

А.В. Машанов<sup>1</sup>, Г.Г. Юшков<sup>1</sup>, В.В. Бенеманский<sup>1</sup>, Т.М. Филиппова<sup>1</sup>, А.Ю. Федорин<sup>2</sup>

**КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ГОМЕОСТАЗА ОРГАНИЗМА КРЫС В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ЭТАНОЛОМ ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ ХЕЛАТНОГО СОЕДИНЕНИЯ ЦИНКА. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ 2,8,9-ТРИГИДРОЦИНКАТРАНА**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия» (Ангарск)

<sup>2</sup> Центр внедрения технологий «Инноком» (Иркутск)

*Экспериментально доказано, что новое хелатное соединение цинка 2,8,9-тригидроцинкатран оказывает протективное действие на организм подопытных животных, способствуя нормализации основных метаболических процессов.*

*Однократное внутрижелудочное введение 2,8,9-ТГЦА в протективной дозе 4 мг/кг является эффективным способом ограничения развития острого отравления алкогольного генеза у подопытных крыс, что способствует повышению устойчивости организма животных к множественным негативным эффектам этанола и его метаболитов.*

**Ключевые слова:** 2,8,9-тригидроцинкатран, острое отравление этанолом, алкогольдегидрогеназа, протективное действие

**CORRECTION OF DYSCRASIA OF THE ORGANISM OF RATS IN THE CONDITIONS OF ACUTE ETHANOL POISONING BY THE INTRODUCTION OF CHELATE ZINC COMPOUND. MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PROTECTIVE ACTION OF THE 2,8,9-TRIHIDROZINKATRANE**

A.V. Mashanov<sup>1</sup>, G.G. Yushkov<sup>1</sup>, V.V. Benemanskiy<sup>1</sup>, T.M. Filippova<sup>1</sup>, A.Yu. Fedorin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Angarsk State Technical Academy, Angarsk

<sup>2</sup> Centre of Introduction of Technologies «Innocom», Irkutsk

*It is experimentally proved that the new zinc chelate compound 2,8,9-trihydrozinkatrane has a protective effect on the organism of experimental animals contributing to the improvement of essential metabolic processes.*

*Single intragastric introduction of 2,8,9-trihydrozincatrane in protective dose of 4 mg/kg is an effective method of limitation of development of acute alcoholic poisoning in experimental rats that promotes an increase of tolerance of animals' organisms to multiple negative effects of ethanol and its metabolites.*

**Key words:** 2,8,9-trihydrozincatrane, acute ethanol poisoning, alcohol dehydrogenase, protective action

**ВВЕДЕНИЕ**

По данным Федеральной службы государственной статистики и Министерства здравоохранения, в России на одного человека приходится до 18 литров чистого алкоголя в год. К неотложным состояниям, ассоциированным со злоупотреблением алкоголем, в медицинской практике относят, в частности, и острые отравления этанолом (ОЭ) [13].

При значительном количестве исследований, посвященных отдельным аспектам экспериментальной и клинической терапии хронических отравлений этанолом (алкоголизма), отсутствуют работы, отражающие вопросы саногенеза ОЭ при действии протективных препаратов, в частности, цинксодержащих.

В этом плане большой интерес представляет новый хелатный комплекс цинка с триэтаноломином (2,8,9-тригидроцинкатран, 2,8,9-ТГЦА), в котором цинк, как и в природных соединениях, связан координационными связями с лигандами (триэтанолламин и два аниона уксусной кислоты) [4]. Немаловажным является то, что одним из структурных компонентов этого комплекса является триэтанолламин, продукты биотрансформации которого обладают высокой биологической активностью [8, 9].

Целью настоящего исследования являлось морфофункциональное обоснование протективного действия нового хелатного соединения цинка 2,8,9-ТГЦА в условиях экспериментального ОЭ.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Экспериментальное исследование выполнено на 108 белых нелинейных крысах-самцах массой 180–220 г разведения специализированного вивария (ветеринарное удостоверение 238 № 0018942). На протяжении всего эксперимента крысы содержались в пластиковых клетках при естественном освещении со свободным доступом к комбикорму и воде.

