

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАНОЛА В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРА АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Юдин М.А., Цой Д.В., Венгерович Н.Г., Богачёва А.С., Устинова Т.М., Быкова К.А.

¹*Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург*

²*Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Государственный
научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства
обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, Санкт-Петербург,
Лесопарковая ул., д. 4, тел 8(812) 527-39-57*

email: gniiivm_15@mil.ru

Резюме. При курсовом (три схемы с эскалацией дозы) применении обратимого ингибитора алкогольдегидрогеназы (ADH) – фомепизола (4-метилпиразола) исследованы особенности сублетальных ($\frac{1}{2}$ ЛД₁₆) и летальных (1 ЛД₅₀) отравлений крыс метанолом. Для указанных групп животных отмечено существенное в 15 и 55 раз, соответственно, нарастание концентрации формальдегида в первые 6 часов от момента внутрижелудочного введения метилового спирта. Летальность животных в период 2-6 суток связана с существенным приростом в 5-11 раз плазменной концентрации муравьиной кислоты, относительно интактных животных. При интоксикации метанолом применение фомепизола в различных схемах не влияло на уровень формальдегида, но статистически значимо в 1,5 и 2 раза снижало концентрацию муравьиной кислоты через 2 суток после отравления метанолом в сублетальной и летальной дозах. Фомепизол обеспечивал частичное восстановление общей антиокислительной активности (ОАА) плазмы крови, по способности связывать стабильный радикал дифенилпикрингидразин (ДФПГ) и ингибированию окисления 2-тиобарбитуровой кислоты (2-ТБК).

Ключевые слова: Отравление, метанол, алкогольдегидрогеназа (ADH), фомепизол, формальдегид, муравьиная кислота, цитопротекция, антиоксидантная активность.

THE ASPECTS OF METHANOL'S TOXIC EFFECT IN THE PRESENCE OF AN ALCOHOL DEHYDROGENASE INHIBITOR

Yudin M.A.^{1,2}, Czoj D.V.², Vengerovich N.G.², Bogachyova A.S.¹, Ustinova T.M.²,
By`kova K.A.²

¹*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*

²*State scientific-research test Institute of military medicine of Defense Ministry of the Russian Federation*

Abstract. The features of sublethal ($\frac{1}{2}$ LD₅₀) and lethal (1 LD₅₀) rat poisoning with methanol were studied during the course (3 dose-escalation regimens) of the reversible alcohol dehydrogenase (ADH) inhibitor fomepizole (4-methylpyrazole). In these groups, a significant increase in formaldehyde concentration was noted in the first 6 hours after intragastric administration of methyl alcohol – 15- and 55-fold, respectively. Animal lethality within 2-6 days is associated with a significant increase of formic acid concentration in the plasma by 5-11 times, compared to intact animals. During methanol intoxication, fomepizole, used in various dosing regimens, did not affect the level of formaldehyde, but significantly reduced the formic acid concentration by 1.5 and 2 times 2 days after methanol poisoning in sublethal and lethal doses. Fomepizole provided a partial recovery of the blood plasma total antioxidant status (AOA), according to the ability to bind a stable radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) and to the inhibition of 2-thiobarbituric acid (2-TBA) oxidation.

Key words: poisoning, methanol, alcohol dehydrogenase, fomepizole, formaldehyde, formic acid, cytoprotection, antioxidant activity.

Введение. Доля отравлений суррогатами алкоголя в Российской Федерации, равно как и в других странах Евразии (Индия, Иран, Малазия), Африки (Кения, Ливия) и Америки (Коста-Рика), существенно превышает показатели других стран Евросоюза, при этом только за последние 10 лет на территории нашей страны зарегистрировано около 800-1600 острых интоксикаций метиловым спиртом, представляющим основную долю суррогатов алкоголя [16]. Именно с его токсическим действием связывают высокую летальность отравленных (более 80 %) [4]. До настоящего времени росту отравлений метиловым спиртом способствуют широкое распространение среди населения контрафактной алкогольной продукции и различных технических жидкостей, а также отсутствие надлежащего контроля уполномоченными ведомствами за качеством их производства. Так, в результате незаконной продажи суррогата алкоголя – метанола в

г. Оренбурге в ноябре 2021 г. погибло более 35 человек, а общее количество пораженных превысило тысячу человек [5].

Токсическое действие метанола проявляется при достижении его концентрации в крови 20 мг/дл (6,2 ммоль/л) и объясняется совокупностью эффектов как самого вещества, так и продуктов его метаболизма, образующихся в процессе «летального синтеза» (до 75-85 %) преимущественно в печени, почках и эпителии желудочно-кишечного тракта. В присутствии никотинамид аденин динуклеотида (NAD^+) метанол окисляется алкогольдегидрогеназой (ADH), в частности изоформами ADH-1A, ADH-1B и ADH-1A, и, в меньшей степени, цитохромом р450 2E1 (CYP 2E1) до более токсичного формальдегида, который при участии альдегиддегидрогеназы (ALDH), в основном митохондриальной изоформы (ALDH2), переходит в муравьиную кислоту [6]. Последняя подвергается превращению в оксид углерода и воду в присутствии кофермента фолиевой кислоты и ее производных (фолаты).

Активность ферментных систем детоксикации спиртов у мелких лабораторных животных, а также специфичность их действия к метанолу обеспечивается с одной стороны работой каталазы, ALDH-3 и фолатов, а с другой стороны – зависит от концентрации субстратов реакции. В отличие от печени, где 90 % метанола окисляется ADH и CYP 2E1, его ферментативное превращение в ткани головного мозга происходит преимущественно каталазой, эффективность работы которой напрямую зависит от концентрации H_2O_2 в цитозоле нейронов и их глиального окружения [7]. Показано, что при высоких концентрациях H_2O_2 (100-500 мкМ) первая молекула окисляет Fe^{2+} гема каталазы с образованием оксиферильной группы на π -катионном радикале порфирина и воды, другая окисляется до воды и кислорода в активном центре гема (His-75). При малых концентрациях H_2O_2 второй молекулой может выступать сам метанол, окисляясь при этом до формальдегида [9].

