

УДК 616.89–008.441.13+612–092.18

## ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ГЛУТАТИОНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Мицуля Т.П., Мороз Д.И., Диденко К.Н.

*ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Омск, e-mail: bx-osma@mail.ru*

Высокая медико-социальная значимость уровня алкоголизации населения создает необходимость учета всех аспектов развития алкогольной болезни, основным из которых рассматривается биологический аспект. Грубое вмешательство экзогенного этанола в метаболические процессы определяет поиск направлений коррекции многочисленных нарушений обменных процессов. Важной точкой приложения влияния лекарственных препаратов является функционирование антиоксидантной системы клеток в условиях развития алкогольной зависимости. Одной из основных составляющих неферментативной части данной системы является система глутатиона. В статье описывается влияние применения этилметилгидроксипиридина сукцината на показатели обмена глутатиона в ткани печени животных, подвергшихся принудительной алкоголизации с целью формирования нарушений обмена веществ, характерных для физической зависимости от алкоголя. Выявленные изменения свидетельствуют о влиянии этилметилгидроксипиридина на ферменты метаболизма глутатиона в начальные сроки моделирования алкогольной зависимости. В указанные сроки формирования синдрома отмены этанола происходит увеличение активности глутатионпероксидазы, что свидетельствует об определенном положительном влиянии этилметилгидроксипиридина на тиолзависимые компоненты антиокислительной защиты клеток.

**Ключевые слова:** алкоголь, алкоголизм, этанол, глутатион, антиоксиданты, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, алкогольный абстинентный синдром, алкогольная абстиненция

## IMPACT ASSESSMENT OF ETHYLMETHYLGIDROXYPYRIDINE SUCCINATE ON THE INDICATORS OF THE EXCHANGE OF GLUTATHIONE IN THE SIMULATION OF ALCOHOLIC DEPENDENCE

Mitsuya T.P., Moroz D.I., Didenko K.N.

*Omsk State Medical University of the Russian Federation Ministry of Health, Omsk, e-mail: bx-osma@mail.ru*

High medical and social importance of the level of alcoholization of the population creates the necessity of considering all aspects of the development of alcoholic disease, the main of which is considered a biological aspect. Impact of exogenous ethanol on the metabolism determines the search directions in the correction of metabolic processes. Evaluation of the effect of antioxidant drugs on the functioning of the antioxidant system is important in the development of alcohol dependence. The main component of non-enzymatic part of this system is the glutathione system. The article describes the impact of the application ethylmethylhydroxypyridine succinate on indicators of glutathione metabolism in the liver tissue of ethanol-treated rats. Changes indicate ethylmethylhydroxypyridine succinate primary influence on the enzymes of glutathione metabolism at the initial time of modeling of alcohol dependence. In the early period of ethanol withdrawal increases the activity of glutathione peroxidase in the liver. There is a positive influence on ethylmethylhydroxypyridine thiol-dependent components of the antioxidant defense of cells.

**Keywords:** alcohol, alcoholism, ethanol, glutathione, antioxidants, glutathione peroxidase, glutathione reductase, alcohol withdrawal syndrome, alcohol withdrawal

В сформировавшемся и постоянно пополняемом реестре «болезней свободных радикалов» имеются указания на то, что биотрансформация различных веществ чужеродной природы (ксенобиотиков), обладающих токсическим воздействием на клетки организма, происходит с активной генерацией свободнорадикальных субстанций [10]. В тоже время данные литературы свидетельствуют о возникновении состояния окислительного стресса при избыточном поступлении продуктов питания в организм [2], а также о сопряженности дисбаланса в системе «прооксиданты-антиоксиданты» с увеличением концентрации различных нормальных, естественных ме-

таболитов в биологических жидкостях и тканях, например: глюкозы крови при сахарном диабете [5], мочевой кислоты при хронической сердечной недостаточности [7], мочевины при моделировании ее влияния на метаболизм при хронической почечной недостаточности [8], этанола при алкогольной интоксикации и алкогольной зависимости [3].

Высокая медико-социальная значимость уровня алкоголизации населения создает необходимость учета всех аспектов развития алкогольной болезни, основным из которых рассматривается биологический аспект. Грубое вмешательство экзогенного этанола в метаболические процессы определяет по-

иск направлений коррекции многочисленных нарушений обменных процессов.