Все животные были разделены на три серии по 36 крыс в каждой: 1) интактный контроль ( $n = 12$ ); 2) позитивный контроль ( $n = 12$ ) – животным внутрижелудочно вводили только этанол (40 об. %) в дозе 12 г/кг, однократно; 3) подопытные крысы ( $n = 12$ ), которым сразу после моделирования ОЭ внутрижелудочно однократно вводили этанольный (5 об. %) раствор 2,8,9-ТГЦА (экспериментальная коррекция) в дозе 4 мг/кг. Интактные животные получали только воду из поилок в режиме свободного доступа.

Хелатное соединение цинка 2,8,9-ТГЦА представляет собой внутримолекулярный трициклический комплекс трис(2-гидроксиэтил)амин (триэтанолламина) с диацетатом цинка, отвечающий формуле  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}\cdot[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3\text{N}]$ . Исследуемое соединение было синтезировано в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского и предоставлено Центром внедрения технологий «Инноком» (г. Иркутск). Это порошок белого цвета, плохо растворимый в воде и растворимый в этаноле (5 % об.). Соотношение триэтанолламина с диацетатом цинка – 1 : 1. Подлинность химической структуры 2,8,9-ТГЦА подтверждена ЯМР-спектроскопией и элементным анализом [4].

Исследование выполнено, согласно этическим требованиям к работе с экспериментальными животными, изложенным в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) [7]. Чтобы избежать влияния суточных биоритмов на величины показателей, взятие крови и фрагментов органов после декапитации осуществляли в одно и то же время (10.00–10.30). Биосубстрат у подопытных и контрольных животных брался прижизненно (сроки наблюдения – 30 минут и 1-е сутки), за исключением 3-х суток (у выживших животных).

В качестве материала использовали сыворотку крови, гемолизат эритроцитов и гомогенат печени. Определение содержания маркеров процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – гидропероксидов липидов (ГПЛ,  $\Delta\text{E}/\text{мл}$ ), диеновых конъюгатов (ДК,  $\Delta\text{E}/\text{мл}$ ) проводили по методу В.Б. Гаврилова и М.И. Мишкорудной [2]; содержания ТБК-активных продуктов ПОЛ (ТБК-АП,  $\text{нмоль}/\text{мл}$ ) – по методу И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили [12]. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ,  $\text{мг P}/\text{ч}\cdot\text{г}$ ) определяли по методу A. Bodansky, содержание гликогена ( $\text{г}/\text{кг}$ ) – по методу S. Seifter. Активность каталазы (каталазное число) определяли перманганатметрическим методом; пероксидаз ( $\text{мкмоль индигокармина}/\text{мин}\cdot\text{мл}$ ) – по методу Г. Попова и Л. Нейковска [11]; восстановленного глутатиона (GSH,  $\text{мкмоль}/\text{мл}$ ) – по методу J. Sedlak и R.H. Lindsay [14]. Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ,  $\text{ед}/\text{л}$ ) и ЩФ ( $\text{ммоль P}/\text{ч}\cdot\text{л}$ ) определяли кинетическим методом, уровни глюкозы ( $\text{ммоль}/\text{л}$ ) – глюкозооксидазным методом, мочевины ( $\text{ммоль}/\text{л}$ ) – кинетическим уреазным методом, холестерина ( $\text{ммоль}/\text{л}$ ) – ферментативным методом, общего белка ( $\text{г}/\text{л}$ ) – биуретовым методом на биохимическом анализаторе «EuroLysер» (EUROLab, Instruments GmbH; Австрия) с использованием стандартных наборов реактивов, согласно приложенным к ним инструкциям.

Материалом для гистологических и гистохимических исследований служили фрагменты органов (печень, головной мозг) подопытных и контрольных крыс. Органы фиксировали в 10% нейтральном формалине, осуществляли проводку и заливку в парафин + воск.

