

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРА АЛКОГОЛЬДЕ-
ГИДРОГЕНАЗЫ – АМИДА ИЗОВАЛЕРИАНОВОЙ КИСЛОТЫ И СТАНДАРТНОЙ
АНТИДОТНОЙ ТЕРАПИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ОТСТАВЛЕННЫХ ПОСЛЕД-
СТВИЙ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ**

М.М. Любишин, К.В. Сивак, Т.Н. Саватеева-Любимова

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт Токси-
кологии» Федерального медико-биологического агентства России*

192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева 1

Тел. (812) 567-91-66

Резюме: В экспериментах на крысах самцах показано, что применение на фоне отрав-
ления этиленгликолем (ЭГ) неконкурентного ингибитора алкогольдегидрогеназы – амида
изовалериановой кислоты (АИК) – значимо повышало выживаемость экспериментальных
животных, по сравнению со стандартной антидотной терапией. Препарат обеспечивал
нормализацию функций мочевыделительной системы, частично предотвращал развитие у
выживших крыс нарушений неспецифической резистентности, клеточного и гуморально-
го звеньев иммунитета. Полученные данные продемонстрировали необходимость даль-
нейшего изучения механизмов токсического действия ЭГ, а также поиска способов фарма-
кологической коррекции отсроченных последствий острого отравления.

Ключевые слова: острое отравление этиленгликолем, антидотная терапия, этанол,
амид изовалериановой кислоты, ацидоз, гипоксия, иммунная система, мочевыделительная
система.

**A COMPARATIVE STUDY OF THE FORMATION OF ACUTE ETHYLENE
GLYCOL POISONING DELAYED DISORDERS UNDER THE THERAPY WITH
EITHER ALCOHOL DEHYDROGENASE INHIBITOR - ISOVALERIC ACID
AMIDE OR STANDARD ANTIDOTE THERAPY**

M.M. Lyubishin, K.V. Sivak, T.N. Savateeva-Lyubimova

*Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Toxicology» Federal
Medico-Biological Agency, St. Petersburg, Russia*

Abstract. Experiments on male rats showed that the application of amide of isovaleric acid,
a noncompetitive inhibitor of alcohol dehydrogenase, against the ethylene glycol poisoning is

much more effective compared to the standard antidote therapy. Administration of isovaleric acid amide significantly improved survival in experimental animals, provided the normalization of urinary system function. However, it did not prevent completely the development of nonspecific resistance, cellular and humoral immunity violations in survived rats. These results demonstrate that further study of ethylene glycol toxicity mechanisms is required, as well as a search for the new ways of pharmacological correction for acute poisoning delayed disorders.

Key words: acute ethylene glycol poisoning, antidote therapy, ethanol, amide of isovalerian acid, acidosis, hypoxia, immune system, urinary system.

Введение. Совершенствование методов терапии острого отравления этиленгликолем (ЭГ) является одной из актуальных задач токсикологии и фармакологии. ЭГ широко применяется в быту и промышленности, а отравление этим токсикантом обычно носит групповой или массовый характер. Возникающая, наряду с поражением других органов и систем, тяжелая и малообратимая острая почечная недостаточность обуславливает высокую летальность и нередко лежит в основе формирования хронической почечной недостаточности у выживших пострадавших [2].

В настоящий момент времени в основе стандартной антидотной терапии (САТ) острых отравлений этиленгликолем лежит применение этанола [1, 11, 13]. Как известно, механизм антидотного действия этанола основан на ингибировании метаболизма этиленгликоля, так как ведущую роль в реализации токсического действия последнего играют продукты его метаболизма [1, 2, 3, 4, 5]. Этанол, обладая большим сродством к алкогольдегидрогеназе (АДГ), подвергается биотрансформации вместо этиленгликоля с образованием ацетальдегида, а в дальнейшем и уксусной кислоты. В то же время в клинических и экспериментальных исследованиях показана высокая эффективность таких перспективных антидотов, как 4-метилпиразол [14, 15, 16, 17] и амид изовалериановой кислоты (АИК) [3, 4, 5], которые блокируют активность АДГ и, следовательно, метаболизм ЭГ, но не обладают собственной токсичностью в терапевтических дозах. Основным преимуществом применения новых антидотов, по сравнению с этанолом, является практически полное предотвращение развития ацидоза, который играет одну из ведущих ролей в патогенезе интоксикации ЭГ [3, 5, 16].