Важной точкой приложения влияния лекарственных препаратов является функционирование антиоксидантной системы клеток, поражение которой показано при хроническом повреждении гепатоцитов [9], в том числе алкоголь-индуцированных [4]. Оценка синтетических препаратов антиоксидантного действия сохраняется значимой [6].

В связи с этим, целью настоящего исследования была оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на уровень восстановленного глутатиона и активность ферментов его обмена при моделировании состояния алкогольной зависимости.

Задачи исследования:

1. Выяснить содержание восстановленного глутатиона в ткани печени лабораторных животных в условиях отмены этанола на фоне воздействия этилметилгидроксипиридина сукцината;

2. Оценить активность глутатионпероксидазы в гомогенатах печени при моделировании алкогольного абстинентного синдрома на фоне применения препарата с действующим веществом – этилметилгидроксипиридин сукцинат;

3. Исследовать ферментативную активность глутатионредуктазы в печеночной ткани алкоголизированных животных с использованием в эксперименте производного этилметилгидроксипиридина.

### Материалы и методы исследования

В эксперименте использовали беспородных 105 крыс-самцов массой 180–220 г. Для формирования нарушений обменных процессов, аналогичных при алкогольном абстинентном синдроме, применяли модель экспериментального алкоголизма, разработанную Абдрашитовым А.Х. и соавт. (1987). Согласно этой модели, которая позволяет смоделировать нарушения обмена веществ у крыс независимо от фактора предпочтения алкоголя, учитываемом исследователями [1], животным интрагастрально вводили 25% раствор этанола в дозе 8 г/кг в сутки в течение 4 дней и 4 г/кг/сут на 5 сутки. Животные подвергались декапитации под эфирным наркозом через 1 (группа А1), 2 (группа А2), 3 (группа А3) суток после заключительного введения алкоголя. Животным контрольной группы проводилось интрагастральное, эквивалентное введение воды.

Для оценки влияния этилметилгидроксипиридина (препарат «Мексидол», раствор для внутримышечного и внутривенного введения, в ампулах по 2 мл) на показатели антиоксидантной защиты в период реакции отмены этанола были сформированы 3 группы животных, которым внутримышечно вводили «Мексидол» 50 мг/сут в период развития реакции отмены этанола. Выведение животных из эксперимента и измерение показателей проводилось через 1 (группа А1+М), 2 (группа А2+М) и 3 (группа А3+М) суток после последнего введения алкоголя.

Определение уровня восстановленного глутатиона и активности ферментов антиоксидантной системы проводили в гомогенатах печени, для приготовления которых вскрывали брюшную полость, печень перфузировали охлажденным 0,14 М раствором хлорида натрия. После взвешивания ткань гомогенизировали в гомогенизаторе в течение 40 с, используя сахарозную среду выделения, которая содержала 0,25 М сахарозы, 0,001 М ЭДТА (рН 7,4) [38]. Затем гомогенаты центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. при температуре ниже 4°C. Надосадочная жидкость использовалась для определения показателей содержания восстановленного глутатиона, активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы

Содержание восстановленного глутатиона в гомогенатах печени определяли по реакции с 5, 5/- дитиобис -2 нитробензойной кислотой методом Sedlak J. et al. (1968) после осаждения белка 0,56 М HClO<sub>4</sub>. К 1,0 мл безбелкового экстракта добавляли 2,0 мл 0,4 М Трис-буфера и 0,05 мл 5, 5/- дитиобис -2 нитробензойной кислоты. Изменение оптической плотности регистрировали при длине волны 412 нм после 5-ти минутной инкубации против пробы, содержащей 0,5 мл среды выделения, 0,5 мл 0,56 М HClO<sub>4</sub>, 2,0 мл 0,4 М Трис-буфера и 0,05 мл 5, 5/- дитиобис -2 нитробензойной кислоты.

Определение активности глутатионредуктазы (ГР; КФ 1.6.4.2) по методу Carlberg I. (1985) основано на измерении скорости окисления НАДФН, которая регистрируется спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм.