С каждого блока получали серийные срезы (5  $\mu\text{м}$ ) и окрашивали их гематоксилин-эозином [5]. В нефиксированных срезах печени (10  $\mu\text{м}$ ), приготовленных на криостате, гистохимически определяли

содержание общих липидов (судан III), гликогена (по Мак-Манусу), активность ЩФ (по Берстону), сукцинатдегидрогеназы (СДГ, по Нахласу), моноаминоксидазы (МАО, по Гленнеру), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, по Гессу, Скарпелли и Пирсу) [10].

Статистический анализ полученных результатов проводили в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2007, входящем в состав лицензионного пакета офисных приложений для комплексной обработки данных Microsoft Office 2007 (Microsoft, США); правообладатель лицензии – ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия». Статистическую значимость различий данных опыта и контроля оценивали с использованием параметрических *t*-критерия Стьюдента и *F*-критерия Фишера, а также непараметрического *U*-критерия Манна – Уитни. Характер и степень выраженности взаимосвязей между количественными признаками определяли по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Различия между экспериментальными данными, полученными в группах опыта и контроля, считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о развитии характерных признаков острого (для части животных – смертельного) отравления этанолом. При этом различия в величинах избранных показателей у животных разных групп были статистически значимыми.

В подопытных группах (моделирование ООЭ + коррекция 2,8,9-ТГЦА) было отмечено достоверное ( $p < 0,05$ – $0,001$ ) снижение сывороточных уровней АлАТ на всех сроках наблюдения, по сравнению с группами позитивного контроля. Активность ЩФ в сыворотке крови подопытных крыс на протяжении всего эксперимента практически не отличалась от интактного контроля, что также свидетельствовало об уменьшении тяжести повреждения печени. Данная картина также подтверждалась наличием уже на сроке наблюдения 30 минут тенденцией к отрицательной корреляции между сывороточным уровнем АлАТ и содержанием ЩФ в гомогенате печени ( $r_s = -0,446$ ;  $p = 0,18$ ).

В группах позитивного контроля степень выраженности процессов цитолиза гепатоцитов оставалась наиболее высокой на всех сроках наблюдения. Средние значения активности печеночных ферментов в сыворотке крови этих крыс оказались статистически значимо выше ( $p < 0,01$ – $0,0001$ ), чем в интактном контроле. Таким образом, выявленные при моделировании ООЭ (в позитивном контроле) значительные нарушения катаболических и биоэнергетических процессов свидетельствуют о том, что гепатоциты испытывают недостаток энергии и пластических интермедиатов для основных метаболических процессов. В связи с этим нарушаются процессы обновления структурных и рецепторных компонентов гепатоцитов, и, как следствие, происходит нарушение контроля за процессами деления клеток в организме животных.

Морфологически в печени подопытных крыс на 1-е сутки наблюдения отмечались лишь единичные очаги вакуолизации цитоплазмы гепатоцитов в области триады и умеренно выраженное застойное полнокровие центральной вены и капилляров. Клетки Купфера были несколько увеличены в размере, эпителий желчных протоков – без изменений, очагов инфильтрации воспалительными клетками не выявлено, т.е. негативные изменения в опыте имели меньшую степень выраженности, по сравнению с позитивным контролем.

В коре головного мозга был отмечен умеренно выраженный периваскулярный отек, нейроны – без изменений. Это позволило сделать вывод о снижении нейротоксического действия этанола в дозе 12 г/кг на организм подопытных животных при коррекции ООЭ хелатным соединением цинка. Морфологическая структура тканей других органов у подопытных животных соответствовала интактному контролю.

В отличие от животных в группах позитивного контроля, на 1-е сутки у подопытных крыс дисбаланса гистохимических показателей не выявлено. Напротив, установлено повышение активности ЛДГ, СДГ и МАО на 1–2 балла, увеличение содержания гликогена на 2–3 балла, по сравнению с позитивным контролем; активность ЩФ снизилась на 2–3 балла, уровень общих липидов – на 1–2 балла.

