

согласны с тем, что основной причиной данного заболевания является избыток кадмия в окружающей среде. К основным симптомам его проявления 38,8% отнесли хрупкость костей; 36,7% – поражения почек с последующим развитием почечной недостаточности; 32,7% – ощущение сильных суставных/мышечных болей – 36,7%.

Вывод. Население недостаточно хорошо владеет информацией, касающейся источников кадмия в окружающей среде, так и механизмов его воздействия на организм, что может негативно отразиться на его здоровье.

Литература

1. Вы точно знаете, чем опасен кадмий? [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.inmoment.ru/beauty/health-body/cadmium.html>. – Дата доступа: 13.02.2021.
2. Кадмий в организме человека [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://leathear.ru/kadmii-vliyanie-na-organizm-cheloveka-vliyanie-kadmiya-na-organizm-cheloveka.html>. – Дата доступа: 13.02.2021.
3. Вред кадмия на организм человека [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docgid.ru/prevention/vred-kadmiya-na-organizm-cheloveka-vliyanie-kadmiya-na-organizm/>. – Дата доступа: 13.02.2021.
4. Основные источники поступления кадмия в окружающую среду [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://eco.bobrodobro.ru/6464>. – Дата доступа: 13.02.2021.

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМБИНАЦИИ СУКЦИНАТА НАТРИЯ, N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА И РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

Каспер Е.В., Богдевич Е.В., Шляхтун А.Г.

Отраслевая лаборатория биологически активных веществ
ГП «Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси», Гродно

Научный руководитель – заведующий лабораторией, Шляхтун А.Г.

Актуальность. Алкогольная интоксикация наносит значительный ущерб здоровью и ассоциируется с более чем с несколькими сотнями различных заболеваний. По данным ВОЗ, 5,3% смертей в мире напрямую связаны с алкоголем. Среди сопутствующих заболеваний,

напрямую связанных со злоупотреблением алкоголем, сердечно-сосудистые заболевания (19%), рак, инфекционные заболевания, сахарный диабет, другие болезни желудочно-кишечного тракта (21%). Наиболее выраженный урон алкоголь наносит печени – органу, где метаболизируется до 95% принимаемого алкоголя.

Одним из важнейших механизмов повреждающего действия этанола на гепатоциты является активация свободнорадикальных реакций в результате повышенной генерации активных форм кислорода и α -гидроксиэтильных радикалов при метаболизме этанола. Этанол и ацетальдегид, а также свободнорадикальные продукты, образующиеся при их метаболизме, истощающе действуют на компоненты антиоксидантной системы, что сопровождается повреждением мембран и гибелью гепатоцитов.

Разработка гепатопротекторных средств для коррекции алкоголь-ассоциированных патологий печени является важной проблемой современной фармации. Имеющиеся в арсенале медицины средства не обеспечивают должной защиты печени у больных, страдающих алкогольной зависимостью. Учитывая значительную роль свободнорадикальных процессов в патогенезе алкоголь-ассоциированных болезней печени, актуальным является целенаправленный поиск гепатопротекторов среди соединений, обладающих антиоксидантными свойствами. Принимая во внимание разноплановость токсического действия этанола, предложено комплексное гепатопротекторное средство метаболического действия на основе сукцината натрия, N-ацетил-L-цистеина и ресвератрола.

Янтарная кислота и ее соли хорошо изучены при различных патологических состояниях. Отмечены антигипоксические и антиоксидантные свойства этих соединений. После открытия специфически активируемых рецепторов к сукцинату – GPR91, интерес к ее использованию значительно возрос. Концентрация сукцината, при которой происходит активация GPR91 человека, составляет от 28 ± 5 до 56 ± 8 мкмоль/л. Таким образом, в нормальных физиологических условиях уровень сукцината в крови (2–20 мкмоль/л) недостаточен для выраженной активации GPR91. Экзогенно вводимый сукцинат способствует активации GPR91, проявляя тем самым защитные, антигипоксические свойства [1].

Так как, основным токсикантом при алкогольной интоксикации является ацетальдегид, токсичность которого значительно выше токсичности этанола, целесообразно включение в состав гепатопротектора скэвенджеров ацетальдегида. В качестве кандидата на эту роль

использован N-ацетил-L-цистеин, который известен своими скэвенджерными свойствами в отношении активных форм кислорода и азота, а также ацетальдегида [2].

Учитывая повышение уровня провоспалительных цитокинов после употребления алкоголя в большой дозе, потенциально полезно использование средств, снижающих их уровень. Согласно данным литературы ресвератрол и ацетилцистеин способны снижать уровни провоспалительных цитокинов при алкогольной интоксикации и в сыворотке крови при алкогольной интоксикации.

