

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА АДДИКТИВНЫЕ СВОЙСТВА И ТОКСИЧНОСТЬ ЭТАНОЛА У КРЫС

Морковин Е.И.^{1,2}, Куркин Д.В.^{1,3}, Кнышова Л.П.¹, Бакулин Д.А.¹, Осадченко Н.А.⁴, Абросимова Е.Е.⁴, Тарасов А.С.¹, Пустынников В.Э.³, Саблина Л.А.⁴, Воронцов М.Ю.⁴, Быкова А.С.⁴

¹ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Научный центр инновационных лекарственных средств, Волгоград, e-mail: strannik986@mail.ru;

²ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», Волгоград;

³ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Межкафедральный центр отработки практических навыков и НИР фармацевтического факультета, Волгоград;

⁴ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Кафедра фармакологии и фармации ИИМФО, Волгоград

В данной работе представлен результат исследования эффективности ацетилцистеина (1 г/кг, *p/o*) в отношении формирования аддикции и токсического действия этанола на печень крыс в условиях подострой алкогольной интоксикации. Исследование выполняли на 30 крысах (самцах). Все животные были поделены на 3 группы: опытную, отрицательного и положительного контроля. Этанол вводили в дозе 2 г/кг/сут (*v/b*) в течение 4 суток. Введение ацетилцистеина выполняли после восстановления установочного рефлекса, утраченного в результате введения этанола. Аддиктивный эффект оценивали в тесте предпочтения места по количеству проведенного времени в камере, ассоциированной с введением этанола. Гепатотоксичность оценивали по уровню триглицеридов и глутатиона печени. Показано, что у крыс, получавших ацетилцистеин после алкогольной интоксикации, аддиктивное поведение было менее выражено по сравнению с животными контрольной группы. Также было показано, что введение ацетилцистеина значительно снижало токсическое действие этанола, что выражалось в увеличении уровня глутатиона гепатоцитов и снижении триглицеридов. Таким образом, введение ацетилцистеина в условиях повторяющегося воздействия этанола способствует снижению привыкания и улучшает функциональное состояние печени, частично предотвращая истощение энергетических запасов гепатоцитов.

Ключевые слова: этанол, аддикция, токсичность, печень, похмелье, ацетилцистеин, крысы.

EFFECT OF ACETYLCYSTEINE ON ADDICTIVE PROPERTIES AND TOXICITY OF ETHANOL IN RATS

Morkovin E.I.^{1,2}, Kurkin D.V.^{1,3}, Knyshova L.P.¹, Bakulin D.A.¹, Osadchenko N.A.⁴, Abrosimova E.E.⁴, Tarasov A.S.¹, Pustynnikov V.E.³, Sablina L.A.⁴, Vorontsov M.Yu.⁴, Bykova A.S.⁴

¹Volgograd State Medical University, Scientific centre of innovative medicines with pilot production, Volgograd, e-mail: strannik986@mail.ru;

²Volgograd Medical Scientific Centre, Volgograd;

³Volgograd State Medical University, Center of practical and scientific work of the Faculty of Pharmacy, Volgograd;

⁴Volgograd State Medical University, Department of pharmacology and pharmacy, Volgograd

In this work was presented the result of a study of the effectiveness of acetylcysteine (1 g/kg, *per os*) in relation to the formation of addictive properties and the toxic effect of ethanol on the liver of rats under conditions of subacute alcohol intoxication. The study was carried out on 30 male rats. All animals were divided into 3 groups: experimental, negative and positive controls. Ethanol was administered at a dose of 2 g / kg / day (*i/p*) for 4 days. The administration of acetylcysteine was performed after the restoration of the set reflex, which was lost as a result of the administration of ethanol. The addictive effect was assessed in the site preference test by the amount of time spent in the chamber associated with the administration of ethanol. Hepatotoxicity was assessed by the level of triglycerides and liver glutathione. The work showed that in rats receiving acetylcysteine after alcohol intoxication, addictive behavior was less pronounced compared to the control group of animals. It was also shown that the administration of acetylcysteine significantly reduced the toxic effect of ethanol, which was expressed in an increase in the level of glutathione in hepatocytes and a decrease in triglycerides. Thus, the introduction of acetylcysteine under conditions of repeated exposure to ethanol helps to reduce addiction and improves functional state of the liver, which is expressed in the partial prevention of depletion of energy reserves of hepatocytes.