В низких концентрациях (менее 20 мкг/мл) формальдегид в присутствии формил-тетрагидрофолат-синтетазы и фосфорилированного NAD (NADP^+) переходит в 10-формил-тетрагидрофолат. Под действием формил-тетрагидрофолат-дегидрогеназы одна его часть окисляется до оксида углерода и воды, другая претерпевает многостадийный процесс окисления в присутствии метилен-тетрагидрофолат-редуктазы и метионинсинтетазы [8]. Промежуточными и вторичными продуктами реакции являются восстановленный тетрагидрофолат, а также метионин, образующийся в результате окисления гомоцистеина.

При высоких концентрациях формальдегида (более 20 мкг/мл) его утилизация осуществляется преимущественно каталазой. Отчасти, этим объясняется снижение ее

активности при тяжелых отравлениях в связи с переключением большинства молекул фермента на процессы окисления избытка метанола. Такие условия способствуют накоплению активных форм кислорода и недоокисленных метаболитов, в первую очередь 4-гидроксиноненала. Их прирост дополняется прооксидантным действием моноаминоксидазы (MAO), в большей степени ее А-изоформой, активность которой обратно пропорционально активности каталазы [9].

Накопление формальдегида сопровождается угнетением ферментов гликолиза, затрудняет транспорт электронов и протонов по цепи дыхательных ферментов митохондрий в результате нарушения работы NAD-зависимого шунта. В результате этого снижается образование аденозинтрифосфата и повышается концентрация лактата. По мере превращения метанола в муравьиную кислоту и ее накопления в крови и тканях усиливается ацидоз, который усугубляет угнетение тканевого дыхания митохондрий за счет ингибирования цитохром-С-редуктазы, глутамат-щавелевокислой трансаминазы и малатдегидрогеназы. Угнетение работы ферментов наиболее существенно для энергозависимых процессов нервной ткани, а тяжелые отравления метанолом коррелируют с активностью фактора апоптотической протеазы-1 и интенсификацией каспаз-зависимых процессов клеточного апоптоза [11]. Токсическое действие метаболитов метанола замыкает «порочный круг» патогенеза и подкрепляется нарушением тканевого дыхания и метаболическим ацидозом.

Антидотная терапия острых отравлений метиловым спиртом направлена на снижение избытка образования или ускорения биodeградации формальдегида и муравьиной кислоты путем замедления или полного прекращения его метаболизма. Для этих целей в качестве конкурентного субстрата используют этанол, тогда как в качестве кофермента, ускоряющего метаболизм муравьиной кислоты до нетоксичного тетрагидрофолата фолиевую кислоту. Несколько реже применяют фомепизол (4-метилпиразол), относящийся к классу обратимых ингибиторов ADH. Последний доказал высокую эффективность в ряде зарубежных исследований [17, 18]. При существенно большем в 5000 и 500 раз аффинитете к ADH по сравнению с метанолом и этанолом, соответственно, фомепизол обладает минимальным количеством побочных эффектов, а известный профиль фармакокинетики уменьшает требования к постоянному контролю его концентрации в крови. Выявленные обстоятельства представляют существенные преимущества к применению препарата в условиях оказания неотложной помощи пострадавшим в экстренной форме. При этом у отношении лиц, отравленных метанолом средней степени тяжести, снижается потребность в процедурах гемодиализа. Применение

фомепизол исключает развитие симптомов алкогольного опьянения, в отличие от рекомендованных схем назначения этилового спирта [1, 2].

На сегодняшний день в рекомендациях по медицинскому применению фомепизола представлены различные алгоритмы его дозирования в зависимости от концентрации метанола в крови и тяжести отравления. Однако эти данные, равно как и отдельные упоминания его эффективности при тяжелых и крайне тяжелых отравлениях, метанолом не позволяют с уверенностью утверждать о дополнительных механизмах лечебной эффективности препарата на модели тяжелых отравлений, сопряженных с высокой летальностью при прочих равных условиях. Отсутствие неопровержимых данных эффективности фомепизола также обусловлено комплексным назначением средств коррекции метаболизма метанола (внутривенное и пероральное назначение этанола), метаболического ацидоза (при уровне бикарбонатов менее 15 ммоль/л) и pH среды (менее 7,3) и процедуры гемодиализа при концентрации метанола 50 ммоль/л и более. Поэтому в качестве экспериментальной модели установления возможных изменений токсикодинамики и токсикокинетики метанола в присутствии ингибитора АДН - фомепизола предполагается использовать однородные выборки экспериментальных животных.

Цель. Изучить особенности токсикокинетики и токсикодинамики метанола на экспериментальных моделях сублетальных и летальных отравлений при курсовом введении фомепизола в трех схемах с эскалацией дозы.

Материалы и методы. Эксперименты проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (Решение Совета Евразийской Экономической комиссии от 03.11.2016г. № 81). Исследование одобрено Комитетом по этике биомедицинских исследований ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ о соответствии планируемого экспериментального исследования гуманистическим и этическим нормам (протокол № 4 от 10.04.2021 г.). В исследовании на 268 белых нелинейных крысах-самцах изучено влияние фомепизола на концентрацию формальдегида и муравьиной кислоты, а также ОАА плазмы крови и биохимических маркеров повреждения печени, вызванных острым внутрижелудочным (в/ж) отравлением метанолом тяжелой степени в дозе $\frac{1}{2}$ ЛД₁₆ (2 мл/кг), ЛД₁₆ (4 мл/кг), ЛД₅₀ (7,5 мл/кг) и ЛД₉₉ (12 мл/кг). У отравленных крыс через одинаковые промежутки (10, 20, 30, 45, и 60 мин; 2, 6, 12, 24, 48 и 144 ч) визуально определяли проявления интоксикаций, которым присваивали балльную оценку [12] в нашей модификации:

1 балл – угнетение исследовательского поведения;

2 балла – легкое нарушение координации («заваливание») и гиподинамия;

3 балла – отчетливое «заваливание», незначительная «распластанность» на поверхности (нарушение координации в покое);

4 балла – отчетливая «распластанность» на поверхности, положительная проба на провисание (снижение тонуса мышц конечностей и брюшной стенки);

5 баллов – утрата способности к передвижению;

6 баллов – боковое положение или неспособность принять физиологическое положение при принудительном повороте на бок;

7 баллов – гибель.

