

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМБИНАЦИИ СУКЦИНАТА НАТРИЯ, N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА И РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ 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 (АИ) наносит значительный ущерб здоровью населения большинства стран мира. Известно, что чрезмерное употребление этанола приводит к интоксикации головного мозга, приводя к двигательным и поведенческим изменениям и, при тяжелом алкогольном отравлении, к смерти в результате депрессивного воздействия на ЦНС [1]. Этанол вызывает нарушения в нейронных цепях, включая префронтальную кору, которая контролирует поведение [2], мозжечок, который регулирует движение и координацию, лобную долю, которая контролирует эмоции, ретикулярную формацию, определяющая цикл сна-бодрствования, гиппокамп, который опосредует обучение и память, и продолговатый мозг, который контролирует жизненные функции [3]. На клеточном уровне этанол нарушает передачу сигналов нейротрансмиттеров [4], увеличивает выработку активных форм кислорода (АФК) и инициирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [5], нарушает процессы митохондриального дыхания и снижает выработку АТФ [6], а также инициирует процессы нейровоспаления [7].

Принимая во внимание разноплановость токсического действия этанола, предложено комплексное протекторное средство метаболического действия на основе сукцината натрия, N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ) и ресвератрола.

Янтарная кислота введена в состав для обеспечения антигипоксического и антиоксидантного действия. Известно, что внеклеточные эффекты сукцината обеспечиваются через специфически активируемые рецепторы – GPR91. Экспрессия GPR91 в условиях гипоксии максимально выражена в коре головного мозга по сравнению с другими тканями, что подтверждает высокую важность этого сигнального пути для функционирования мозга. Специфическая для коры головного мозга быстрая экспрессия GPR91 (увеличение концентрации белка

GPR91 в течение 15–30 мин) во время гипоксии сопровождается увеличением активности синтеза сукцината из ГАМК [8]. Экзогенно вводимый сукцинат способствует активации GPR91, проявляя тем самым защитные, антигипоксические свойства [9]. В состав комплекса введен АЦЦ, который известен своими скэвенджерными свойствами в отношении активных форм кислорода и азота, а также ацетальдегида [10]. В ряде работ рассматривается связь между тяжестью АИ и митохондриальной дисфункцией в тканях головного мозга. Митохондрии регулируют выработку АТФ, окислительно-восстановительный баланс и гомеостаз кальция в нейроне. Наибольшим источником продукции АФК, в основном супероксида, считается дыхательная цепь митохондрий клеток мозга [11]. В качестве митопротектора в состав комплекса введен ресвератрол [12].

Целью работы стало исследование нейропротекторного действия комбинации сукцината натрия, АЦЦ и ресвератрола при моделировании тяжелой 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 моделирования АИ 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 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, возрастом 2,0–2,5 месяца, с массой на начало эксперимента 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 [13] в нашей модификации. Животные получали 30% раствор этанола внутрижелудочно 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 дня и до конца эксперимента, на фоне алкогольной интоксикации, крысам внутрижелудочно вводили препарат, представляющий водный раствор сукцината натрия, АЦЦ и 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. Образцы тканей больших полушарий головного мозга выделяли на льду. Ткани замораживали в жидком азоте.

Для оценки интенсивности ПОЛ в гомогенатах (1:10, ФСБ+10 мМ Трис, рН 7,4) определяли количества продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [14]. Содержание ТБК-реагирующих соединений (ТБКРС) выражали в нмоль/г ткани. Для оценки состояния антиоксидантной системы измеряли содержание низкомолекулярных тиолов (НМТ) с использованием реактива Элмана [15], активностей ферментов антиоксидантной защиты – глутатионредуктазы (ГР) [16], глутатион-S-трансферазы (GST) [17] и глутатионпероксидазы (ГПО) [18]. Активности ГР выражали в нмоль НАДФН/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 [19]. Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы бычьего сывороточного альбумина.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием приложения GraphPad Prism v. 8.0. Для выявления статистической значимости отличий между экспериментальными группами использовали дисперсионный анализ 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. Для оценки процессов ПОЛ исследовано содержание ТБКРС в ткани больших полушарий головного

мозга крыс при моделировании тяжелой АИ. Показано, что уровень ТБКРС в ткани больших полушарий в группе АИ повышался на 30% ($0,39 \pm 0,03^*$ vs. $0,30 \pm 0,02$, $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе). Введение животным комплекса сукцината, АЦЦ и ресвератрола на фоне алкоголизации предотвращало развитие ПОЛ в ткани больших полушарий головного мозга крыс – содержание ТБКРС оставалось на уровне контрольных значений ($0,29 \pm 0,03$ vs. $0,30 \pm 0,02$).

Токсическое действие АФК ограничивается функционированием систем антиоксидантной защиты. Известно, что в условиях АИ, что антиоксидантно-прооксидантный баланс в ткани больших полушарий головного мозга крыс сдвигается в сторону прооксидантного [20].

Для оценки влияния разработанного комплекса на основе сукцината, АЦЦ и ресвератрола на показатели антиоксидантной системы нами исследованы активности ГР, ГПО, GST и содержание НМТ в ткани больших полушарий.