Ранее нами в эксперименте было показано развитие отдаленных последствий острого отравления ЭГ, заключающихся в хронической почечной недостаточности и вторичном иммунодефицитном состоянии комбинированного типа. Стандартная антидотная терапия этанолом и натрия гидрокарбонатом способствовала снижению летальности, но не

предотвращала развитие у выживших животных отсроченных последствий отравления ЭГ, таких как прогрессирующее иммунодефицитное состояние и токсическая нефропатия [12].

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение влияния АИК и САТ, включающей этанол, на формирование отдаленных последствий острого отравления ЭГ.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 120 крысах самцах линии Wistar массой тела 200-220 г. Опыты были проведены в соответствии с правилами гуманного обращения с животными в биологических экспериментах [18]. Для моделирования острой интоксикации этиленгликоль вводили внутривентрикулярно через металлический атравматический зонд в дозе 6,6 г/кг (LD_{50}) однократно. Этанол вводили по схеме, обеспечивающей его концентрацию в крови не менее 25 ммоль/л: 2 мл/кг внутривентрикулярно в виде 30% раствора через 1, 4, 6, 12, 18 часов после перорального применения токсиканта [3, 4, 5]. Для коррекции ацидоза крысы получали 4% натрия гидрокарбонат внутривентрикулярно - 6 мл/кг 3 раза в первые сутки после интоксикации. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: интактные животные; первая опытная группа (контроль модели) – животные, получавшие вместо терапии физиологический раствор; вторая группа - животные, получавшие этанол и 4% натрия гидрокарбонат по схеме – стандартная антидотная терапия (САТ); третья группа животных получала амид изовалериановой кислоты (АИК) – неконкурентный ингибитор алкогольдегидрогеназы (АДГ), внутривентрикулярно спустя 1 час после отравления, затем через каждые 6 часов в течение первых суток в разовой дозе 250 мг/кг. В состав терапии было решено не включать раствор натрия гидрокарбоната, так как по данным литературы АИК в токсикогенную фазу отравления в значительной степени предотвращает развитие метаболического ацидоза [3, 4, 5].

Изучаемые показатели регистрировали в динамике у выживших животных на 3, 7, 14, 21-е сутки, на 6-ти крысах на каждый срок во всех экспериментальных группах. Кровь забирали путем мгновенной декапитации крыс под легким наркозом [18].

Об эффективности лечения судили по уровню летальности, клинической картине интоксикации, степени развития ацидоза, функциональному состоянию мочевыделительной и иммунной систем. Погибших в течение первых суток животных подвергали вскрытию. Степень ацидоза, нарушений углеводного обмена и гипоксии оценивали по уровню глюкозы, лактата, 3-гидроксимасляной кислоты, активности лактатдегидрогеназы в крови с помощью наборов «Ольвекс диагностикум», наборов реагентов фирмы «Randox» (Велико-

британия); функциональное состояние мочевыделительной системы - по уровню мочевины, креатинина и калия в крови с помощью наборов «Ольвекс диагностикум»; состояние иммунной системы - по фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (неспецифическая резистентность) [10], индексу ConA индуцированной миграции лейкоцитов (Т-клеточное звено иммунитета) [10], уровню циркулирующих иммунных комплексов малой молекулярной массы (гуморальное звено иммунитета) [10]. Результаты биохимических и иммунологических тестов регистрировали на спектрофотометре Synergy-2 фирмы «BioTek» (США) [10].

Статистическую обработку проводили с помощью пакетов программ Excel и «BIO-STAT 2009». Различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни и считали значимыми при $p \leq 0,05$ [6].