Keywords: ethanol, addiction, toxicity, liver, hangover, acetylcysteine, rats.

На сегодняшний день проблема алкоголизма широко распространена в большинстве мировых стран, в том числе на территории России, и является одной из центральных проблем общественного здоровья и здравоохранения, не только в медицинском и социальном, но и в экономическом смысле [1, 2]. Согласно последним данным ВОЗ, алкоголизм выходит на одно из первых мест среди причин ухудшения здоровья населения во всем мире, причем в Европейском регионе доля общего снижения индексов здоровья и преждевременной смертности, обусловленная чрезмерным употреблением алкоголя, самая большая в мире. Не только непосредственное злоупотребление алкоголем, но и также последствия этого злоупотребления ведут к значительному росту числа больных алкоголизмом, а также к увеличению количества соматических патологий, связанных с повышенным потреблением этанола и смерти по причине алкогольного опьянения [3]. Повторяющееся эпизодическое употребление больших доз алкоголя сопровождается возникновением похмельного синдрома, определяемого выраженными неврологическими и соматическими симптомами, возникающими при почти полном метаболизме алкоголя до ацетальдегида. Похмельный синдром сопровождается болезненными и трудно переносимыми проявлениями, которые к тому же могут быть пролонгированы вследствие интенсификации окислительно-восстановительных процессов в клетках печени, чрезмерного накопления свободных радикалов и в конечном итоге – снижения детоксикационной способности гепатоцитов [4]. В некоторых случаях, особенно в условиях применения алкоголя с целью «лечения» или облегчения похмельного синдрома, данное состояние может оказаться критическим фактором формирования алкогольной зависимости. Поскольку тяжесть похмельного синдрома и его проявлений после приема этанола может усугубляться и продлеваться из-за истощения запасов эндогенного глутатиона в печени, ацетилцистеин, являющийся его метаболическим предшественником [5], может быть перспективным и доступным лекарством предупреждения или терапии похмелья [6]. Следовательно, коррекция состояния, вызванного похмельным синдромом, может не только облегчить его, но и опосредованно снизить вероятность возникновения алкогольной зависимости, частично возникающей при попытке купирования негативных проявлений похмельного синдрома употреблением новых доз этанола.

Целью данного исследования являлась оценка влияния подострого введения ацетилцистеина на аддиктивные свойства и токсические эффекты этанола.

Материал и методы исследования

Работу выполнили на 30 самцах крыс линии Вистар (масса тела 300–450 г), которых содержали в стандартных условиях вивария (при температуре $20\pm 2^\circ\text{C}$, влажности 40–60%, сменяющемся цикле день/ночь по 12 ч и с неограниченным доступом к корму и воде). Исследование выполнено в соответствии с законодательством Российской Федерации и

техническими стандартами Евразийского экономического союза по надлежащей лабораторной практике (ГОСТ Р 53434-2009, ГОСТ Р 51000.4-2011). Протокол исследования одобрен Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер: ИРБ 00005839 IORG 0004900 (OHRP), выписка из протокола № 132 от 20 мая 2019 г.

Животных разделили на 3 группы по 10 особей в каждой: группу отрицательного контроля, группу положительного контроля и опытную группу. В течение 3 дней животных адаптировали к трехкамерной экспериментальной установке, предназначенной для проведения теста предпочтения места, проводя по 2 сессии длительностью по 15 мин в сутки [7]. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Затем в течение 4 дней проводили выработку условного рефлекса предпочтения места: для этого животных из опытной группы и из группы положительного контроля помещали в один из отсеков установки, с которым предполагалось ассоциировать введение этанола, на 15 мин без возможности перехода между отсеками, после чего животным внутрибрюшинно вводили этанол в дозе 2 г/кг/сут. После утраты установочного рефлекса животных возвращали в домашнюю клетку, а после его восстановления крысам из опытной группы внутрижелудочно вводили ацетилцистеин в дозе 1 г/кг/сут, а крысам из группы положительного контроля – физиологический раствор в эквивалентном объеме. В тот же день крыс повторно помещали в альтернативный отсек установки, через 15 мин после чего внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Животным из группы отрицательного контроля на всех этапах вводили только физраствор, а парные отсеки установки не снабжали контрастными паттернами – таким образом, ассоциацию конкретного отсека с введением физраствора не вырабатывали.

