. 2008.
- [15] *Hoek J. B., Cahill A., Pastorino J. G.* Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology.* 122(7): 2049—2063. 2002.
- [16] *Kwo P. Y., Ramchandani V. A., O'Connor S., Amann D., Carr L. G., Sandrasegaran K., Kopecky K. K., Li T. K.* Gender differences in alcohol metabolism: relationship to liver volume and effect of adjusting for body mass. *Gastroenterology.* 115(6): 1552—1557. 1998.

- [17] Lamarche F., Carcenac C., Gonthier B., Cottet-Rousselle C., Chauvin C., Barret L., Leverve X., Savasta M., Fontaine E. Mitochondrial permeability transition pore inhibitors prevent ethanol-induced neuronal death in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 26(1): 78—88. 2013.
- [18] Lanza I. R. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods Enzymol.* 475: 349—372. 2009.
- [19] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265—275. 1951.
- [20] Ma L., Dong J. X., Wu C., Li X. Y., Chen J., Zhang H., Liu Y. Spectroscopic, polarographic, and microcalorimetric studies on mitochondrial dysfunction induced by ethanol. *J. Membr. Biol.* 250(2): 195—204. 2017.
- [21] Mansouri A., Fromenty B., Berson A., Robin M. A., Grimbert S., Beaugrand M., Erlinger S., Pessayre D. Multiple hepatic mitochondrial DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholic patients. *J. Hepatol.* 27(1): 96—102. 1997.
- [22] Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7(12): 4281—4304. 2010.
- [23] Mezey E., Sharma S., Rennie L., Potter J. J. Sex differences in gastric alcohol dehydrogenase activity of Sprague-Dawley rats. *Gastroenterology.* 103: 1804—1810. 1992.
- [24] Pollard A., Shephard F., Freed J., Liddell S., Chakrabarti L. Mitochondrial proteomic profiling reveals increased carbonic anhydrase II in aging and neurodegeneration. *Aging.* 8(10): 2425. 2016.
- [25] Quintanilla M. E., Tampier L., Sapag A., Gerdtzen Z., Israel Y. Sex differences, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde burst, and aversion to ethanol in the rat: a systems perspective. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293(2): E531—E537. 2007.
- [26] Rachamin G., Macdonald J. A., Wahid S., Clapp J. J., Khanna J. M., Israel Y. Modulation of alcohol dehydrogenase and ethanol metabolism by sex hormones in the spontaneously hypertensive rat. Effect of chronic ethanol administration. *Biochem. J.* 186: 483—490. 1980.
- [27] Reddy V. D., Padmavathi P., Kavitha G., Saradamma B., Varadacharyulu N. Alcohol-induced oxidative/nitrosative stress alters brain mitochondrial membrane properties. *Mol. Cell Biochem.* 375(1—2): 39—47. 2013.
- [28] Robinson D. L., Brunner L. J., Gonzales R. A. Effect of gender and estrous cycle on the pharmacokinetics of ethanol in the rat brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26(2): 165—72. 2002.
- [29] Seitz H. K., Meydani M., Ferschke I., Simanowski U. A., Boesche J., Bogusz M., Hoepker W. W., Blumberg J. B., Russell R. M. Effect of aging on in vivo and in vitro ethanol metabolism and its toxicity in F344 rats. *Gastroenterology.* 97(2): 446—456. 1989.
- [30] Seitz H. K., Xu Y., Simanowski U. A., Osswald B. Effect of age and gender on in vivo ethanol elimination, hepatic alcoholdehydrogenase activity, and NAD⁺ availability in F344 rats. *Res. Exp. Med.* 192(3): 205—212. 1992.
- [31] Teplova V. V., Kruglov A. G., Kovalyov L. I., Nikiforova A. B., Fedotcheva N. I., Lemasters J. J. Glutamate contributes to alcohol hepatotoxicity by enhancing oxidative stress in mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 49(3): 253—264. 2017.
- [32] Vaubourdoille M., Guechot J., Chazouilleres O., Poupon R. E., Giboudeau J. Effect of dihydrotestosterone on the rate of ethanol elimination in healthy men. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15: 238—240. 1991.
- [33] Ziaaldini M. M., Hosseini S. R., Fathi M. Mitochondrial adaptations in aged skeletal muscle: effect of exercise training. *Physiol. Res.* 66(1): 1—14. 2017.

Поступила 18 X 2017
После доработки 20 XII 2017