После сравнительного анализа зависимости наступления и доли животных с признаками интоксикации проводили изучение эффективности фомепизола. Животные разделяли на группы по 10 особей в каждой, которые отличались схемой введения им фомепизола. Субстанцию фомепизола (Sigma) вводили внутривенно (в/в) по трём схемам, представленным на рисунке 1.

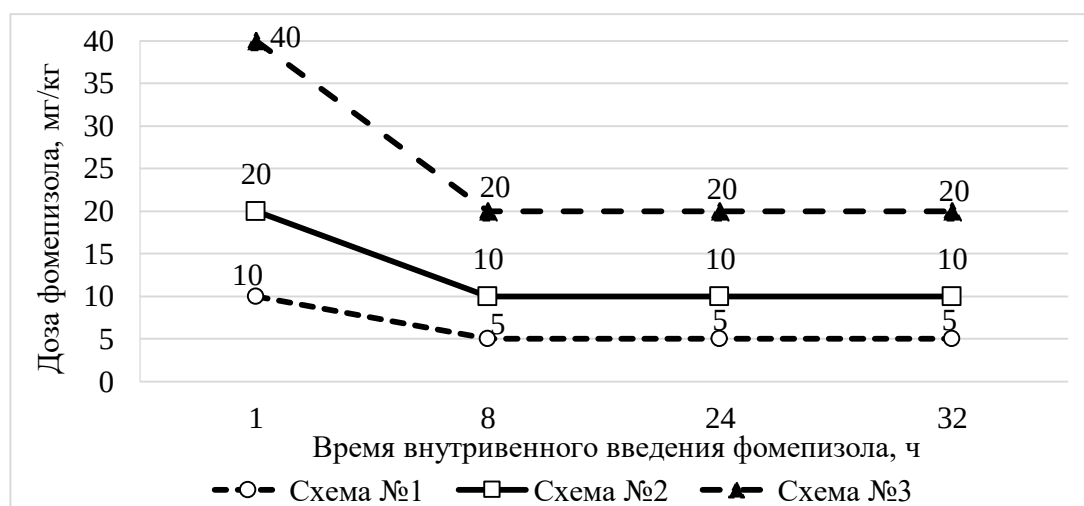


Рисунок 1 - Схемы внутривенного введения фомепизола крысам после внутрижелудочного отравления метанолом

Эвтаназию крыс осуществляли через 1, 2 и 6 ч, а также через 2 и 6 суток с момента отравления метанолом, что позволяло отследить стадии подъема, плато и снижения концентрации его метаболитов, а также маркеров окислительного стресса. В период максимальных проявлений токсического процесса и декомпенсации механизмов жизнеобеспечения (2 суток от момента острого отравления) проводили исследование показателей свободно-радикальных процессов по ОАА плазмы крови. ОАА оценивали по степени связывания стабильного радикала – 2,2-дифенил-1-пикрил-гидразина (ДФПГ) на спектрофотометре Hitachi 2900-U при $\lambda=517$ нм против раствора сравнения с аскорбиновой кислотой (ОАА_{АСК}, мМоль/л) и ингибирования аскорбат-индуцированного окисления твина-80 до малонового диальдегида (МДА) в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК) на спектрофотометре Hitachi 2900 U при $\lambda=532$ нм (ОАА_{ТВИН}, %) [13, 15].

Для оценки токсикокинетики формальдегида и муравьиной кислоты у животных отбирали кровь в пробирки с активатором свертывания крови (3,8 % ЭДТА). Количественное определение метаболитов метанола в крови животных осуществляли по результатам изучения продуктов реакции дериватизации карбонильной группы формальдегида и муравьиной кислоты с пентафторфенилгидразином (рисунок 2).

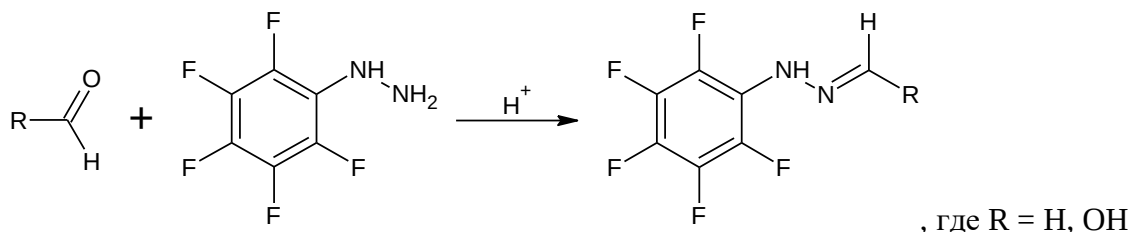


Рисунок 2 – Реакция дериватизации карбонильной группы формальдегида и муравьиной кислоты с пентафторфенилгидразином

Анализ выполняли с помощью жидкостного хроматографа «Agilent Technologies 1260 Infinity», оснащенного градиентным насосом «1260 Quat Pump VL», автосамплером «1260 ALS», термостатом «1290 Thermostat» и tandemным квадрупольно-времяпролётным масс-детектором (Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF) с источником ионизации Dual ESI. Использовали хроматографическую колонку Thermo GOLD aQ, длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размером пор 3 мкм и при обеспечении MassHunter B.04.00.

Для хроматографического разделения исследуемых соединений использовали двухкомпонентную подвижную фазу А (10 ммоль ацетата аммония в деионизированной воде) и фазу Б (ацетонитрил) с градиентом: 0-2 мин 10 % фаза Б, 10-15 мин 90 % фаза Б, 16-20 мин 10 % фаза Б. Температура термостата колонок составляла 35°C.

Исследование проводили в режимах источника ионизации электростатическим распылением при атмосферном давлении и детектирования в ионном токе «High Resolution Mode 4 GHz» с отрицательной полярностью. Скорость потока и температура газа-осушителя составляла 12 л/мин и 350 °C, соответственно, температура газа-испарителя 350 °C, давление на небулайзере – 20 psig, напряжение на фрагменторе, скимере и капилляре 150, 65, 3500 В, соответственно.