На следующий день после окончания обучения проводили оценку воспроизведения условного рефлекса предпочтения места, помещая животных в экспериментальную установку с возможностью перехода между отсеками и регистрируя длительность пребывания в каждом из отсеков установки в течение 20 мин. Затем вычисляли соотношение времени, проведенного в камере, ассоциированной с введением этанола, к общему времени пребывания в боковых камерах. У животных из группы отрицательного контроля в рамках описанных вычислений за камеру, ассоциированную с подкреплением, условно принимали тот отсек установки, в который животное помещали впервые на этапе обучения. Тяжесть похмелья устанавливали по показателям двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле». После эвтаназии (декапитации под наркозом золетилом/ксилазином в дозе 20/8 мг/кг) у животных отбирали образцы тканей печени для последующего анализа. Концентрацию восстановленного глутатиона определяли в реакции восстановления 5,5-дितिобис-(2-нитробензойной кислоты) [8]. Содержание триглицеридов в гомогенатах ткани

печени определяли после экстракции гептаном и изопропанолом с последующим фракционированием алкоголятом натрия фотометрически (после инкубации с 2,4-пентандионом при длине волны 410 нм) [9]. Все реакции проводили в трипликатах.

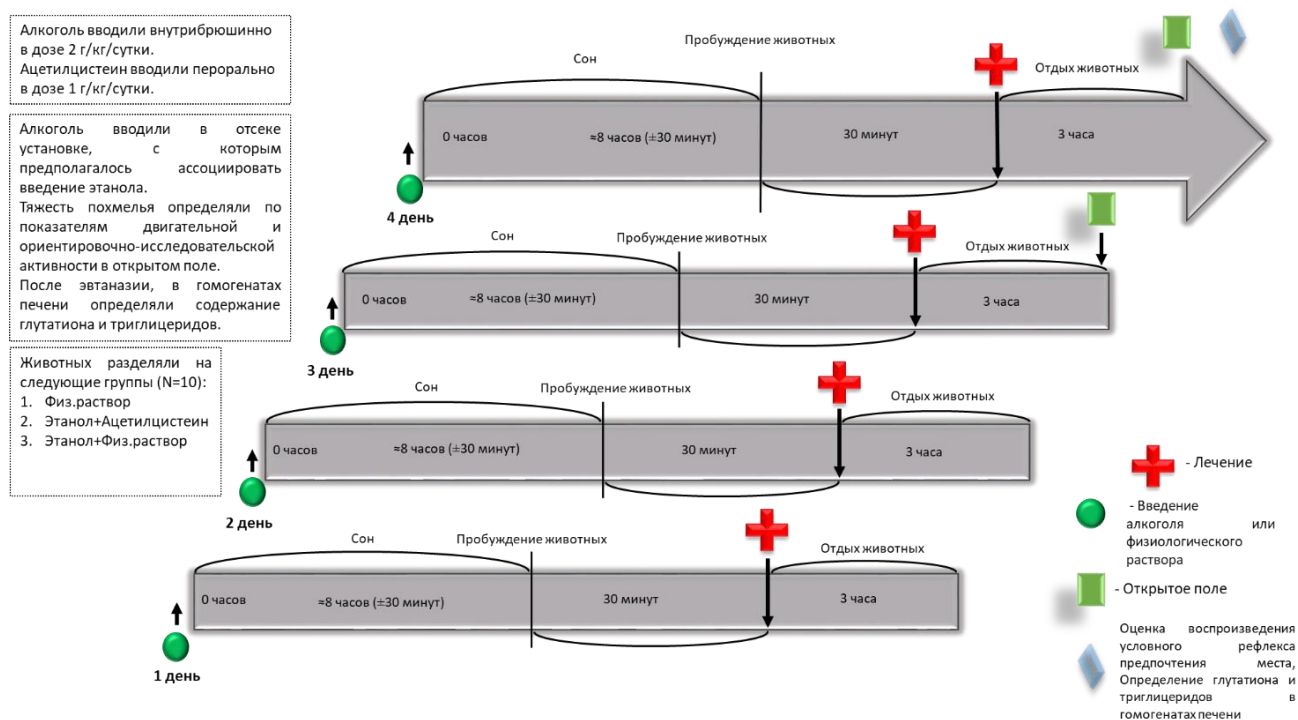


Рис. 1. Дизайн исследования

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами описательной и аналитической статистики. Распределение количественных показателей оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. Межгрупповые различия оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с пост-тестом Ньюмена–Кеулса, а цифровые значения представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Результаты исследования и их обсуждение