Результаты. В ходе эксперимента установлено, что летальность в группе отравленных животных составила 40%. В группах животных, получавших САТ и терапию АИК, летальность составила 10% и 0% соответственно, что подтверждает высокую защитную эффективность антидотной терапии. Показатели, характеризующие наличие ацидоза и гипоксии, представлены в таблице 1. Анализ полученных данных показал, что острое отравление ЭГ сопровождалось кетоацидотическим сдвигом, максимально выраженным в токсикогенную фазу: достоверным увеличением уровня 3-гидроксимасляной и молочной кислот, активности ЛДГ на фоне незначительной гипогликемии. Выявлены как преимущества, так и недостатки применения АИК в сравнении с САТ. У животных, получивших САТ, отмечено значимое снижение маркеров лактат и кетоацидоза, однако активность лактатдегидрогеназы, так же, как и динамика уровня глюкозы, существенно не изменялись. Таким образом, САТ, компенсируя ацидотическое состояние, не влияла на степень гипоксии и гипогликемию. Терапия АИК, напротив, обеспечивала коррекцию гликемии и приводила к значительному снижению активности ЛДГ. Однако применение АИК не способствовало полной нормализации уровня лактат- и кетоацидоза, наиболее выраженного в первую неделю после отравления. Таким образом, терапия АИК, в отличие от САТ, обеспечила существенную коррекцию гипоксического состояния, но не оказала выраженного позитивного влияния на степень ацидоза у отравленных животных. Последнее входит в некоторое противоречие с данными литературы, свидетельствующими о том, что применение АИК обеспечивает нормализацию ацидотического состояния, но, возможно, данное позитивное действие неконкурентного ингибитора АДГ реализуется в значительной степени за счет подавления метаболизма ЭГ. Полученные нами результаты косвенно подтверждают то, что сдвиг кислотно-основного равновесия в токсикогенную фазу отрав-

ления ЭГ, обусловлен главным образом его метаболитами (в случае применения САТ и метаболитами этанола), а не кислотами эндогенного происхождения.

Таблица 1. Влияние антидотной терапии на показатели энергетического обмена и кетоацидоза в разные сроки после отравления ЭГ (M±m)

Исследуемые показатели	Сроки, сутки	Экспериментальные группы			
		интактные (n=6)	ЭГ (n=6)	ЭГ + Этанол (n=6)	ЭГ + АИК (n=6)
Глюкоза ммоль/л	3	2,80±0,13	1,98±0,24*	4,27±0,40* **	3,58±0,43**
	7	3,34±0,22	1,93±0,23*	2,26±0,10*	3,31±0,20**•
	14	3,15±0,03	2,23±0,14*	2,53±0,14*	3,42±0,34**•
	21	3,60±0,46	3,58±0,57	4,02±0,18	5,03±0,18* **
Лактат ммоль/л	3	2,52±0,08	4,33±0,21*	3,42±0,20* **	4,15±0,19*•
	7	2,45±0,04	3,40±0,18*	3,82±0,38*	4,23±0,24* **
	14	2,41±0,07	2,75±0,19	2,40±0,23	4,34±0,43* **•
	21	2,30±0,16	2,68±0,34	3,37±0,12*	3,58±0,14* **
3-ГМК ммоль/л	3	0,07±0,01	2,79±0,21*	1,83±0,22* **	1,08±0,28* **
	7	0,07±0,01	0,42±0,09*	0,45±0,07*	1,23±0,19* **•
	14	0,07±0,01	0,37±0,16	0,14±0,05	0,07±0,03
	21	0,07±0,01	0,15±0,04	0,09±0,03	0,06±0,03
ЛДГ МЕ/л	3	641±62	2589±84*	2156±187*	1050±198**•
	7	518±42	1453±125*	1057±254*	1080±50* **
	14	552±47	1653±150*	1792±348*	1327±14*
	21	646±103	734±144	1699±70* **	1325±68* **•
Примечание: * - различия достоверны по сравнению с интактной группой (p<0,05); ** - различия достоверны по сравнению с контролем (ЭГ) (p<0,05); • – различия достоверны по сравнению с группой, получившей этанол (p<0,05);					

