

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА БИОТРАНСФОРМАЦИЮ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ЕГО ЭФИРОВ В ГОМОГЕНАТАХ ПЕЧЕНИ

¹Горбачева Т.В., ²Бонитенко Е.Ю., ¹Башарин В.А., ³Бонитенко К.Е.

¹*Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение
высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»
Министерства обороны Российской Федерации
194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.6
телефон/факс: +7 (812) 667-71-46
e-mail: vmeda@mil.ru*

²*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика
Н.Ф. Измерова»
105275, Москва, пр. Буденного, д. 31*

³*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8*

Резюме

Цель исследования – изучить возможность использования гомогенатов печени крыс в качестве тест системы при поиске средств антидотной терапии отравлений токсифицирующимися алкоголями.

Установлено, что биотрансформация этиленгликоля (ЭГ) в гомогенатах печени крыс и человека осуществляется в 3-5 раз быстрее, чем его метилового и этилового эфиров. В свою очередь скорость метаболизма ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени человека из расчета на грамм сырой ткани осуществляется быстрее чем в гомогенатах печени крыс.

Основным ферментом определяющим скорость биотрансформации ЭГ и его эфиров является алкогольдегидрогеназа (АДГ) на долю которой приходится не менее 75 и 63% всего метаболизма этих веществ в гомогенатах печени человека и не линейных крыс соответственно.

Этанол и амид изовалериановой кислоты (АИК) тормозят метаболизма ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени человека и крыс, причем выраженность эффекта зависит от концентрации как этилового спирта, так и АИК. В гомогенатах печени человека подавление биотрансформации изучавшихся веществ этанолом и АИК происходило более интенсивно, чем в гомогенатах печени крыс.

Учитывая сходство процессов биотрансформации спиртов в гомогенатах печени человека и крыс как по качественным, так и по количественным показателям последние могут быть использованы в качестве тест систем при поиске химических веществ – перспективных средств антидотной терапии отравлений токсифицирующимися алкоголями.

Ключевые слова

Этиленгликоль, эфиры этиленгликоля, алкогольдегидрогеназа, ингибиторы алкогольдегидрогеназы, этанол, спирт, метаболизм.

THE EFFECT OF INHIBITORS OF ALCOHOL DEHYDROGENASE ON BIOTRANSFORMATION OF ETHYLENE GLYCOL AND ITS ESTERS BY LIVER HOMOGENATE

¹Gorbacheva T.V., ²Bonitenko E.U., ¹Basharin V.A., ³Bonitenko K.E.

¹Military Medical Academy named S.M. Kirov

194044 Russia, Saint-Petersburg, Lebedeva street, 6,

tel.: +7 (812) 667-71-46

²Izmerov Research Institute of Occupational Health

105257, Russia, Moscow, Budennogo Ave., 31

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Academician I.P.

Pavlov First St. Petersburg State Medical University” of the Ministry of Healthcare of

Russian Federation

194044 Russia, Saint-Petersburg, Lev Tolstoy street, 6-8,

Summary

The purpose of the study was to study the possibility of using homogenates of rat liver as a test system in the search for antidote therapy of poisoning by toxic alcohols.

It was found that the biotransformation of ethylene glycol (EG) in the liver homogenates of rats and humans is 3-5 times faster than its methyl and ethyl esters. In turn, the rate of metabolism of EG and its esters in human liver homogenates per gram of raw tissue is faster than in rat liver homogenates.

The main enzyme determining the rate of biotransformation of EG and its esters is alcohol dehydrogenase (ADH), which accounts for at least 75 and 63% of the total metabolism of these substances in human liver homogenates and non-linear rats, respectively.

Ethanol and amide of isovaleric acid (AIC) inhibit the metabolism of EG and its esters in human and rat liver homogenates, and the severity of the effect depends on the concentration of both ethyl alcohol and AIC. In human liver homogenates, the suppression of biotransformation of the studied substances by ethanol and AIC was more intense than in rat liver homogenates.

The similarity of the processes of biotransformation of alcohols in human liver homogenates and rats both in quality and quantity given, the latter can be used as a test systems in the search for chemicals – promising means of antidote therapy of poisoning by toxic alcohols.

Keyword

Ethylene glycol, ethylene glycol ethers, alcohol dehydrogenase, inhibitors of alcohol dehydrogenase, ethanol, alcohol, metabolism.