Целью работы стало исследование гепатопротекторного действия комбинации сукцината натрия, ацетилцистеина и ресвератрола при моделировании выраженной алкогольной интоксикации у крыс.

Материалы и методы исследования. В работе использовали реактивы и растворители квалификации не ниже «хч». Буферные растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной на системе деионизации воды Hydrolab Ultra (Польша). Для алкоголизации крыс использовали спирт-ректификат марки «Люкс», который разводили очищенной питьевой водой до необходимых концентраций перед использованием в эксперименте. Спектрофотометрирование проб при биохимических исследованиях сыворотки крови и тканей печени крыс проводилось при помощи планшетных спектрофотометров BMG Spectrostar Nano (Германия) и Thermo Scientific Multiscan Sky (США). Измерения проводились в лунках стандартных 96-луночных планшетов в 2 повторностях.

Исследования проводили на крысах самцах линии Wistar. Возраст животных на начало эксперимента – 2,0-2,5 месяца, масса 180-200 г. Разброс по исходной массе в экспериментальных группах не превышал $\pm 10\%$. Животные были разделены по 15 особей на 3 группы – контрольную, группу «Алкогольная интоксикация» и группу «Алкогольная интоксикация + Препарат».

Алкогольную интоксикацию у крыс вызывали по методу Majchrowicz [3] в нашей модификации. Животные получали 30% раствор этанола внутривенно в дозах до 12 г/кг/сут, дважды в день (в 8:00 и 20:00), на протяжении 5 суток. На протяжении первых суток раствор этанола вводили в фиксированной дозе 5,0 г/кг. В последующие четверо суток этанол вводили в максимально переносимых дозах, которые подбирались индивидуально для каждого животного: 6 г/кг – в случае, если отсутствовали признаки интоксикации, сохранялась высокая ригидность мышц спины; 5 г/кг – если наблюдалось снижение ригидности мышц спины и хвоста; 4 г/кг – при наличии слабовыраженной

атаксии; 3 г/кг – при атаксии средней степени выраженности; 2 г/кг – при высокой степени атаксии; 1 г/кг – если животное не могло сохранить позу. В случае, когда животное находилось в боковом положении, этанол не вводился.

С 3-го дня и до конца эксперимента, на фоне алкогольной интоксикации, крысам внутрижелудочно вводили препарат, представляющий водный раствор сукцината натрия, ацетилцистеина, ресвератрола, в дозах 37,5 мг/кг, 15 мг/кг и 11,5 мг/кг соответственно, и вспомогательных компонентов. Животные контрольной группы получали эквивалентные количества воды.

По завершению эксперимента животные были эвтаназированы путем декапитации, кровь собирали в стеклянные пробирки, образцы тканей печени выделяли на лед. Ткани немедленно замораживали в жидком азоте.

В сыворотке крови животных определяли активности ряда маркерных ферментов – щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, аспартат- и аланинаминотрансфераз, при помощи диагностических наборов («АнализМед», Беларусь). Измерения проводили согласно инструкциям производителя. Активности выражены в Ед/л сыворотки.

Для оценки интенсивности перекисного окисления липидов в гомогенатах определяли количества продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [4]. Содержание ТБКРС выражали в нмоль/г ткани. Для оценки состояния антиоксидантной системы измеряли содержание низкомолекулярных тиолов (НМТ), в основном представленных восстановленным глутатионом, с использованием реактива Элмана [5], активностей ферментов антиоксидантной защиты – глутатионредуктазы (ГР) [6], глутатион-S-трансферазы (GST) [7] и глутатионпероксидазы (ГПО) [8]. Активности ГР выражали в нмоль НАДН/мин /мг белка, GST – в мкМ ХДНБ/мин/мг белка, ГПО – в мкМ GSH/мин/мг белка, содержание НМТ – в нмоль GSH/мг белка.

Содержание белка в гомогенатах тканей определяли по методу Bradford [9]. Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы бычьего сывороточного альбумина.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием приложения GraphPad Prism v.8.0. Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для выявления статистической значимости отличий между экспериментальными группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA) и тест средневзвешенного Тьюки. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки

не превышала 5% ($p < 0,05$). Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое в выборочной совокупности, m – стандартная ошибка среднего.