Результаты изучения показателей, характеризующих функциональную активность мочевыделительной системы (таблица 2) продемонстрировали наличие, сформировавшейся в соматогенной фазе отравления, нефропатии. В эту фазу наблюдалось повышение уровня креатинина в сыворотке крови, что свидетельствовало о нарушении функциональной активности почек. Также были зарегистрированы изменения в составе и объеме выделенной мочи (не представленные в таблице данные): олигурия, появление кристаллов оксалата кальция характерной формы (октаэдры – форма почтового конверта); гемат- и протеинурия, возможно, вызванная повреждающим действием ЭГ и кристаллов оксалата кальция на эпителий почечных канальцев и выходом мембраносвязанных и цитоплазматических ферментов, содержащихся в нефротелиоцитах, в просвет канальцев; лейкоцитурия, обусловленная воспалением, вызванным некротической гибелью клеток нефроэпителия и ту-

булоинтерстициальным нефритом. Антидотная терапия этанолом не обеспечивала восстановление функциональной активности мочевыделительной системы. У животных, получивших в качестве антидота АИК, в течение всего периода наблюдения сохранялся нормальный уровень креатинина, что свидетельствует о предотвращении развития токсической нефропатии. Отмечен также несколько повышенный уровень мочевины, не выходящий за границы физиологической нормы у крыс.

Таблица 2. Влияние антидотной терапии на функциональное состояние мочевыделительной системы в разные сроки после отравления ($M \pm m$)

Исследуемые показатели	Сроки, сутки	Экспериментальные группы			
		интактные (n=6)	ЭГ (n=6)	ЭГ + Этанол (n=6)	ЭГ + АИК (n=6)
Мочевина ммоль/л	3	4,60±0,24	5,05±0,24	4,78±0,31	7,40±1,40
	7	4,37±0,37	5,18±0,44	4,51±0,28	7,18±0,68* **•
	14	4,80±0,23	5,35±0,32	5,86±0,81	9,72±0,60* **•
	21	5,98±0,31	5,72±0,06	5,90±0,24	7,21±0,26 **•
Креатинин мкмоль/л	3	81,6±4,8	80,3±6,9	77,4±3,9	78,2±23,3
	7	83±3,4	76,8±7,7	74,3±7,5	91,1±11,3
	14	77,6±1,8	138,2±7,3*	109,2±2,7* **	90,8±8,4 **
	21	67,6±6,5	137,7±25,0*	168,3±26,6*	68,8±25,0*
Калий ммоль/л	3	4,08±0,06	5,76±0,33*	5,22±0,63	4,08±0,57**
	7	4,38±0,36	3,90±0,55	4,00±0,68	3,93±0,28
	14	4,45±0,20	3,86±0,40	5,33±0,66	3,43±0,48*
	21	4,09±0,10	5,61±0,07*	6,37±0,19* **	3,48±0,33**•
Примечание: * - различия достоверны по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$); ** - различия достоверны по сравнению с контролем (ЭГ) ($p < 0,05$); • – различия достоверны по сравнению с группой, получившей этанол ($p < 0,05$);					

Показатели иммунной системы представлены в таблице 3. В ранний период после перенесенного отравления у выживших животных можно было наблюдать лишь невыраженное, но достоверное повышение миграционной активности лейкоцитов, свидетельствующее о преимущественном поражении в токсикогенную фазу клеточного иммунитета, что согласуется с данными других исследователей [7, 9]. В дальнейшем, происходило нарастание иммунодефицита, выражающееся в прогрессирующем снижении суммарного цитокинообразования лимфоцитов; росте уровня циркулирующих иммунных комплексов, коррелирующем с угнетением фагоцитарной активности иммунокомпетентных клеток. САТ не только не оказала позитивного влияния, но и усугубляла поражение системы иммунитета за счет собственной иммунотоксичности этанола [8]. Введение АИК, по сравнению с контролем и САТ, способствовало поддержанию гомеостаза клеточного звена иммунитета в первую неделю после отравления, однако, в дальнейшем, по окончании защит-

ного действия антидота, наблюдалось выравнивание уровня миграционной активности лейкоцитов во всех трех опытных группах животных.