Показано, что в условиях АИ уровень НМТ в ткани больших полушарий снижался на 31,8% по сравнению с контрольной группой животных ($3,37 \pm 0,14^*$ vs. $4,94 \pm 0,14$, $p < 0,05$). Также наблюдалось снижение активностей ГР ($41,7 \pm 3,8^*$ vs. $54,7 \pm 3,0$) и GST ($57,3 \pm 2,6^*$ vs. $69,8 \pm 3,4$, $p < 0,05$), соответственно на 23,8% и 17,9%, и напротив – увеличение активности ГПО ($146,3 \pm 8,8^*$ vs. $108,9 \pm 6,7$, $p < 0,05$) на 34,3%.

Введение животным разработанного комплекса сукцината, АЦЦ и ресвератрола нормализовало содержание НМТ ($5,06 \pm 0,20$ vs. $4,94 \pm 0,14$), повышало активности ГР ($57,3 \pm 3,2$ vs. $54,7 \pm 3,0$) и GST ($65,3 \pm 3,4$ vs. $69,8 \pm 3,4$), а также предотвращало повышение активности ГПО ($123,1 \pm 7,7$ vs. $108,9 \pm 6,7$) в ткани больших полушарий крыс при АИ.

Выводы. Таким образом, при АИ в ткани больших полушарий головного мозга крыс наблюдалось существенное усиление выработки АФК, проявляющееся в статистически значимом увеличении концентраций конечных продуктов ПОЛ в ткани. В группе АИ значительно повышался уровень ТБКРС в ткани больших полушарий, снижался уровень НМТ и ряда активностей ферментов антиоксидантной защиты. 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 уровни ТБКРС в ткани больших полушарий головного мозга.

Литература

1. Mukherjee, S. Alcoholism and its effects on the central nervous system / S. Mukherjee. – Current Neurovascular Research. – 2013. – Vol. 10. – P. 256–262.

2. Abernathy, K. Alcohol and the prefrontal cortex / K. Abernathy, L. J. Chandler, J. J. Woodward. – *Int Rev Neurobiol.* – 2010. – Vol. 91. – P. 289–320.
3. Oscar-Berman, M. Alcohol: Effects on neurobehavioral functions and the brain / M. Oscar-Berman, K. Marinkovic. – *Neuropsych Rev.* – 2007. – Vol. 17. – P. 239–257.
4. McCool, B. A. Ethanol modulation of synaptic plasticity / B. A. McCool. – *Neuropharmacology.* – 2011. – Vol. 61. – P. 1097–1108.
5. Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage / E. Albano. – *PNAS.* – 2006. – Vol. 65. – P. 278–290.
6. Alterations of motor performance and brain cortex mitochondrial function during ethanol hangover / J. Bustamante [et al.]. – *Alcohol.* – 2011. – Vol. 46. – P. 473–479.
7. Brain atrophy in alcoholics: Relationship with alcohol intake; liver disease; nutritional status, and inflammation / E. Garcia-Valdecasas-Campelo [et al.]. – *Alcohol and Alcoholism.* – 2007. – Vol. 42. – P. 533–538.
8. Lukyanova, L. D. Specific features of immediate expression of succinate-dependent receptor GPR91 in tissues during hypoxia / L. D. Lukyanova, Yu. I. Kirova, E. L. Germanova. – *Bull Exp Biol Med.* – 2016. – Vol. 160, № 6. – P. 742–747.
9. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors / W. He [et al.]. – *Nature.* – 2004. – Vol. 429. – P. 188–193.
10. 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.
11. Alcohol hangover induces mitochondrial dysfunction and free radical production in mouse cerebellum / A. G. Karadayian [et al.]. – *Neuroscience.* – 2015. – Vol. 304. – P. 47–59.
12. Neuroprotective polyphenols: a modulatory action on neurotransmitter pathways / E. Rebas [et al.]. – *Curr Neuropharmacol.* – 2020. – Vol. 18, Iss. 5 – P. 431–445.
13. 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.
14. 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.
15. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman. – *Arch. Biochem. Biophys.* – Vol. 82, № 1. – P. 70–77.
16. Carlberg, I. Glutathione reductase / I. Carlberg, B. Mannervik. – *Methods Enzymol.* – 1985. – Vol. 13. – P. 484–490.
17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. Free radical production and antioxidant status in brain cortex non-synaptic mitochondria and synaptosomes at alcohol hangover onset / A. G. Karadayian [et al.]. – Free Radical Biology & Medicine. – 2017. – Vol. 108. – P. 692–703.

ИЗУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ДАННЫХ О ПОТРЕБЛЕНИИ ОЗОНОРАЗРУШАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Качко Н.В.

студент 2 курса лечебного факультета

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Научный руководитель – доцент кафедры лучевой диагностики
и лучевой терапии, к.б.н., доцент Зиматкина Т.И.

Актуальность. В настоящее время разрушение озонового слоя представляет собой одну из важнейших экологических проблем. Озоносфера – это слой атмосферного озона, расположенный в стратосфере с наибольшим содержанием озона (вещества, состоящего из трех атомов молекулярного кислорода), который образуется в результате воздействия ультрафиолетового излучения на кислород. Толщина слоя составляет 3-4 мм, максимальные его значения располагаются на полюсах, а минимальные находятся в области экватора [1]. Наивысшая концентрация газа обнаруживается в стратосфере над Арктикой.

К основным функциям озоносферы относятся нейтрализация углекислого газа, поддержание оптимального температурного режима, удержание кислорода, а также отражение и поглощение ультрафиолетового излучения.

Ученые проводили научные исследования на протяжении многих лет и выяснили, что после каждого естественного снижения уровня следует его регенерация. Однако с 1970-х гг. научные данные свидетельствуют о том, что озоносфера разрушается быстрее, чем происходит его восстановление.