После каждого введения алкоголя у животных отмечали выраженные признаки опьянения, а после пробуждения – психоневрологические нарушения, которые выражались в достоверном снижении двигательной и ориентировочно-исследовательской активности. Так, тестирование в открытом поле показало, что крысы, которым вводили этанол, на третий и четвертый день совершали достоверно меньше по отношению к интактным животным ($p < 0,05$) стандартных поведенческих актов (пересечение секторов, заглядывание в отверстия норки и вставание на задние лапы), что соответствует симптомам похмелья. Терапевтическое введение ацетилцистеина в значительной (но не в полной) степени способствовало восстановлению двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных в постинтоксикационном состоянии. Крысы, которым в течение 4 дней вводили алкоголь и

ацетилцистеин, были подвижнее тех, которым вводили только алкоголь, но совершали меньше поведенческих актов, чем интактные (различия достоверны при $p < 0,05$). Таким образом, можно заключить, что внутрижелудочное введение этанола сопровождалось выраженным постинтоксикационным психоневрологическим дефицитом, симптомы которого в значительной степени, но не полностью, устранялись внутрижелудочным введением ацетилцистеина (рис. 2).

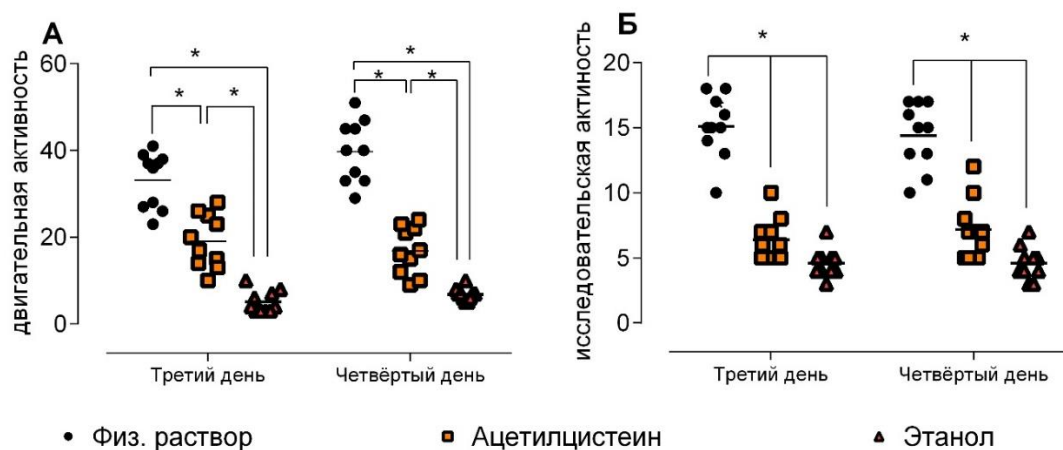


Рис. 2. Влияние введения ацетилцистеина на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность крыс

Примечание. Данные представлены в виде индивидуальных значений, среднего арифметического значения и стандартного отклонения; * – $p < 0,05$ при сравнении с показателями, полученными у животных из других групп; однофакторный дисперсионный анализ, пост-тест Ньюмена–Кеулса

Поведение животных из разных групп в тесте предпочтения места статистически значимо различалось ($p = 0,0062$, однофакторный дисперсионный анализ): среднее время, проведенное в камере, ассоциированной с введением этанола, составило $59,3 \pm 7,69\%$ от общего времени нахождения в установке предпочтения места у животных, которым вводили только этанол ($p < 0,01$ при сравнении с показателями у животных из других групп), а у крыс из группы отрицательного контроля и опытной группы данный показатель составил $48,9 \pm 8,09\%$ и $47,2 \pm 9,15\%$ соответственно, что можно рассматривать как отсутствие предпочтения отдельных камер использованной установки (рис. 3).