Хроматограмма и масс-спектр калибровочного стандарта формальдегида составляли RT = 9,07 мин по выделенному иону m/z 209,0144 и муравьиной кислоты RT = 6,04 мин по выделенному иону m/z 225,0093 представлены на рисунке 3.

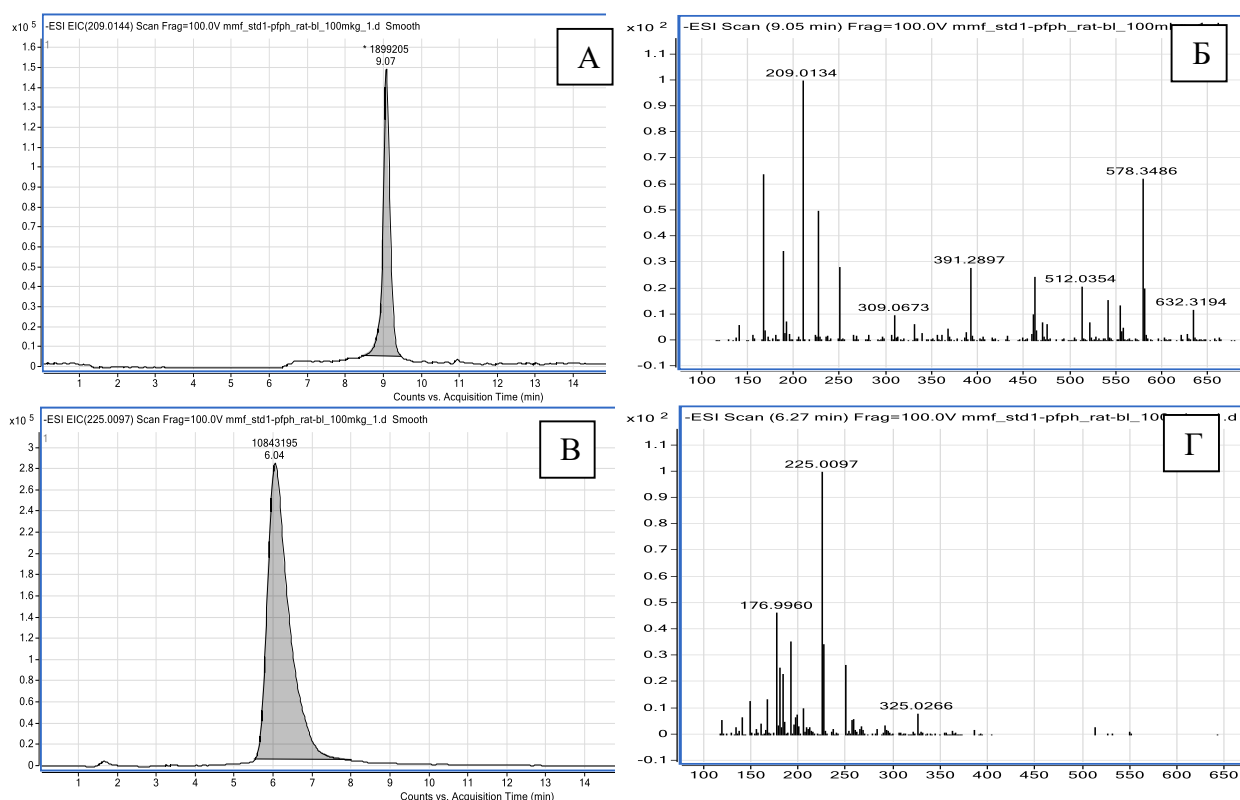


Рисунок 3 – Хроматограмма и масс-спектр калибровочного стандарта формальдегида RT = 9,07 мин (А) по выделенному иону m/z 209,0144 (Б) и муравьиной кислоты RT = 6,04 мин (В) по выделенному иону m/z 225,0093 (Г)

Пробоподготовку проводили по следующей методике. К 500 мкл плазмы крови добавляли 10 мкл 6 М HCl, перемешивали 5 мин на ротатор-миксере и центрифугировали 10 мин при 20000 об/мин. Верхний слой пробы отбирали в пробирки и добавляли 50 мкл пентафторфенилгидразина (50 мг/мл в ацетонитриле), 500 мкл насыщенного раствора NaCl и 2 мл ацетонитрила. Полученную смесь перемешивали 15 мин на ротатор-миксере, центрифугировали 5 мин при 3500 об/мин, верхний слой отбирали в пробирки и упаривали досуха под током азота. Сухой остаток перерастворяли в 500 мкл 20 % раствора ацетонитрила в деионизированной воде.

По данным анализа градуировочных растворов строили калибровочные зависимости площади хроматографических пиков от концентрации веществ в плазме крови, которые носили линейный характер в диапазоне 1-800 мкг/мл с коэффициентом корреляции 0,99. Концентрацию веществ в пробе (C, мкг/мл) рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{S}{K} K_p,$$

где S – площадь хроматографического пика формальдегида или муравьиной кислоты;
K – угловой коэффициент калибровочной кривой;
K_p – коэффициент разбавления.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 10. Расчет мер центральных тенденций и мер рассеяния проводили

общепринятыми статистическими методами. Проверку на нормальность распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения средних величин и установления значимых различий использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Вилкоксона и Краскела-Уоллиса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Отравление метанолом в дозах от $\frac{1}{2}$ ЛД₁₆ до 1 ЛД₉₉ описывалось двухфазным действием токсиканта. В первые часы – основной молекулой, а в последующие сроки – продуктами его биотрансформации. Токсическое действие целой молекулы спирта характеризовалось последовательным утяжелением симптомов интоксикации в период с 10 по 60 мин после его в/ж введения, при этом с увеличением дозы яда интервалы между визуальным проявлением каждого симптома сокращались (рисунок 4).

