

Исследование антиоксидантных свойств унитиола при экспериментальной постнаркотической детоксикации

ЗЕНОВИЧ С.М.
КАЛИНИНА А.Г.
ХАЛИЛОВ Э.М.
ПАНЧЕНКО Л.Ф.

Московский научно-практический центр профилактики наркоманий
Московский научно-практический центр профилактики наркоманий
НИИ физико-химической медицины МЗ РФ
академик РАМН, Национальный научный центр наркологии МЗ РФ

Исследовано влияние унитиола при пероральном применении в постинтоксикационном периоде при остром и хроническом введении морфина в опыте in vivo на крысах. Показаны мембранопротекторные свойства препарата: торможение скорости реакции перекисного окисления липидов, сохранение антиоксидантного статуса организма животных.

Актуальной задачей являются поиск и изучение новых средств для купирования окислительного стресса как составной части постнаркотических детоксикационных мероприятий [10], особенно тех, которые способны действовать в синергизме с эндогенными антиоксидантами. Тиолы, наряду с мочевой кислотой, витаминами Е, А, аскорбиновой кислотой, относятся к категории основных эндогенных антиоксидантов, играющих главную роль в защите биомембран при окислительном стрессе.

Тиоловые (т.е. содержащие SH-группы) соединения входят в состав большинства макромолекул организма человека и млекопитающих. Известно, например, более 100 ферментов, дезактивирующихся при блокаде входящих в структуру их молекул тиоловых групп. При этом происходят нарушения метаболических процессов в организме и ряда жизненно-важных физиологических процессов. При токсической нагрузке активность естественных антиоксидантов сначала повышается как проявление адаптации, а затем быстро снижается, запас антиоксидантов, в том числе и SH-групп, истощается, окислительный стресс получает развитие, часто приводящее к необратимой деструкции биомембран и гибели клетки.

Образование активных кислородных интермедиатов и перекисных соединений — основного фактора повреждения биомембран — происходит практически при всех патологиях, хотя и не в равной степени. Интенсивно изучается процесс развития окислительного стресса при различных патологиях, например при миокардиопатиях, патологиях спинного и головного мозга [7, 11, 12].

Скорость реакций свободно-радикального окисления мембранных

липидов с одновременной инактивацией эндогенных антиоксидантов выходит за рамки физиологической нормы также при интоксикации наркотическими анальгетиками. В связи с этим актуальным является купирование окислительного стресса в составе детоксикационных мероприятий в остром состоянии интоксикации и при наркотическом абстинентном синдроме. В современных исследованиях большое внимание уделяется поиску новых эффективных антиоксидантов, оценке антиоксидантной активности известных, традиционно применяемых средств, в том числе различных их сочетаний [8, 9]. Эта проблема особенно актуальна в связи с недавно выявленной способностью некоторых известных антиокислителей к инверсии антиоксидантной активности в прооксидантную в зависимости от концентрации [9]. Поэтому нами ведется поиск таких веществ для использования в целях купирования постнаркотического окислительного стресса, которые проявляли бы антиоксидантную активность в широком диапазоне применяемых количеств.

На наш взгляд, наиболее перспективным для этих целей веществом является унитиол — лекарственный препарат, используемый в медицинской практике в течение многих лет в качестве антидота при отравлениях солями тяжелых металлов [1]. Химическая структура молекулы унитиола предполагает возможность связывания им свободных радикалов и токсических продуктов метаболизма наркотических веществ и алкоголя.

Механизм действия унитиола как антидота основан на эффекте экранирования: при использовании в лечебных целях SH-группы унитиола

защищают SH-группы биомолекул, поддерживая тиоловое равновесие и предотвращая метаболические сдвиги. Унитиол конкурирует с естественными донорами сульфгидрильных групп за связь с токсическим агентом, оказываясь более активным агентом. Более того, он способен разрушить комплекс «токсическое вещество—биомолекула», реактивируя тем самым естественные тиоловые соединения [2]. Тиоспиртовые группы в молекуле унитиола (2-,3-димеркаптопропансульфоната натрия) находятся в вицинальном положении, т.е. соединены с соседними атомами углерода, что обуславливает его высокую реакционную способность в отношении связывания свободных радикалов.