Введение подопытным животным 2,8,9-ТГЦА в дозе 4 мг/кг после воздействия этанолом в дозе 12 г/кг оказало стимулирующее влияние на метаболические процессы в организме, что проявилось в достоверном росте уровней гликогена (в гомогенате печени) и глюкозы (в сыворотке крови) на 1-е сутки наблюдения, по сравнению с позитивным контролем. На это также указывала сильная корреляция между содержанием глюкозы в сыворотке крови подопытных крыс (этанол + 2,8,9-ТГЦА) и уровнем общего белка ( $r_s = 0,652$ ;  $p < 0,05$ ).

Тенденция к стабилизации процессов метаболизма является следствием того, что ингибирование хелатным соединением цинка активности алкогольдегидрогеназы (АДГ) препятствует образованию избыточного ацетальдегида [4]. Таким образом, однократное внутривенное введение 2,8,9-ТГЦА в организм подопытных крыс положительно влияет на показатели состояния функций печени при ООЭ, стимулируя процессы глюконеогенеза и способствуя восстановлению процессов углеводного обмена до уровня интактного контроля.

Исследование первичного звена процессов ПОЛ у животных, которым вводили 2,8,9-ТГЦА в дозе 4 мг/кг после этанола в дозе 12 г/кг, выявило отсутствие активации пероксидации липидов, т.к. уровни продуктов процессов ПОЛ в сыворотке крови на всех сроках наблюдения были статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ – $0,001$ ), чем в позитивном контроле, и практически не отличались от таковых у крыс, составивших группы интактного контроля ( $p > 0,05$ ). Более того, на 1-е сутки наблюдения установлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем ГПЛ и содержанием глюкозы ( $r_s = -0,844$ ;  $p < 0,05$ ), свидетельствующая об уменьшении степени повреждения печени как источника липидов.

В условиях экспериментальной коррекции ООЭ хелатным соединением цинка на первый план выступила выраженная активация ферментных и неферментных факторов системы антиоксидантной защиты (АОЗ), что отразилось уже на сроке наблюдения 30 минут в наличии статистически значимой положительной корреляции между растущим содержанием мочевины и уровнем каталазы ( $r_s = 0,853$ ;  $p < 0,05$ ). Данная картина получила дальнейшее развитие на 1-е сутки (мочевина – пероксидазы:  $r_s = 0,712$ ;  $p < 0,05$ ).

Также на 1-е сутки наблюдения отмечена тенденция к положительной корреляции между сывороточным содержанием мочевины и уровнями каталазы ( $r_s = 0,248$ ;  $p = 0,50$ ) и GSH ( $r_s = 0,318$ ;  $p = 0,36$ ). Не исключено, что именно вследствие ослабления интенсивности процессов ПОЛ и стимулирования антиокислительных реакций у подопытных крыс после введения 2,8,9-ТГЦА практически не проявил себя такой антиоксидантный фактор, как холестерол [3, 6], содержание которого в опыте было достоверно ниже, по сравнению с позитивным контролем ( $p < 0,01$ ), и практически не отличалось от уровня интактного контроля ( $p > 0,05$ ).

Вследствие высокой сложности процессов фармакодинамики и фармакокинетики химических веществ в организме в отношении 2,8,9-ТГЦА данные исследования не проводились. Однако учитывая сведения из литературы о несколько похожем препарате «Ацизол» [1], можно считать, что хелатное соединение цинка достаточно быстро абсорбируется из желудочно-кишечного тракта и достигает места приложения своего действия с оптимумом в 1–1,5 часа, сопоставимым со скоростью всасывания этанола. Все это также обуславливает протективные свойства 2,8,9-ТГЦА. Предварительные доклинические исследования показали, что хелатное соединение цинка метаболизируется в печени.

Фармакодинамика же, возможно, заключается как в связывании атомов цинка молекулы АДГ с этанольными радикалами молекулы протектора, так и в блокировании молекул субстрата (этанола) цинком, входящим в состав хелатного соединения [4]. Также имеется вероятность того, что в организме подопытных животных 2,8,9-ТГЦА распадается на ряд активных соединений, в частности, этаноламин, который, по данным литературы [8, 9], способен ингибировать активность АДГ. Не исключено, что 2,8,9-ТГЦА как комплексное цинкорганическое соединение способен восполнять дефицит цинка в организме.