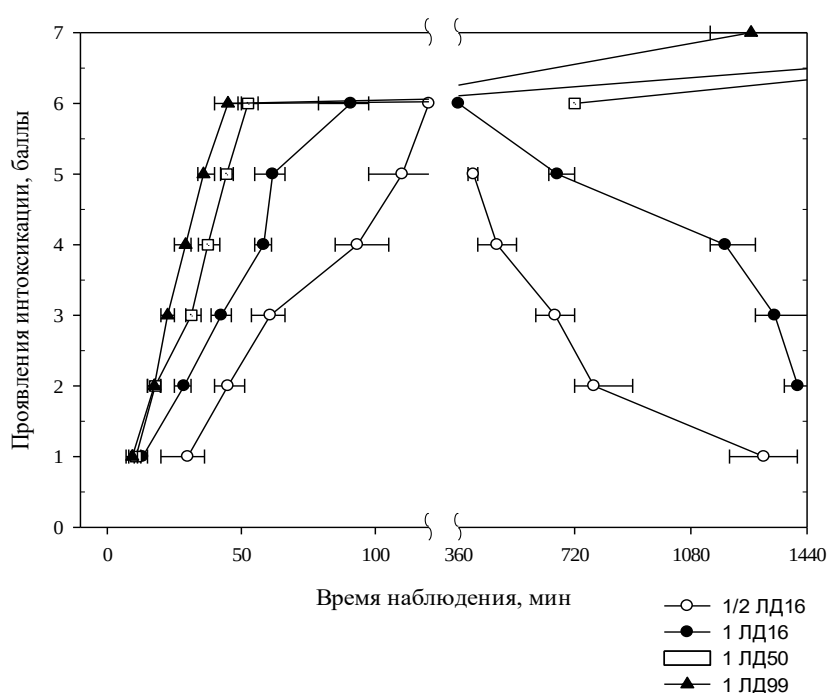


Рисунок 4 – Проявления интоксикации у крыс в различные сроки после в/ж введения метанола

Так, в группе, получавшей метанол в дозе $\frac{1}{2}$ и 1 ЛД₁₆, выраженные нарушения со стороны исследовательской и моторной функции отмечали спустя 1 ч, после отравления тогда как увеличение дозы яда до 1 ЛД₅₀ в 2 раза сокращало этот показатель. Отравления в дозе 1 ЛД₅₀ и 1 ЛД₉₉ сопровождалось угнетением рефлекса переворачивания, гипотонусом, утратой защитных движений с поворотом туловища в сторону раздражителя и развитием бокового положения у всех животных в пределах 1 ч от момента в/ж введения токсиканта.

Дозозависимые изменения также были отмечены по срокам нивелирования проявлений интоксикации. В группе, в которой применяли минимальную дозу токсиканта, через 24 ч внешних проявлений, свидетельствующих о нарушении (изменении) паттернов поведения, исследовательской и двигательной активности не отмечали. Напротив, в группе

с введением метанола в дозе 1 ЛД₅₀ боковое положение животных дополнялось утратой роговичного рефлекса и «прижизненным» высыханием роговицы. Исходом отмеченных признаков в группах с введением токсиканта в дозах 1 ЛД₅₀ и 1 ЛД₉₉ послужила летальность животных на 2-3 сутки и в пределах 24 ч (1440 мин), соответственно. Быстрое развитие несовместимых с жизнью изменений должно напрямую коррелировать с концентрацией основных метаболитов метанола, поэтому в качестве экспериментальных моделей использовали группы животных, отравленных метанолом в сублетальной ($\frac{1}{2}$ ЛД₁₆) и средней летальной (1 ЛД₅₀) дозе.

В результате исследований установлена зависимость концентрации формальдегида в плазме крови от дозы введенного метанола, а также сокращение сроков достижения максимума накопления формальдегида и муравьиной кислоты при тяжелых сублетальных и летальных отравлениях метанолом в дозах $\frac{1}{2}$ ЛД₁₆ и 1 ЛД₅₀ (рисунок 5 А, Б). При анализе динамики появления в крови отравленных животных отмечено быстрое дозозависимое, по отношению к метанолу, нарастание концентрации его первичного метаболита. Так, уже через 1 ч от момента введения метилового спирта концентрация формальдегида 10-и крато превышала показатель у интактных животных. Через 6 ч от начала эксперимента эта разница существенно возрастала, при этом у животных, отравленных ядом в дозе 1 ЛД₅₀, концентрация формальдегида находилась в пределах $148 \pm 16,8$ мкг/кг, тогда как в меньшей дозе прирост показателя составил около $41 \pm 5,3$ мкг/кг. По окончании 1 суток интоксикации прослеживали снижение концентрации формальдегида, при этом у животных, получавших метанол в дозе $\frac{1}{2}$ ЛД₁₆ и 1 ЛД₅₀, показатель достигал уровня интактной группы через 2 и 6 суток, соответственно.

Противоположную динамику фиксировали в отношении уровня муравьиной кислоты, а ее постепенный прирост отмечался вплоть до 6 суток эксперимента. С учетом зависимости концентрации от времени средний подъем муравьиной кислоты в сутки составил около 10 мкг/кг и 100 мкг/кг – для групп животных, получавших метанол в дозе $\frac{1}{2}$ ЛД₁₆ и 1 ЛД₅₀, соответственно. Экстраполируя данные количественного определения основных метаболитов метанола летальность животных, которую наблюдали в период 2-6 суток (для группы отравленных в дозе 1 ЛД₅₀) определялась необратимым цитотоксическим действием муравьиной кислоты в результате существенного нарастания ее концентрации в крови до 235 ± 19 мг/кг и более.