Введение

Вопросы связанные с экстраполяцией полученных экспериментальных данных на человека являются основной проблемой современной экспериментальной биологии, фармакологии и медицины. В настоящее время наиболее широко в медико-биологических исследованиях для биомоделирования используются модели первого и второго порядков. К моделям первого порядка относятся лабораторные животные млекопитающие, используемое в эксперименте с целью построения моделей функционирования человека для последующего описания и анализа изучаемых процессов [1]. В свою очередь модели второго порядка (гидробионты, бактерии, других микроорганизмы и культуры клеток) используются для моделирования процессов происходящих в отдельных тканях реже – органах [2].

Адекватность моделирования и возможность экстраполяции экспериментальных данных на человека определяют критерии подобия которые являются общими как для моделей первого, так и второго порядка. К ним относятся:

- сходство биологических характеристик систем (морфо-функциональное сходство), реагирующих на воздействие;
- общностью характеристик метаболических процессов;
- близостью чувствительности и значений количественных показателей, установленных для человека и биомодели;
- сходство ответа системы и ее прототипа на воздействие [3, 4, 5].

При экстраполяции данных с моделей первого порядка на человека используется либо прямой перенос данных, либо корректирующие коэффициенты (коэффициенты пересчета), в то время как для моделей второго порядка – только корректирующие коэффициенты [6, 7, 8]. Коэффициенты пересчета показывают не качественные, а количественные различия между результатами наблюдений на людях и исследованиями на модельных объектах [3, 9].

В данной работе в качестве тест системы для изучения качественных и количественных характеристик метаболизма этиленгликоля (ЭГ), его метилового и этилового эфиров нами были использованы гомогенаты печени, как основного органа осуществляющего биотрансформацию спиртов как в организме экспериментальных животных, так и человека [10].

По современным представлениям в организме человека и животных существуют четыре системы, метаболизирующие спирты – алкогольдегидрогеназа (АДГ), микросомальная этанолокисляющая система (МЭОС), каталазная и ксантиоксидазная, различающиеся по внутриклеточной локализации, оптимальному рН,

концентрации субстрата, кофакторам, но окисляющие первичные спирты до общего продукта – соответствующего альдегида [10, 11, 12].

Как известно, ЭГ, его метиловый и этиловый эфиры относятся к токсифицирующимся спиртам, а их токсичность связана, в основном, с продуктами их биотрансформации, ключевым ферментом которой является АДГ печени [10].

В качестве основного средства антидотной терапии как при отравлениях ЭГ и его эфирам, так и другими токсифицирующимися спиртами в России до настоящего времени используется этанол, конкурирующий с ядом за АДГ [13]. Однако этанол не в полной мере отвечает реальным условиям оказания помощи и эвакуации пострадавших, поскольку на практике трудно поддерживать его концентрацию в биосредах, необходимую для эффективной конкуренции за фермент. В связи с чем обоснован поиск новых химических веществ – бесконкурентных ингибиторов АДГ для их дальнейшего использования в качестве средств антидотной терапии отравлений токсифицирующимися алкоголями.

В нашей работе для доказательства возможности использования гомогенатов печени для оценки влияния химических соединений на биотрансформацию токсифицирующихся спиртов был использован бесконкурентный селективный ингибитор АДГ – амид изовалериановой кислоты (АИК) [14].

Цель исследования – изучить возможность использования гомогенатов печени крыс в качестве тест системы при поиске средств антидотной терапии отравлений токсифицирующимися алкоголями.

Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах белых нелинейных крыс разводки ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», массой 180–200 г. Перед проведением исследования длительность карантина животных составляла 14 дней. Во время карантина животные содержались в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33215-2014 на стандартном водном и пищевом рационе в отдельном помещении [15, 16, 17].

Животные подвергались эвтаназии после чего у них проводился забор печени. Сразу же после забора печень крыс отмывалась от крови 0,15 М трис-буфером (0,0 + 4,0°C) высушивалась на фильтровальной бумаге и взвешивалась.

Кусочки печени людей, погибших от черепно-мозговых травм, отмывались от крови 0,15 М трис-буфером (pH – 8,8) при температуре 0,0 + 4,0°C и замораживались в нем при температуре – 20,0°C и хранилась в замороженном виде не более 24 часов. Последующая работа с материалом, полученным от человека и экспериментальных животных, осуществлялась по единой схеме.

Печень гомогенизировалась в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в соотношении 1 : 3 с 0,15 М трис–буфером. Полученный гомогенат центрифугировали в течении 20 мин при 3000 об/мин. Затем к 4,0 мл супернатанта добавляли 0,5 мл исследуемого вещества (метил-, этилцеллозольва, этиленгликоля 0,013; 0,012; 0,045 мМ раствора соответственно) и 0,45 мл 20 мМ раствора никотинамида динуклеотида (НАД). После этого в контроль добавляли 0,05 мл трис–буфера, а в опыт 0,05 мл соответствующего ингибитора (для этанола – 0,57; 1,14; 2,28; 4,57 М раствора; для амида изовалериановой кислоты – 0,062; 0,124; 0,25 М раствора).