Целью настоящего исследования явилось изучение антиоксидантных мембранопротекторных свойств унитиола при его пероральном применении для купирования постнаркотической интоксикации и экспериментального синдрома отмены морфина. Применение унитиола в качестве перорального детоксиканта при интоксикации наркотического происхождения выполнено впервые.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнена на крысах-самцах линии Wistar-100 с исходной массой 150—250 г. Крысы содержались в клетках по 5 животных в условиях искусственного освещения (12 ч в сутки) и постоянного доступа к стандартному комбинированному корму и воде. В каждой экспериментальной группе было, как правило, 10 особей.

Соединения, использованные в экспериментах in vivo: унитиол-субстанция, синтезирован предприяти-

ем «Петрохим», Санкт-Петербург, токоферола ацетат (5%-ный раствор в масле), 0,9%-ный изотонический раствор хлорида натрия, морфина гидрохлорид (субстанция) производства Чимкентского химико-фармацевтического завода.

Во фрагментах эксперимента исследовали плазму крови и ткань печени, фиксируя значения продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-положительных продуктов), показатели активности системы эндогенной антиоксидантной резистентности (содержание в плазме крови витаминов Е, А, мочевой кислоты и SH-групп), активность ферментов — маркеров повреждения печени.

Содержание перекисей липидов в плазме крови определяли флуориметрически после реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по методу Neiman J. et al. [3] и модифицированным методом Wade C.R., van Rij A.M. [4]. Скорость неэнзиматического ПОЛ определяли в гомогенатах печени до и после индукции процесса Fe-АДФ — аскорбатом (0,1—1,5—0,1 мМ) по реакции продуктов ПОЛ с ТБК-реагентом, как описано в [4]. Уровень малонового диальдегида (ТБК-положительных продуктов) измеряли спектрофотометрически по разности оптических плотностей при длинах волн 535 и 570 нм через 30 и 60 мин после начала инкубации.

Уровень витаминов Е и А в плазме крови определяли флуориметрически, используя в качестве экстрагента гексан. Витамин Е определяли при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны эмиссии 320 нм, витамин А — при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны эмиссии 475 нм, как описано Thompson J.N. et al. [5]

Содержание SH-групп в плазме крови определяли, используя реактив Элмана по методу Wayne D.D.H. et al. [6]. Количество мочевой кислоты (урата) определяли спектрофотометрически, регистрируя образование окрашенного комплекса урата с вольфраматгидроксиламиновым реагентом при 690 нм [6].

Активность ферментов — аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) измеряли в соответствии с рекомендациями фирмы Boehringer (ФРГ), используя фирменные стандартные наборы реактивов.

Для статистической обработки результатов эксперимента были использованы t-критерий Стьюдента,

а также параллельно непараметрические методы, в частности U-критерий Манна-Уитни, и, дополнительно, критерий Колмогорова—Смирнова, поскольку t-критерий Стьюдента имеет недостаточную точность при сравнительно небольших объемах выборки, а также при отклонении эмпирического распределения от нормального. Вычисления производились с помощью программы Statistica.

Моделирование острой и хронической интоксикации наркотическими анальгетиками

Острую интоксикацию моделировали на крысах однократным внутривенным введением морфина гидрохлорид в дозе 25 мг на 1 кг массы тела. Крысы двух опытных групп подвергались интоксикации, одна группа оставалась интактной.

Хроническую интоксикацию наркотиками моделировали введением животным двух опытных групп внутривенно морфина гидрохлорида в течение 7 дней в возрастающих дозах от 10 до 70 мг/кг массы животного. Животные 1-й опытной группы получали также унитиол. Животные 2-й опытной группы получали пустую капсулу. Животные 3-й (контрольной) группы (КГ) получали инъекционно эквивалентные количества физиологического раствора.

Как в условиях острого эксперимента, так и в хроническом опыте по наркотизации животные 1-й опытной группы (ОГ-1) получали унитиол перорально в желатиновой капсуле (15 мг/кг массы тела) через 20 мин

после введения наркотиков, животные 2-й опытной группы (ОГ-2) тогда же получали пустую желатиновую капсулу. В опыте по хронической наркотизации через 10 ч после последнего введения морфина животные получили дополнительно однократно унитиол в капсуле в количестве 20 мг/кг массы. Декапитировали животных через 2,5 ч после острого введения, а в хроническом эксперименте — после последнего введения морфина в 7-й день эксперимента через 2,5 ч после последнего введения капсулы.