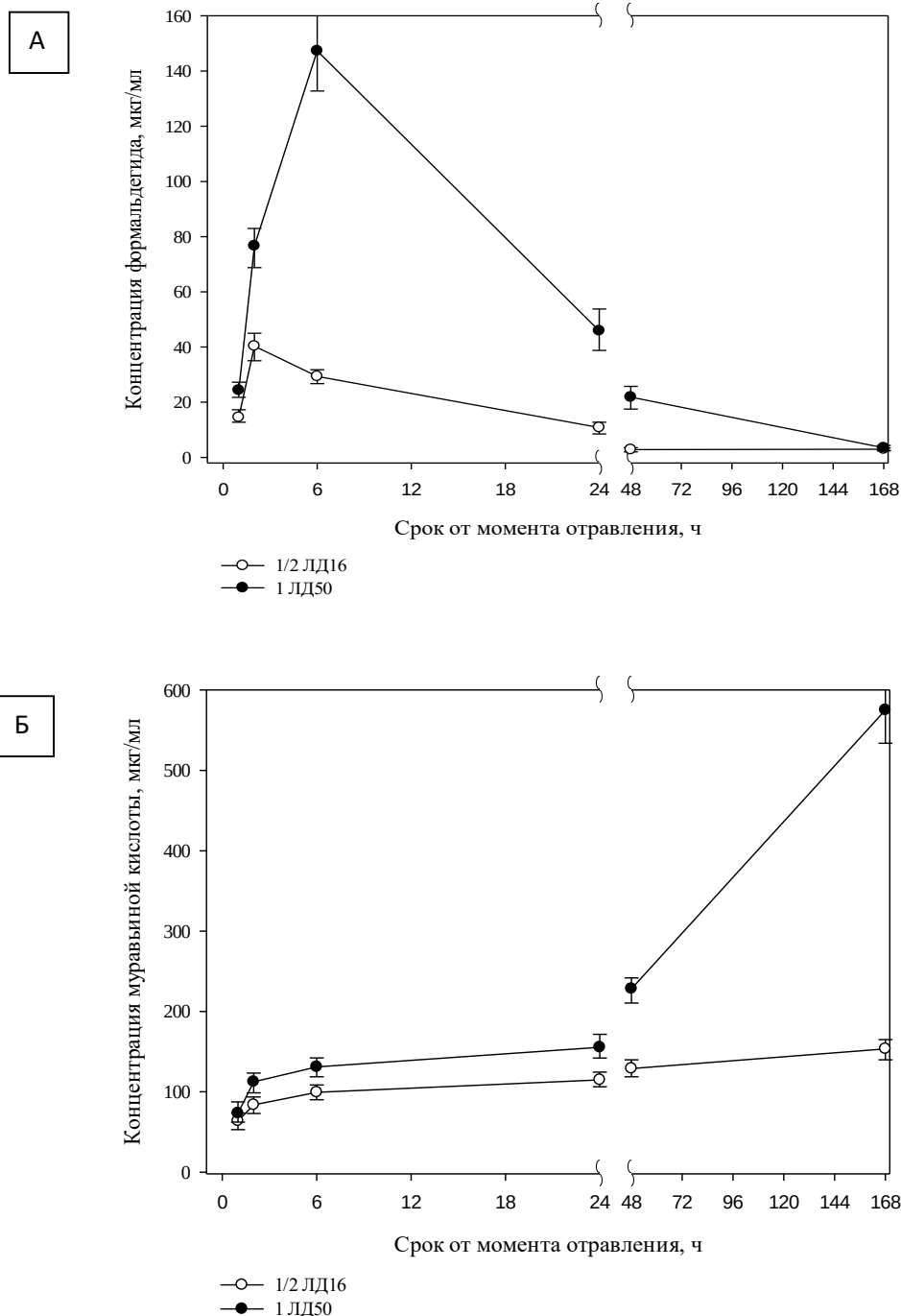


Рисунок 5 – Концентрация формальдегида (А, мкг/кг) и муравьиной кислоты (Б, мкг/кг) в различные сроки после отравления крыс метанолом тяжелой степени
Примечание: у животных интактной группы концентрация формальдегида и муравьиной кислоты составляет $2,7 \pm 0,31$ мкг/кг и $50,2 \pm 4,38$ мкг/кг, соответственно

С целью уменьшения образования продуктов метаболизма метанола, представляющих непосредственную угрозу жизни отравленным, применяли фомепизол, который за счет специфического действия на АДН препятствует образованию формальдегида. С учетом рекомендаций по его применению в клинической практике, а также использованных в настоящем исследовании схем курсового введения (до 32 ч) и

сроков наблюдаемой летальности отравленных животных ($2,8 \pm 0,72$ сутки) в группе, получавшей метанол в дозе 1 ЛД₅₀, сравнительный анализ количественного содержания основных метаболитов проводили через 2 суток после интоксикационного периода, т.е. в срок появления первых случаев гибели животных. Количественное определение показателей в этот срок было также обусловлено целесообразностью сопоставления данных в крайних точках снижения уровня формальдегида и прироста уровня муравьиной кислоты, что представлено ранее на рисунке 5.

Применение фомепизола в трех схемах обеспечивало коррекцию избытка образования формальдегида и, как следствие 2-го основного метаболита, муравьиной кислоты. Необходимо отметить разнонаправленную динамику изменения указанных метаболитов в крови животных (таблица 1).

Таблица 1 - Концентрация формальдегида и муравьиной кислоты (мкг/кг) в крови животных через 2 суток после отравления метанолом и курсового введения фомепизола ($M \pm SD$, $n=10$)

Группа / схема	Концентрация метаболитов при отравлении метанолом в дозе			
	$\frac{1}{2}$ ЛД ₁₆		1 ЛД ₅₀	
	Формальдегид	Муравьиная кислота	Формальдегид	Муравьиная кислота
Контроль отравления	$4,3 \pm 0,84$	$148,9 \pm 26,57$	$20,2 \pm 2,48$	$256,8 \pm 24,27$
Схема 1	$13,6 \pm 1,12^*$	$123,3 \pm 17,12$	$23,4 \pm 2,42$	$208,2 \pm 23,11$
Схема 2	$14,7 \pm 1,67^*$	$91,2 \pm 22,18^*$	$22,7 \pm 2,16$	$134,5 \pm 18,46^*$
Схема 3	$17,9 \pm 1,08^{*,**}$	$95,3 \pm 20,96^*$	$26,4 \pm 4,19$	$122,8 \pm 16,12^*$
Примечания: 1 – * – показатели значимо отличаются от контрольной группы при $p < 0,05$; 2 – ** – показатели значимо отличаются от интактных животных при $p < 0,05$.				