Таблица 3. Влияние антидотной терапии на некоторые показатели иммунного статуса в разные сроки после отравления ($M \pm m$)

Исследуемые показатели	Сроки, сутки	Экспериментальные группы			
		интактные (n=6)	ЭГ (n=6)	ЭГ + Этанол (n=6)	ЭГ + АИК (n=6)
Фагоцитоз	3	0,242±0,015	0,223±0,010	0,234±0,010	0,236±0,011
	7	0,25±0,01	0,183±0,009*	0,180±0,013*	0,175±0,012*
	14	0,234±0,03	0,017±0,005*	0,014±0,004*	0,015±0,006*
	21	0,233±0,034	0,037±0,013*	0,060±0,014*	0,053±0,016*
РТМЛ индекс стим./спонт.	3	0,44±0,05	0,68±0,05*	0,71±0,05*	0,56±0,06
	7	0,46±0,04	0,73±0,06*	1,02±0,08*	0,51±0,05**•
	14	0,42±0,04	0,91±0,06*	1,03±0,14*	0,80±0,09*
	21	0,43±0,04	1,08±0,05*	0,96±0,04*	0,95±0,08*
ЦИК малой молекуляр- ной массы, у.е.	3	76,3±14,8	97,4±18,5	60,7±8,3	114,0±24,8
	7	68,5±8,5	60,8±10,2	38,8±13,6	101,3±28,0
	14	57,3±22,2	156,3±18,4*	32,3±15,9**	133,8±24,7*•
	21	59,5±3,5	119,3±5,2*	149,0±15,1*	161,4±40,2*
Примечание: * - различия достоверны по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$); ** - различия достоверны по сравнению с контролем (ЭГ) ($p < 0,05$); • – различия достоверны по сравнению с группой, получившей этанол ($p < 0,05$);					

Закключение. Таким образом, полученные нами данные подтверждают то, что лечение острого отравления ЭГ амидом изовалериановой кислоты, имеет ряд значительных преимуществ в сравнении со стандартной антидотной терапией, так как обеспечивает коррекцию гипогликемии и снижение степени гипоксии органов и тканей. Применение амида изовалериановой кислоты обеспечивает сохранение функциональной активности мочевыделительной системы у отравленных животных, в то время как, у контрольных крыс и получавших стандартную антидотную терапию, происходит нарастание уровня креатинина, что свидетельствует о снижении скорости клубочковой фильтрации. В то же время, использование в качестве антидота амида изовалериановой кислоты не оказывает существенного протективного действия на формирование прогрессирующего иммунодефицитного состояния комбинированного типа в отдаленном периоде. Однако, в первые две недели после отравления амид изовалериановой кислоты, в отличие от стандартной антидотной терапии, обеспечил сохранение функциональной активности клеточного звена иммунитета, наиболее подверженного повреждающему действию ЭГ в токсикогенную фазу отравления. Более выраженное защитное действие антидотной терапии острых отравле-

ний ЭГ с помощью амида изовалериановой кислоты по сравнению со стандартной антидотной терапией делают перспективным использование этого вещества в токсикологической практике наряду с 4-метилпиразолом.

Вопрос о возможном прямом иммунотоксическом (цитотоксическом) действии ЭГ и, соответственно, о разработке комплексного подхода к терапии острого отравления ЭГ, который бы дополнительно включал цитопротекторы, антигипоксанты, метаболические корректоры и иммуностропные препараты, нуждается в дальнейшем изучении.