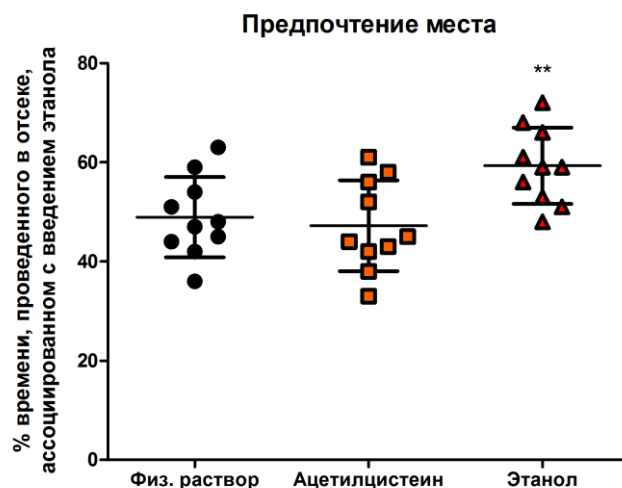


Рис. 3. Влияние введения ацетилцистеина на предпочтение отсека, ассоциированного у крыс с внутрибрюшинным введением этанола

Примечание: данные представлены в виде индивидуальных значений, среднего арифметического значения и стандартного отклонения; ** – $p < 0,01$ при сравнении с показателями, полученными у животных из других групп; однофакторный дисперсионный анализ, пост-тест Ньюмена–Кеулса.

У животных из группы отрицательного контроля содержание глутатиона и триглицеридов в печени составило $124,1 \pm 9,12$ и $20,6 \pm 2,59$ мг/г соответственно, в то время как у крыс из группы положительного контроля указанные показатели составили $96,2 \pm 13,24$ и $27,0 \pm 4,76$ мг/г соответственно ($p < 0,01$) (рис. 4А).

У крыс, получавших ацетилцистеин, содержание глутатиона в ткани печени составило $111,0 \pm 15,16$ мг/г ($p < 0,05$ при сравнении с показателем у животных из группы положительного контроля) (рис. 4Б), а содержание триглицеридов – $23,5 \pm 3,66$ мг/г ($p < 0,05$ при сравнении с показателем у животных из обеих контрольных групп).

При планировании данной работы введение этанола рассматривали в качестве аверсивного стимула – стимула, потенциально способного увеличивать избегание животными ассоциированного с ним последующего контекста. Данное предположение было обусловлено как способом введения (внутрибрюшинная инъекция), так и возможностью возникновения постинтоксикационного синдрома. Полученные результаты, напротив, свидетельствуют о том, что у крыс, подостро получавших этанол, к концу эксперимента тяга к алкоголю повышалась, что проявлялось увеличением доли времени, проводимого в ассоциированном с введением этанола отсеке экспериментальной установки. У крыс, получавших ацетилцистеин, подобного явления не наблюдалось: доля времени, проведенного в ассоциированном с введением этанола отсеке, не отличалась от таковой у крыс без выработанного предпочтения отсека, в среднем не превышая 50%. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение ацетилцистеина может снижать аддиктивные свойства этанола, не увеличивая при этом его аверсивных свойств, в связи с уменьшением выраженности психоневрологических

нарушений, которое отмечалось и в предыдущих работах [6, 10]. Введение ацетилцистеина в период постинтоксикации, вызванной подострым введением этанола, предотвращало истощение запасов глутатиона, улучшало функциональное состояние гепатоцитов, что предупреждало возникновение нарушений энергетической функции печени, сопровождающихся накоплением триглицеридов, что также согласуется с ранее опубликованными данными [6].

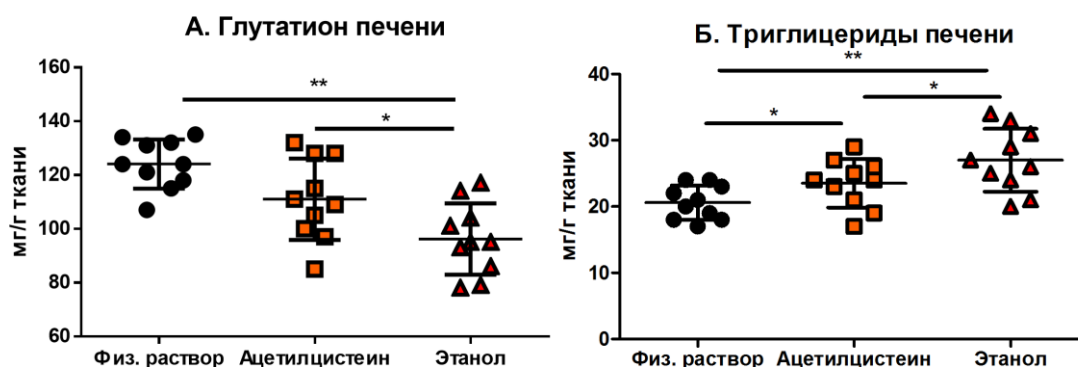


Рис. 4. Влияние введения ацетилцистеина на содержание глутатиона и триглицеридов в печени крыс, которым в течение 4 дней внутрибрюшинно вводили этанол в дозе 2 г/кг/сут