В кювету с расстоянием между рабочими гранями 1 см последовательно вносили 2,7 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,0), 0,1 мл 0,1 мМ раствора НАДФН, 0,1 мл гомогената. Реакцию запускали добавлением в реакционную пробу 0,1 мл 0,5 мМ раствора окисленного глутатиона. Смесь перемешивали. Изменение оптической плотности регистрировали через 1 минуту в течение 3 минут против пробы, содержащей все компоненты, кроме окисленного глутатиона и раствора НАДФН. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на г белка и в мкмоль/мин на г ткани.

Активность глутатионпероксидазы (ГП; КФ 1.11.1.9) определяли по методу D.E. Paglia et al. (1967) в модификации Д.В. Черданцева (2002). Мерой активности глутатионпероксидазы является скорость окисления восстановленного глутатиона в присутствии пероксида водорода. Концентрацию восстановленного глутатиона до и после инкубации определяют колориметрически. В основе развития цветной лежит взаимодействие SH-групп восстановленного глутатиона с 5,5/-дитио(бис)-нитробензойной кислотой (ДТНБК) с образованием окрашенного продукта-тионитрофильного аниона. Количество последнего прямо пропорционально количеству SH-групп восстановленного глутатиона, прореагировавших с ДТНБК. 0,2 мл гомогената преинкубируют с 0,73 мл 4,8 мМ раствора групп восстановленного глутатиона в течение 10 минут при 37°C. Реакцию иницировали добавлением 0,07 мл 0,14% раствора третбутила гидропероксида и инкубировали 5 минут. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл холодной ТХУ. В контрольные пробы третбутил гидропероксид вносили после осаждения белков. Осажденные белки удаляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант использовали для определения количества восстановленного глутатиона. К 0,1 мл суперна-

танта добавляли 2,85 мл 0,1М трис-НСI-буфера (рН 8,5) и 0,05 мл реактива Элмана. Через 5 минут пробы спектрофотометрировали при 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против дистиллированной воды. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на мг белка.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью компьютерной программы AnalystSoft Inc., Statplus, версия 5. В качестве основных характеристик описательной статистики применяли медиану (Me), нижний 25-й (L) и верхний 75-й (H) квантили (Me; L; H). Оценку статистической значимости различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (U).

### Результаты исследования и их обсуждение

При анализе полученных данных обнаружено снижение в печени в 2,3 раза ( $pU < 0,05$ ) уровня восстановленного глутатиона и составило 2,3 (1,6; 2,6) мкмоль/г белка на 1 сутки синдрома отмены этанола по сравнению с контролем. При оценке активности в этот период глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы статистически значимых различий выявлено не было.

Активность глутатионредуктазы в группе А2 определена на уровне 56,7 (48,3; 60,9) мкмоль/г ткани, что ниже на 17% ( $pU < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Несмотря на это уровень глутатиона в этот срок соответствует значениям группы интактных животных ( $pU > 0,05$ ). Глутатионпероксидазная активность повышена в данной группе животных на 32% ( $pU < 0,01$ ) по отношению к группе контроля и составляет 19,0 (16,8; 20,6) мкмоль/мин/мг белка.

На 3 сутки реакции отмены этанола наблюдается уменьшение концентрации глутатиона на 18% ( $pU < 0,05$ ) по отношению к значениям контрольной группы. Отличий в активности глутатионредуктазы от значений группы интактных животных не наблюдается ( $pU > 0,05$ ). Глутатион-зависимое восстановление пероксида водорода и различных органических гидропероксидов осуществляется селенсодержащим ферментом – глутатионпероксидазой – активность которого повышена в данной группе животных на 15% ( $pU < 0,05$ ).

Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на уровень восстановленного глутатиона в 1 сутки реакции отмены этанола выявила, что концентрация этого тиола остается сниженной (на 22%,  $pU < 0,05$ ) по отношению к контролю, хотя выраженность данного снижения по сравнению с группой А1 уменьшается примерно в 2 раза. Данные события происходят, несмотря на значительное (на 30%,  $pU < 0,01$ ) увеличение использования восстановленного глутатиона в ходе глутатионперокси-

дазной реакции. Статистически значимых изменений со стороны глутатионредуктазы не выявлено.