Выводы:

1. Терапия неконкурентным ингибитором алкогольдегидрогеназы – амидом изовалериановой кислоты в отличие от стандартной антидотной терапии, включающей этанол, оказывает значимое защитное действие на динамику гипоксического состояния при отравлении ЭГ.
2. Применение амида изовалериановой кислоты предотвращает формирование нарушений функционального состояния мочевыделительной системы.
3. Амид изовалериановой кислоты обеспечивает сохранение функциональной активности клеточного звена иммунитета, в первую неделю после отравления, однако в дальнейшем не оказывает существенного протективного действия в отношении постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Список литературы:

1. Бонитенко Е.Ю., Бабахаян Р.В., Бородавко В.К., и др. Отравления этиленгликолем и его эфирами // Medline.ru. - 2003. - Т.4, ст. 124. - С.292-429
2. Бонитенко Е.Ю. Сравнительная характеристика острых отравлений этиленгликолем, его монометиловым и моноэтиловым эфирами // Medline.ru. - 2003. - Т.4, ст. 135. - С.486-490
3. Бонитенко Е.Ю., Бонитенко Ю.Ю. Влияние ингибиторов алкоголь- и альдегиддегидрогеназы на токсичность этиленгликоля и его эфиров (целлозольвов) // Medline.ru. - 2009. - Т.10, ст. 18. - С.442-453
4. Бонитенко Е.Ю., Бонитенко Ю.Ю. Применение этанола и ингибитора алкогольдегидрогеназы при отравлениях эфирами этиленгликоля // Medline.ru. - 2009. - Т.10, ст. 19. - С.454-467
5. Бонитенко Е.Ю., Бонитенко Ю.Ю. Влияние совместного применения этанола и ингибитора алкогольдегидрогеназы на токсичность этиленгликоля // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях - 2009. - N 4. - С.42-47.

6. Гланц С. Медико-биологическая статистика – М.: Изд-во «Практика», 1998 – 459 с.
7. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Иммунотоксические эффекты при остром отравлении этиленгликолем // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2000 №10 - С.415-417
8. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Лим В.Г. и др, Влияние этанола и 4-метилпиразола на изменение иммунотоксичности этиленгликоля // Экспериментальная и клиническая фармакология - 2005 Т68 №1 - С.53-55
9. Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., Осипов О.В. и др. Действие спиртов и их метаболитов на антителообразующую функцию Т- и В-лимфоцитов *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2002 № 3 - С.301-303
10. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии, Т. 2, СПб.: Изд-во «Интермедика», 2002 – 600 с.
11. Лужников Е.А., Остапенко Ю.Н., Суходолова Г.Н., Неотложные состояния при острых отравлениях, М.: Изд-во «Медпрактика-м», 2001 - 220 с.
12. Любишин М.М., Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н. Ремаксол в фармакологической коррекции отставленных нарушений, вызванных острым отравлением этиленгликолем // Экспериментальная и клиническая фармакология – 2011 Т.74 №9. – С.28-31.
13. Маркизова Н.Ф., Гребенюк А.Н., Башарин В.А. и др. Спирты. – СПб.: Изд-во «Фолиант», 2004. – 112 с.
14. Hovda K.E., Julsrud J., Øvrebø S. at al. Studies on ethylene glycol poisoning: one patient - 154 admissions // Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.) - 2011 Jul; 49(6): P.478-484.
15. Lepik K.J., Sobolev B.G., Levy A.R. at al. Medication errors associated with the use of ethanol and fomepizole as antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning // Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.) - 2011 Jun; 49(5): P.391-401
16. Levine M., Curry S.C., Ruha A.M. at al. Ethylene glycol elimination kinetics and outcomes in patients managed without hemodialysis // Annals of emergency medicine - 2012 Jun; 59(6): P.527-531
17. Montjoy C.A., Rahman A., Teba L. Ethylene glycol and methanol poisonings: case series and review // The West Virginia medical journal - 2010 Sep-Oct; 106(6): P.17-23
18. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes. // Official Journal of the European Union - 2010 - L.276. P.33–79