Примечание. Данные представлены в виде индивидуальных значений, среднего арифметического значения и стандартного отклонения; *, ** – $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно при сравнении с показателями, полученными у животных из других групп; однофакторный дисперсионный анализ, пост-тест Ньюмена–Кеулса; сравниваемые группы обозначены горизонтальными линиями

Заключение

Таким образом, применение ацетилцистеина может влиять на последствия алкогольной интоксикации. Это позволяет рассматривать ацетилцистеин не только как средство для коррекции симптомов похмелья, но и как лекарственное средство, применение которого может облегчать состояние, возникающее и развивающееся в процессе периодического злоупотребления алкоголем (запой, аддикция), характерного для алкоголизма.

Работа выполнена за счет средств, полученных при грантовой поддержке Президента Российской Федерации по Соглашению о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с п. 4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации (внутренний номер МК-3454.2019.7) № 075-15-2019-176 от 23.05.2019 г.

Список литературы

1. Лебедева-Несевря Н.А., Жданова-Заплесвичко И.Г., Рерке В.И., Барг А.О. Потребление алкоголя как фактор риска здоровью населения: обзор российских исследований // Анализ риска здоровью. 2017. № 4. С. 147-160.

2. Соловьев А.Г., Мордовский Э.А., Санников А.Л. Оличественная оценка совокупного ущерба от злоупотребления алкоголем на популяционном уровне // Наркология. 2016. Т. 15. № 1 (169). С. 16-32.
3. Pruckner N., Hinterbuchinger B., Fellingner M., König D., Waldhoer T., Lesch O.M., Gmeiner A., Vyssoki S., Vyssoki B. Alcohol-Related Mortality in the WHO European Region: Sex-Specific Trends and Predictions. *Alcohol Alcohol*. 2019. vol. 54. no. 6. P. 593-598.
4. Mackus M., Loo A.J.V., Garssen J., Kraneveld A.D., Scholey A., Verster J.C. The role of alcohol metabolism in the pathology of alcohol hangover. *J Clin Med*. 2020. vol. 9. no. 11. P. 3421.
5. Green J.L., Heard K.J., Reynolds K.M., Albert D. Oral and intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen toxicity: a systematic review and meta-analysis. *West J. Emerg Med*. 2013. vol. 14 no. 3. P. 218-226.
6. Куркин Д.В., Морковин Е.И., Осадченко Н.А., Кнышова Л.П., Бакулин Д.А., Абросимова Е.Е., Горбунова Ю.В., Тюренков И.Н. Коррекция психоневрологических проявлений алкогольного похмелья у крыс ацетилцистеином // Фармация и фармакология. 2019. Т. 7. № 5. С. 291-299.
7. Абашева Д.А., Калатанова А.В., Карпенко М.Н., Куркин Д.В., Клименко В.М., Бакулин Д.А., Морковин Е.И., Ивлева И.С., Пестерева Н.С., Майстренко В.А., Абросимова Е.Е., Ковалев Н.С., Дубровина М.А. Оценка аддиктивного потенциала препарата Кортексин® в доклинических исследованиях // Лабораторные животные для научных исследований. 2020. № 4. С. 29-37.
8. Shaik I.H., Mehvar R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: Application to the rat liver and bile samples. *Anal Bioanal Chem*. 2006. vol. 385. no. 1. P. 105-113.
9. Biggs H.G., Erikson J.M., Moorehead W.R. A manual colorimetric assay of triglycerides in serum. *Clinical Chemistry*. 1975. vol. 21. no. 3. P. 437-441.
10. Морковин Е.И., Осадченко Н.А., Кнышова Л.П., Бакулин Д.А., Куркин Д.В. Влияние ацетилцистеина на психоневрологические показатели крыс после острой интоксикации этанолом // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2019. № 3 (71). С. 110-115.