Во всех опытных группах значения формальдегида через 2 суток от момента отравления метанолом значимо отличались от показателей интактной группы ($2,7 \pm 0,31$ мкг/кг). Фомепизол оказывал влияние на уровень формальдегида в крови животных, отравленных метанолом в дозе $\frac{1}{2}$ ЛД₁₆. Так, в группах, получавших фомепизол по схеме 1 и 2, средний показатель более чем в 3 раза превышал значения у контрольной группы, что доказывало участие алкоголь-дегидрогеназного пути в метаболизме метанола крыс и роли данного фермента при окислении метанола в печени, почках и желудочно-кишечном тракте [6]. Зависимость «доз-эффект» в присутствии фомепизола подтверждалась статистической значимостью различий концентраций формальдегида между схемой № 3 и другими схемами терапии. В группе, получавшей фомепизол в максимальной дозе, исследуемый показатель превышал значения контрольной группы более чем в 4 раза, что подтверждало значимость работы АДН в первой стадии окисления метилового спирта в организме крыс.

На модели отравления крыс метанолом в дозе 1 ЛД₅₀, независимо от схемы назначения ингибитора АДН, в опытных группах отмечали сопоставимый уровень формальдегида в плазме крови. Отмеченные наблюдения с одной стороны могли указывать на вторичную роль алкоголь-дегидрогеназного пути метаболизма метанола под действием АДН или CYP 2E1 печени, а с другой стороны могли быть следствием перераспределения избытка формальдегида из ткани головного мозга обратно в кровь. Последнее предположение могло быть обусловлено интенсификацией работы процессов окисления метилового спирта в присутствии каталазы, активность которой могла существенно возрастать на фоне метанол-индуцированного прироста H₂O₂ в цитозоле нейронов и их глиального окружения [7].

Применение фомепизола по схеме № 2 и № 3 обеспечивало статистически значимое снижение концентрации муравьиной кислоты в крови как в группе крыс, получавших метанол в дозе ½ ЛД₅₀, так и в группе, получавших метанол в дозе 1 ЛД₅₀. Несмотря на снижение муравьиной кислоты в этих экспериментальных группах относительно нелеченых животных в среднем в 1,5 и 2 раза, соответственно, ее абсолютные значения не достигали показателя интактной группы (50,2±4,38 мкг/кг). Низкие дозы курсового применения фомепизола (схема № 1), а также прекращение его назначения по прошествии 32 ч от момента отравления животных метанолом в дозе 1 ЛД₅₀ послужили причиной их гибели. В ходе сравнительного анализа доли погибших животных контрольной и опытных групп каких-либо значимых отличий между ними отмечено не было. Необходимо также указать на возможную роль накопления муравьиной кислоты в головном мозге крыс под действием каталазы и ALDH-3, которая в совокупности с формальдегидом угнетает ферменты гликолиза, транспорт электронов и протонов по цепи дыхательных ферментов митохондрий и приводит к падению АТФ, несовместимому с работой нейроглиального микроокружения.

Учитывая значимую роль процессов свободно-радикального окисления в реакциях детоксикации метанола, а также в процессах тканевого повреждения химической этиологии, количественно оценивали ОАА плазмы крови (таблица 2).

Таблица 2 – Общая антиокислительная активность плазмы крови животных через 2 суток после отравления метанолом и курсового введения фомепизола (М±м, n=10)

Экспериментальные группы, доза	Схема введения фомепизола	ОАА _{АСК} , мМоль/л	ОАА _{ТВИН} , %
Интактные животные	-	14,3±1,21	45,7±5,62
Отравление метанолом в дозе ½ ЛД ₁₆	-	6,6±0,78#	25,6±2,87#
	Схема № 1	9,8±1,01 #,*	31,3±2,96#
	Схема № 2	11,5±1,24*	33,4±3,15#*
	Схема № 3	11,9±1,18*	36,1±3,52#,*

Отравление метанолом в дозе 1 ЛД ₅₀	-	5,3±0,79#	16,6±1,74#
	Схема № 1	8,6±1,05#	22,6±2,13#
	Схема № 2	10,7±0,97#,*	25,3±3,04#,*
	Схема № 3	10,8±1,08#,*	27,0±2,65#,*
Примечания: 1 - * - показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы при $p \leq 0,05$; 2 - ** - показатели статистически значимо отличаются от интактных животных при $p \leq 0,05$.			

В ходе исследования ОАА плазмы крови регистрировали частичное восстановление показателя как по способности связыватьДФПГ, так и предупреждать протекание реакции с 2-ТБК. Наиболее убедительные данные прослежены для схем № 2 и 3, в соответствии с которыми курсовое введение фомепизола обеспечивало статистически значимое повышение ОАА_{АСК} практически в 2 раза и ОАА_{ТВИН} в среднем в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой животных. Для групп животных, получавших метанол в сублетальной дозе, применение фомепизола в обеих схемах обеспечивало достижение уровня ОАА_{АСК} плазмы крови до уровня интактных животных, тогда как восстановление ОАА_{ТВИН} было частичным. Эта особенность, а также отсутствие статистической значимости показателей для схемы № 1 от контрольных значений косвенно свидетельствует о сопоставимых реакциях липидной пероксидации и образования гидроперекисей в плазме крови отравленных животных, получавших и не получавших фомепизол. Такое предположение в определенной степени подтверждается данными об одинаковом приросте 2-ТБК-связанных продуктов и, по всей видимости МДА, при добавлении в реакционную среду сернокислого железа (II). Учитывая высокую роль присутствия металлов с переменной степени окисления в образовании гидроксильного радикала можно предположить его участие в реакциях, протекающих в биологических образцах крови отравленных животных и, следовательно, в повышении активности прооксидантной системы.

Заключение. Проведенные исследования показали, что курсовое применение обратимого ингибитора АДН фомепизола при лечении отравлений крыс метанолом тяжелой степени приводит к существенному нарастанию концентрации формальдегида в первые 6 часов от момента внутрижелудочного введения токсиканта. Летальность животных в период 2-6 суток связана с нарастанием плазменной концентрации муравьиной кислоты в 5-11 раз, относительно интактных животных. Лечение фомепизолом обеспечивало дозозависимое снижение концентрации муравьиной кислоты через 2 суток после отравления метанолом в сублетальной и летальной дозах. Фомепизол обеспечивал частичное восстановление ОАА плазмы крови, по способности связывать стабильный радикалДФПГ и ингибированию окисления 2-ТБК.