Хелатное соединение цинка 2,8,9-ТГЦА является ведущим саногенетическим звеном, непосредственно ингибируя активность АДГ в печени подопытных животных и снижая тем самым интенсивность процесса образования ацетальдегида, а следовательно, и уксусной кислоты. При этом увеличивается объем химически неизмененного этанола, выводимого из организма крыс. В системе «ПОЛ – АОЗ» происходит сдвиг равновесия в сторону активации антиокислительных факторов, процессы липопероксидации находятся на уровне интактного контроля, вследствие чего снижается тяжесть проявления как метаболического ацидоза, так и отравления организма в целом [4].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представленные факты позволили сделать выводы об интенсивном влиянии 2,8,9-ТГЦА на обменные процессы в организме подопытных крыс, что выразилось, в частности, в эффективном ограничении повреждения печени под воздействием нового хелатного соединения цинка.

Приведенные экспериментальные данные показали, что эффективным способом ограничения развития острого отравления алкогольного генеза у подопытных крыс является однократное внутрижелудочное введение 2,8,9-ТГЦА в протективной дозе 4 мг/кг, что способствует повышению устойчивости организма животных к множественным негативным эффектам этанола и его метаболитов.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Ацизол – инструкция по медицинскому применению препарата [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.medi.ru/doc/x1133.htm> (дата обращения: 25.05.2012).
2. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–36.
3. Дядик В.П., Бычкова В.И. Перекисное окисление липидов и их обмен при вирусном гепатите В и циррозе печени // Врач. дело. – 1986. – № 11. – С. 114–117.
4. Машанов А.В. Морфо-метаболические аспекты острого отравления этанолом и его патогенетически обоснованная коррекция хелатным соединением цинка 2,8,9-тригидроцинкатраном (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 2012. – 23 с.
5. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.
6. Михельсон В.А., Клевко В.А., Мухин В.Х. и др. Состояние реакции перекисного окисления липидов

и  $\alpha$ -токоферола у детей в ближайшем послеоперационном периоде // Вестн. АМН СССР. – 1988. – № 9. – С. 56–61.

7. О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных: приказ МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 755 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.inforpavo.by.ru/fed1991/ch03/akt15487.shtml> (дата обращения: 07.06.2011).

8. Островский С.Ю., Арцукевич И.М. Изучение взаимодействия этаноламина с алкогольдегидрогеназой из печени лошади // Биохимия. – 1989. – Т. 54, Вып. 11. – С. 1888–1893.

9. Островский С.Ю., Горенштейн Б.И., Быков И.Л. Свободные аминокислоты мозга при умеренной алкоголизации животных и введении этаноламина // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, Вып. 6. – С. 63–66.

10. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и практическая; пер. с англ. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 962 с.

11. Портяная Н.И., Осипенко Б.Г., Москадынова П.А. и др. Биохимические исследования в токсикологическом эксперименте / Под ред. М.Ф. Савченкова, В.М. Прусакова. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1990. – 216 с.

12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью титобарбитуровой кислоты / Под ред. В.Н. Ореховича // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.

13. Тихоновская Е.Ю. Оптимизация терапии неотложных состояний, ассоциированных с приемом этанола у соматических больных в многопрофильном стационаре: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010. – 24 с.

14. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Anal. Biochem. – 1968. – Vol. 25. – P. 192–205.

**Сведения об авторах**

**Машанов Антон Владимирович** – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник НИИ биофизики ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия» (665830, Иркутская область, г. Ангарск, ул. Партизанская, 2; тел.: 8 (3955) 95-70-68; e-mail: mashan\_rivr@mail.ru)

**Юшков Геннадий Георгиевич** – кандидат медицинских наук, профессор кафедры экологии и безопасности деятельности человека ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия»

**Бенеманский Виктор Викторович** – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник НИИ биофизики ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия»

**Филиппова Тамара Матвеевна** – кандидат химических наук, профессор, заведующая кафедрой экологии и безопасности деятельности человека ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия»

**Федорин Андрей Юрьевич** – директор Центра внедрения технологий «Инноком»