В следующий срок оценки показателей глутатионовой антирадикальной системы (2 сутки отмены этанола) в условиях применения Мексидола содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионредуктазы в гомогенатах ткани печени достигает значений контрольной группы и сохраняется высокой глутатионпероксидазная активность (увеличена в 1,1 раза,  $pU < 0,01$  по отношению к контролю).

Данные изменения, вероятно, приводят к тому, что значения определяемых показателей на 3 сутки реакции отмены этанола не отличаются от результатов в группе контроля.

### Выводы

Важную роль в антирадикальной защите играют низкомолекулярные тиолы – цистеин, метионин, эрготионеин и, особенно, восстановленный глутатион. Основным местом синтеза глутатиона и метаболизма этилового спирта является печень. Дефицит антиоксидантов в печени может быть связан с недостатком восстановленного глутатиона.

Недостаток восстановленного глутатиона обусловлен его использованием глутатионпероксидазой, а также с низкой активностью глутатионредуктазы. Полученные данные свидетельствуют о том, что неэффективность антиокислительной защиты в период развития отмены этанола связана в первую очередь с нарушением обмена глутатиона.

Это обстоятельство побудило нас исследовать возможность коррекции выявленных нарушений, что может быть достигнуто назначением препаратов, обладающих антиоксидантным действием.

Содержание восстановленного глутатиона в гомогенатах печени при использовании Мексидола оставалось сниженным, однако степень этого уменьшения была значительно ниже, чем у животных, не получавших препарат. Влияние Мексидола на активность ферментов обмена глутатиона выражается в предупреждение угнетения активности глутатионредуктазы и в соответствии активности всех ферментов значениям контрольной группы на 3 сутки синдрома отмены этанола.

Таким образом, увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов при состоянии отмены этанола у экспериментальных животных в основном может быть обусловлено нарушением обмена глутатиона, которое выражается в уменьшении его

внутриклеточной концентрации, а также в изменении активности ферментов глутатионовой системы. Положительные эффекты препарата «Мексидол» подтверждают наши предположения о важной роли нарушений обмена глутатиона при алкогольной абстиненции.

#### Список литературы

1. Ахмадеев А.В. Структурно-количественная характеристика миндалевидного комплекса крыс предпочитающих и не предпочитающих алкоголь крыс / А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – №3. – С. 9.
2. Борисенков М.Ф. Роль питания в профилактике возрастных заболеваний / М.Ф. Борисенков, А.А. Лапин / Булгарские сообщения. – 2010. – Т. 19. – №3. – С. 42–53.
3. Ефременко Е.С. Модификация обмена глутатиона при алкогольной абстиненции / Е.С. Ефременко, В.Е. Высокотский, Г.А. Лопухов // Астраханский медицинский журнал. – 2012. – Т. 7. – №2. – С. 184–186.
4. Ефременко Е.С. Свободнорадикальное окисление при развитии алкогольной абстиненции: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Челябинск, 2006. – 23 с.
5. Жукова О.Ю. Активность гаммаглутамилтрансферазы в ткани печени при аллоксановом сахарном диабете // Омский научный вестник. – 2015. – №. 144. – С. 89–91.
6. Кольтовер В.К. Антиоксидантная биомедицина: от химии свободных радикалов к системно-биологическим механизмам // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2010. – № 1. – С. 37–43.
7. Ларина В.Н. Гиперурикемия при хронической сердечной недостаточности / В.Н. Ларина, Б.Я. Барт, М.С. Бродский // Кардиология. – 2011. – Т.51. – №3. – С. 68–73.
8. Осиков М.В. Влияние мочевины на функциональное состояние клеток крови и эндотелия / М.В. Осиков., Л.В. Кривожижина // Человек. Спорт. Медицина. – 2005. – №. 4 (44). – С. 277–279.
9. Романцов М.Г. Патогенетическая коррекция метаболических нарушений при хроническом поражении печени // Антибиотики и химиотерапия. – 2012. – Т.57. – №11–12. – С. 33–41.
10. Свободнорадикальное окисление и старение / В.Х. Хавинсон [и др.]. – СПб: Наука, 2003. – 327 с.