Пробу продували кислородом, герметизировали и инкубировали при температуре – 37,0⁰С в течение 3 часов; постоянное перемешивание осуществлялось с помощью электромагнитной мешалки. После завершения инкубации отбирали 0,5 мл пробы. Определение ЭГ и его эфиров осуществлялось на хроматографе «Agilent 7890», оснащенным пламенно-ионизационным детектором. Условия анализа: капиллярная колонка – длина 60 м с внутренним диаметром 0,25 мкм, неподвижная фаза – DB-624, толщина пленки 1,40 мкм. Условия хроматографического разделения: начальная температура термостата колонок 110 °С (выдержка 1 мин), скорость подъема температуры 5 °С/мин до 130 °С (выдержка 1 мин), 5 °С/мин до 130 °С (выдержка 10 мин), скорость подъема температуры 5 °С/мин до 180 °С (выдержка 5 мин). Температура испарителя – 250 °С, детектора – 280 °С. Расход газа-носителя азота – 2 мл/мин. Расход воздуха – 300 мл/мин, водорода – 30 мл/мин, поток поддувочного газа – 20 мл/мин.

Идентификация производилась по времени удерживания веществ. Время удерживания метилцеллозольва – 3,48 мин, этилцеллозольва – 3,78 мин, этиленгликоля – 10,15. Расчет концентрации веществ осуществлялся по методу внутреннего стандарта. Внутренний стандарт – 1,2-пропиленгликоль. Время удерживания 1,2-пропиденгликоля – 9,28 мин.

В свою очередь расчет скорости метаболизма исследуемых веществ осуществлялся по убыли их концентраций во времени по формуле:

$$V = (C_1 - C_2) / 3 \text{ (ммоль/г*ч)}$$

где: C_1 – концентрация вещества до внесения ингибитора; C_2 – концентрация вещества через 3 часа; 3 – время инкубации в часах.

При изучении степени угнетения скорости метаболизма ЭГ и его эфиров нами рассчитывалась концентрация этанола и АИК ингибирующая биотрансформации ксенобиотиков в гомогенатах печени на 50%.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывались на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows (версия 6.0). Результаты оценивали по *t* – критерию Стьюдента. Различия считались достоверными, если *p* составлял 95 и более процентов ($p < 0,05 - 0,01$).

Результаты и их обсуждение

В опытах *in vitro* было установлено, что гомогенаты печени крыс и человека, судя по темпам падения концентрации исходных соединений, интенсивно метаболизируют этиленгликоль, его метиловый и этиловый эфиры (таблица 1, 2.). При анализе полученных данных привлекают внимание, прежде всего, два обстоятельства: первое состоит в том, что темпы биотрансформации ЭГ в 3–5 раз выше, чем аналогичные показатели для целлозольвов. Второе касается сравнения скорости метаболизма ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени человека и крысы – в расчете на грамм сырой ткани гепатоциты человека осуществляют этот процесс более интенсивно, особенно в отношении этиленгликоля.

Таблица 1.

Влияние ингибиторов АДГ на скорость биотрансформации ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени человека ($X \pm m$)

Гомогенаты	Скорость биотрансформации (ммоль/г*ч)	
	Метилцеллозольва (n=5)	Этилцеллозольва (n=5)
Контроль	0,0214 ± 0,0012	0,0168 ± 0,0009
После добавления этанола в концентрациях (ммоль/л)		
21,7	0,0168 ± 0,0008*	0,0147 ± 0,0012
43,4	0,0124 ± 0,0009*	0,0111 ± 0,0012*
86,8	0,0055 ± 0,0004*	0,0057 ± 0,0005*
173,7	0,0019 ± 0,0005*	0,0030 ± 0,0005*
После добавления АИК в концентрациях (ммоль/л)		
2,47	0,0162 ± 0,0007*	0,0141 ± 0,0009
4,94	0,0106 ± 0,0005*	0,0091 ± 0,0004*
9,88	0,0048 ± 0,0007*	0,0042 ± 0,0005*
* – различие с контролем достоверно ($p < 0,05$)		

Таблица 2.