Отмеченные особенности могли быть следствием полиэтиологичной природой протекания свободно-радикальных процессов, а также объясняться переключением большего числа молекул каталазы на окисление формальдегида. Полученная разница также могла быть обусловлена рецепторным взаимодействием, активируемым пероксисомными пролифераторами (PPARs) на ядерной мембране клетки и последующим образованием димера с ретиноидным X-рецептором (RXR). Доказательством этого служит установленная роль PPARs в корреляции уровня экспрессии каталазы пероксисом с клиренсом выведения алкоголя у животных и триптофан-зависимого восстановления уровня NAD^+ [19].

Литература.

1. Criner G.J., Barnette R.E., D'Alonzo G. E. Critical Care Study Guide: Text and review. 2nd ed., New York, Springer, 2010. 1829 p. doi:10.1007/978-0-387-77452-7.
2. Rietjens, S.J. Ethylene glycol or methanol intoxication: which antidote should be used, fomepizole or ethanol? / S.J. Rietjens, D.W. de Lange, J. Meulenbelt // Neth.J.Med. – 2014. – Vol. 72, № 2. – P. 73-79.
3. Малютина, Н.Н. Патофизиологические и клинические аспекты воздействия метанола и формальдегида на организм человека / Н.Н. Малютина, Л.А. Тараненко // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 1-11.
4. Shafi, H. Eight fatalities due to drinking methanol-tainted alcohol in Pakistan: A case report / H. Shafi, M. Imran, H. F. Usman and et.al. / Egyptian journal of forensic sciences. – 2016. – Vol. 6, № 4. – P. 515-519. doi.org/10.1016/j.ejfs.2016.06.004.
5. <http://www.interfax.ru/Russia/797087>.
6. Panaloz, C.G. Hight sensitivity of femail cell to ethanol: methylation of DNA lowers Cyp2e1, generation more ROS / C.G. Panaloz, M. Cruz, G. Germain and et.al. // Cell Commun Signal. – 2020. – Vol.18, № 1. – P. 111. doi: 10.1186/s12964-0220-00616-8.
7. El-Mas, M.M. Enhanced catabolism to acetaldehyde in rostral ventrolateral medullary neurons accounts for the pressor effect of ethanol in spontaneously hypertensive rats / M.M. El-Mas, A.A. Abdel-Rahman / Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol. – 2012. – Vol.302, №3. – P. H837-44. doi: 10.1152/ajpheart.00958.2011.
8. Jiang, Y. Alcohol metabolizing enzymes, microsomal ethanol oxidizing system, cytochrome P450 2E1, catalase, and aldehyde dehydrogenase in alcohol-associated liver disease / Y. Jiang, T. Zhang, P. Kusumanchi and et.al. // Biomedicines. – 2020. – Vol.8, №3. – P. 50. doi:10.3390/biomedicines8030050.
9. Manni, M.A. Monoamine oxidase is overactivated in left and right ventricles from ischemic hearts: an intriguing therapeutic target / M.A. Manni, S. Rigacci, V. Borchì and et.al. //

Oxidative Medicine and cellular longevity. – 2016. – Vol. 2016. – 10 p. doi.org/10.1155/2016/4375418.

10. Ransy, C. Use of H₂O₂ to cause oxidative stress, the catalase issue / C. Ransy, C. Vaz, F. Bouillaud // Int.J.mol.Sci. – 2020. – Vol. 21, № 23. – P. 9149. doi: 10.3390/ijms21239149.

11. Yu, H.J. Apoptosis induced by methanolextract of potentilla discolor in human mucoepidermoid carcinoma cells through STAT3/PuMA signaling axis / H.J. Yu, I.H. Ahn, I.H. Yang and et.al. // Mol.Med.Rep. – 2018. Vol.17, №5. – P. 5258-5264. doi:10.3892/mmr.2018.8468.

12. Нужный, В.П. Влияние компонентов сивушного масла на эфиральдегидной фракции на острую токсичность и наркотическое действие этилового спирта / В.П. Нужный, И.В. Демешина, И.Г. Забирова и др. // Токсикол. вестник. – 1999. – № 2. – С. 2-8.

13. Арутюнян А.В. Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубровина, Н.Н. Зыбина. – Методические рекомендации под ред. чл.-корр. РАМН В.Х. Хавинсона.

14. Pressman, P. A review of methanol poisoning: a crisis beyond ocular toxicology / P. Pressman, R. Clemens, S. Sahu and et.al.] // Cutaneous and ocular toxicology. – 2020. – P. 173-179.

15. Курашвили, Л.В. Липидный метаболизм при неотложных состояниях / Л.В. Курашвили, В.Г. Васильков. Пенза. – 2003. – С. 145.

16. Алкоголизм и наркомания в регионах Российской Федерации: оценка масштаба проблемы на основе доступных статистических данных. Информационная платформа «Если быть точным», 2021. – 61 с.

17. Drick, N. Fomepizole, ethanol or dialysis in the case of life-threatening ethylenglycol intoxication? / N. Drick, J.J. Schmidt, O.Wiesner and et.al. // Med Klin Intensivmed Notfmed. – 2021. – Vol. 116, № 8. P. 698-701. doi: 10.1007/s00063-020-00718-8.

18. Rasamison, R. Analysis of fomepizole safety based on a 16-year post-marketing experience in France / R. Rasamison, H. Besson, M-P. Berleur and et.al. // Clin Toxicol (Phila). – 2020. – Vol. 58, № 7. P. 742-747. doi: 10.1080/15563650.2019.1676899.

19. Yue, R. Activation of PPAR α -catalase pathway reverses alcogolic liver injury via upregulating NAD synthesis and accelerating alcohol clearance / R. Yue, G-y Chen, G. Xie and et.al. // Free radical biology and medicine. - 2021. – Vol.174. – P. 249-263.