Результаты и их обсуждение. Известно, что при длительной или массивной алкогольной интоксикации развивается гиперферментемия, обусловленная гепатолизом и попаданием ферментов гепатоцитов в кровь. К числу маркерных ферментов алкогольного поражения печени относятся аспартат- (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), γ -глутамилтранспептидаза (ГГТП). Установлено, что в сыворотке крови крыс, получавших алкоголь, статистически значимо увеличивались активности маркеров цитолиза гепатоцитов АлАТ ($54,71 \pm 1,61^*$ vs. $31,44 \pm 1,81$, $p < 0,01$), АсАТ ($72,18 \pm 1,52^*$ vs. $59,56 \pm 1,18$, $p < 0,01$) и ЩФ ($59,41 \pm 1,32^*$ vs. $49,64 \pm 1,36$, $p < 0,01$) соответственно на 74%, 21,2% и 19,7% выше по сравнению с контрольной группой. Увеличение активностей АсАТ в крови животных косвенно может свидетельствовать о кардиотоксическом действии этанола. Активности ГГТП в сыворотке крови ($5,03 \pm 0,50$ vs. $5,23 \pm 0,53$), которые в большей мере указывают на поражение билиарной системы, у животных в ходе проведения эксперимента изменялась незначительно.

Показано, что активности АлАТ ($32,76 \pm 1,17$ vs. $31,44 \pm 1,81$), АсАТ ($55,84 \pm 1,8$ vs. $59,56 \pm 1,18$), ГГТП ($5,00 \pm 0,46$ vs. $5,23 \pm 0,53$) и ЩФ ($50,39 \pm 1,18$) в группе алкоголизированных животных, получавших комбинацию сукцинат + АЦЦ + ресвератрол, и в контрольной группе животных статистически значимо не отличались.

Исследование показателей антиоксидантной системы печени показало, что в группе «Алкогольная интоксикация», наблюдалось снижение уровней НМТ на 20,0% ($4,79 \pm 0,40^*$ vs. $5,99 \pm 0,35$, $p < 0,05$) и активностей практически всех ферментов антиоксидантной системы – ГР (-22,5%), GST (-13,7%), ГПО (-16,4% по сравнению с контрольной группой), что может быть связано с инактивацией ферментов, вызванной избыточной нагрузкой АФК и продуктом метаболизма этанола – ацетальдегидом (таблица 2). В группах животных, получавших состав активности ГР, GST, ГПО и каталазы находились в пределах контрольных величин.

Исследование показателей пероксидации липидов в печени алкоголизированных животных в группе «Алкогольная интоксикация», выявило увеличение концентрации ТБКРС ($32,56 \pm 1,59^*$ vs. $27,58 \pm 1,04$, $p < 0,05$) на 18,1% по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об усилении нагрузки активных форм кислорода и протекании процессов перекисного окисления липидов.

В группах животных, получавших разработанную комбинацию сукцинат + АЦЦ + ресвератрол, содержание НМТ ($5,59 \pm 0,67$ vs. $5,99 \pm 0,35$) находилось в пределах контрольных значений. Уровни ТБКРС в печени животных, получавших комбинацию сукцинат + АЦЦ + ресвератрол, незначительно отличались от контрольных значений и были ниже, чем в контрольной группе ($23,25 \pm 0,90$ vs. $27,58 \pm 1,04$).

Выводы. Показано, что в условиях эксперимента алкогольная интоксикация сопровождалась значительным повышением уровней сывороточных трансаминаз, что свидетельствует о поражении клеток печени. В ткани печени нарушался про/антиоксидантный баланс в сторону прооксидантного, что нашло свое отражение в снижении уровней низкомолекулярных тиолов и активностей ферментов антиоксидантной системы – ГР, GST и ГПО, а также увеличении концентраций ТБКРС (МДА и 4-ГНА). Введение животным на фоне алкогольной интоксикации разработанной комбинации на основе сукцината натрия, ацетилцистеина и ресвератрола предотвращало снижение активностей ферментов антиоксидантной системы, нормализовало содержание низкомолекулярных тиолов и снижало наработку ТБКРС в ткани печени.

Литература

1. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors / W. He [et al.]. – Nature. – 2004. – Vol. 429. – P. 188–193.
2. Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol-induced adverse effects in rats / F. R. F. Seiva [et al.]. – Alcohol. – 2009. – Vol. 43, № 2. – P. 127–135.
3. Majchrowicz, E. Reversal in central nervous system function during ethanol withdrawal in humans and experimental animals. – Fed. Proc. – 1981. – Vol. 40, № 7. – P. 2065–2072.
4. Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury / D. R. Janero. – Free Radic Biol Med. – 1990. – Vol. 9, № 6. – P. 515–540.
5. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman. – Arch. Biochem. Biophys. – Vol. 82, № 1. – P. 70–77.
6. Carlberg, I. Glutathione reductase / I. Carlberg, B. Mannervik. – Methods Enzymol. – 1985. – Vol. 13. – P. 484–490.
7. Habig, W. J. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. J. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jacoby. – J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249. – P. 7130–7139.
8. Paglia, D. E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D. E. Paglia, W. N. Valentine. – J Lab Clin Med. – 1967. – Vol. 70, № 1. – P. 158–169.
9. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford. – Anal Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.