Влияние ингибиторов АДГ на скорость биотрансформации ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени крыс ($X \pm m$)

Гомогенаты	Скорость биотрансформации (ммоль/г*ч)	
	Метилцеллозольва (n=5)	Этилцеллозольва (n=5)
Контроль	0,0175 ± 0,0009	0,0140 ± 0,0015
После добавления этанола в концентрациях (ммоль/л)		
21,7	0,0161 ± 0,0011	0,0113, ± 0,0013*
43,4	0,0134 ± 0,0012*	0,0099 ± 0,0009*
86,8	0,0102 ± 0,0009*	0,0077 ± 0,0004*
173,7	0,0056 ± 0,0007*	0,0048 ± 0,0014*
После добавления АИК в концентрациях (ммоль/л)		
2,47	0,0149 ± 0,0007*	0,0109 ± 0,0007*
4,94	0,0113 ± 0,0008*	0,075 ± 0,0008*
9,88	0,0054 ± 0,0007*	0,0045 ± 0,0013*
* – различие с контролем достоверно (p < 0,05)		

Добавление в инкубационную смесь этанола приводило к торможению метаболизма, как этиленгликоля так и целлозольвов, причем выраженность эффекта зависела от исходной концентрации этилового спирта. В гомогенатах печени человека подавление биотрансформации изучавшихся веществ этанолом происходило более интенсивно. В этом объекте снижение темпов метаболизма этиленгликоля и его эфиров примерно в 2 раза наблюдается при его концентрации, равной 43,4 ммоль/л, тогда как для печени крыс аналогичный эффект обнаруживается при концентрациях этанола 86,8–173,6 ммоль/л, а для ЭГ и наивысшая из использованных не позволяла добиться подобного эффекта. В свою очередь обращало на себя внимание, что концентрация этанола ингибирующая скорость биотрансформации ЭГ и его эфиров на 50% была в 1,66–2,78 раза ниже для гомогенатов печени человека (рисунок 1).

Рисунок 1 – Концентрация этанола ингибирующая скорость биотрансформации ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени на 50%

Подавление скорости биотрансформации ЭГ и целлозольвов достигалось и при добавлении в инкубационную смесь АИК. И в данном случае степень этого действия зависела от концентрации ингибитора. В гомогенатах печени человека 2,47 ммоль/л АИК вызывало эффект, примерно равный по действию 21,7 ммоль/л этанола, а уровень 9,88 ммоль/л соответствовал концентрации этилового спирта

86,8–173,6 ммоль/л. При использовании гомогенатов печени крыс наблюдалась в целом аналогичная зависимость. Следует так же отметить, что концентрация АИК ингибирующая скорость биотрансформации ЭГ и его эфиров на 50% в гомогенатах печени человека и крыс различалась в меньшей степени (в 1,0–1,45 раза), чем при использовании этанола (рисунок 2).

Рисунок 2 – Концентрация АИК ингибирующая скорость биотрансформации
ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени на 50%

Полученные данные позволяют говорить о значительном сходстве метаболизма ЭГ и его эфиров у экспериментальных животных и человека, как по качественным, так и по количественным характеристикам. Так, ЭГ и его эфиры метаболизируются преимущественно при участии АДГ, о чем свидетельствует торможение этого процесса селективным ингибитором АДГ – амидом изовалериановой кислоты не влияющим на другие ферментативные системы биотрансформации спиртов в отличие от этанола.

Близкими являются и темпы метаболизма изучавшихся соединений в гомогенатах печени крыс и человека. Лишь ЭГ в модельных системах разрушается печенью человека заметно более интенсивно, однако и в этом случае, речь идет о различии, не превышающем 40%.

Это сходство является одним из необходимых условий трансформации экспериментальных данных на человека. Правда, обращает на себя внимание, что темпы метаболизма ЭГ и его эфиров, судя по нашим материалам, в гомогенатах печени человека выше, чем у животных. Это противоречит обще принятому положению о том, что биотрансформация спиртов у грызунов происходит с большей скоростью, чем у людей. Представляется, что указанное несоответствие объясняется следующим образом: в наших опытах скорость метаболизма рассчитана на грамм сырой ткани; в то же время известно, что соотношение масса печени / масса тела у крыс примерно в 2 раза выше. Поэтому при оценке скорости биотрансформации спиртов в организме (в отличие от изолированной ткани) имеет значение не столько относительная активность, сколько суммарная метаболическая мощность этого органа.

Заключение

В настоящем исследовании в качестве тест системы для изучения биотрансформации ЭГ и его эфиров, а так же влияния ингибиторов метаболизма спиртов на скорость их метаболизма нами были использованы гомогенаты печени человека и не линейных крыс. Подобный подход является не стандартным при проведении медико-биологических исследований в связи с тем, что гомогенаты печени человека при изучении ингибиторов метаболизма спиртов, и в частности АДГ могут рассматриваться как модели – 0 порядка, так как данная тест система сама по себе является элементом прототипа.

В свою очередь гомогенаты печени крыс в соответствии с представленным выше определениями могут быть отнесены к моделям первого порядка, так как соответствуют прототипу как по качественным, так и по количественным показателям. Однако, в отличии от классических моделей первого порядка экстраполяция данных с гомогенатов печени крыс на гомогенаты печени человека и прототип вообще может быть осуществлена только с использованием коэффициентов пересчета, а не прямого переноса.

Выводы

Подводя итоги проведенным исследованиям можно сделать следующие выводы:

1. Биотрансформация этиленгликоля в гомогенатах печени крыс и человека осуществляется в 3-5 раз быстрее, чем его метилового и этилового эфиров. В свою очередь скорость метаболизма ЭГ и его метилового и этилового эфиров в гомогенатах печени человека из расчета на грамм сырой ткани осуществляется быстрее чем в гомогенатах печени крыс.

2. Основным ферментом определяющим скорость биотрансформации ЭГ и его эфиров является АДГ на долю которой приходится не менее 75 и 63% всего метаболизма этих веществ в гомогенатах печени человека и не линейных крыс соответственно.

3. Этанол и АИК тормозят метаболизма ЭГ и его эфиров в гомогенатах печени человека и крыс, причем выраженность эффекта зависит от концентрации как этилового спирта, так и амида изовалериановой кислоты. В гомогенатах печени человека подавление биотрансформации изучавшихся веществ этанолом и АИК происходит более интенсивно, чем в гомогенатах печени крыс.

4. Учитывая сходство процессов биотрансформации спиртов в гомогенатах печени человека и крыс как по качественным, так и по количественным показателям последние могут быть использованы в качестве тест систем при

поиске химических веществ – перспективных средств антидотной терапии отравлений токсифицирующимися алкоголями.

Список, использованной литературы

1. Славин М.Б. Практика системного моделирования в медицине. Серия: [Учебная литература для студентов мед. вузов](#). / М.Б. Славин. – Казань. «Медицина», 2002. – 166 с.
2. ATLA Alternatives to laboratory Animals // Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. 29 August – 2 September, 1999. – Bologna, Italy. – Urecht, Programme and Abstracts. – 442 p.
3. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2005. – 608 с.
4. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования – М.: Изд-во ВПК, 2007. – 320 с.
5. Экспериментальная токсикология: пособие для врачей / [О. М. Антонова и др.]; под ред. Г.А. Софронова, В.В. Шилова. – СПб: ЭЛБИ-СПб, 2011. – 270 с.
6. Красовский Г.Н., Егорова Н.А., Антонова М.Г. Проблема экстраполяции результатов биотестирования на человека // Токсикол. вестник. - 2002. – № 3. – С. 12–17.
7. Golden M., Seibert H. Impact of bioavailability on the correlation between in vitro cytotoxic and in vivo acute fish toxic concentrations of chemicals // Aquatic Toxicology. – 2005. – Vol. 72. – P. 327–337.
8. Alternatives to animal testing / ed. R.E. Hester, R.M. Harrison. – Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2006. – 272 p.
9. Krasovskii G.N. Extrapolation of experimental data from animals to man // Environ. Health Perspectives. – 1978. – Vol. 13. – P. 51–58.
10. Клиника, диагностика, лечение, судебно-медицинская экспертиза отравлений алкоголем и его суррогатами [пособие для врачей] / [Бонитенко Е. Ю. и др.]. – Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2013. – 655 с.
11. Кожемякин Л.А. Ингибиторы алкогольдегидрогеназы и их влияние на основные ферментные системы метаболизма алифатических спиртов / Л.А. Кожемякин и [и др.]. // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т.36, № 3. – С. 67–69.
12. Куценко С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. – СПб.: «Изд-во Фолиант», 2004. – 720 с.

13. Остапенко Ю.Н., Сабаев А.В., Ливанов А.С., Бонитенко Е.Ю., Суходолова Г.Н., Белова М.В. Токсическое действие метанола и гликолей (этиленгликоля) / Федеральные клинические рекомендации. – М.: Межрегиональная общественная благотворительная организация «Ассоциация клинических токсикологов», 2013.– 38 с.

14. Иванова Л.И. Метаболическая эффективность ингибиторов алкогольдегидрогеназы в условиях интоксикации метанолом и этиленгликолем: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Л.И.Иванова; ВМедА им. С.М. Кирова. – Л., 1989. – 23 с.

15. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур.

16. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

17. Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации (утверждены МЗ РФ 29.12.98). ОСТ 42-511-99.