Результаты и их обсуждение

Острая интоксикация крыс морфином

В эксперименте по острой интоксикации морфином выявлено, что содержание продуктов ПОЛ в плазме крови в группе получивших унитиол животных (ОГ-1) осталось на том же уровне, что у КГ.

У не получивших унитиол животных тот же режим острой интоксикации привел более чем к 5-кратному возрастанию содержания продуктов ПОЛ в плазме крови ($P < 0,001$).

Хроническая интоксикация крыс морфином

Содержание ТБК-положительных продуктов в плазме крови крыс, получивших унитиол (ОГ-1), в 2 раза ниже ($P < 0,005$), чем в группе без унитиола (ОГ-2). При этом содержание продуктов ПОЛ у животных в ОГ-1 превышало содержание продуктов ПОЛ у крыс КГ более чем вдвое ($P < 0,005$) — рис. 1.

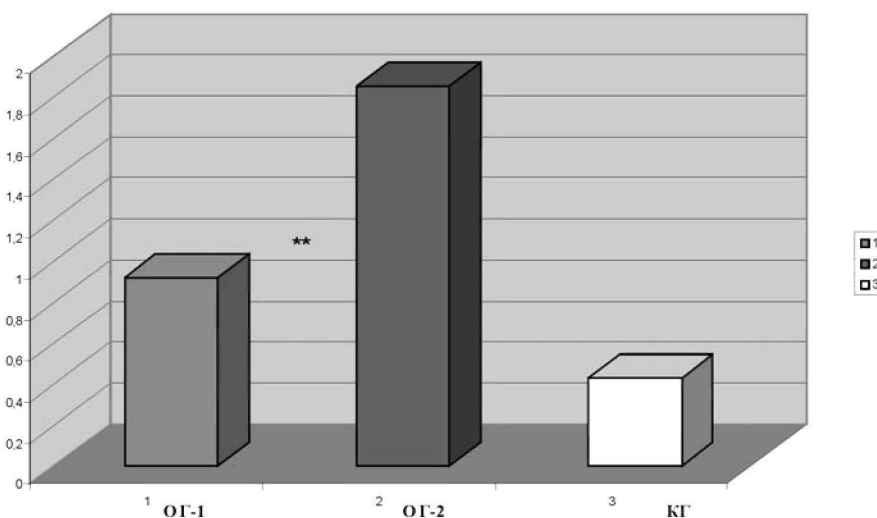


Рис. 1. Содержание продуктов ПОЛ в плазме крови крыс в эксперименте по хронической интоксикации морфином:

1 — ОГ-1 — с приемом унитиола; 2 — ОГ-2 — без приема унитиола; 3 — КГ-контроль

Концентрации витаминов Е и А в плазме крови крыс, получавших на фоне хронического введения морфина унитиол (ОГ-1), оказались на 30–35% выше ($P < 0,05$), чем у животных, получавших пустую капсулу (ОГ-2), и на 10% ниже, чем в контрольной (рис. 2).

Содержание SH-групп в плазме крови крыс группы ОГ-1 (341 мкмоль) более чем в 2 раза превышало ($P < 0,05$) их содержание у животных в ОГ-2 (159 мкмоль) и практически не отлича-

лось от уровня этого показателя в контрольной группе (351 мкмоль).

Различие в концентрации мочевой кислоты в тех же группах животных оказалось аналогично направленным, но менее выраженным: концентрация мочевой кислоты в плазме крови у особей, получавших унитиол (186 ммоль), превышало это значение у животных, получавших пустую капсулу, примерно на 10% (169 ммоль), но было в 1,5 раза ниже ($P < 0,05$), чем значение в контрольной группе (278 ммоль).

Активность АСТ в плазме крови крыс, получавших вместо унитиола пустую капсулу (ОГ-2), вдвое превышает активность фермента в группе получавших унитиол животных ($P < 0,01$). При этом активность фермента в ОГ-1 и в КГ различается статистически не значимо (различие составляет около 10%).

Активность фермента АЛТ в плазме крови крыс, получавших унитиол, превышала уровень в контрольной группе на 17% (отличие статистически не значимо), зато вдвое превышала активность фермента в группе не получавших унитиол животных ($P < 0,01$) – рис. 3.

Проведенные исследования дают основания полагать, что именно пероральное применение унитиола позволяет по-новому оценить его терапевтические возможности в наркологии. Мы наблюдаем выраженное мембранопротекторное действие унитиола при интоксикации, выражающееся в снижении активности аминотрансфераз, снижении интенсивности ПОЛ, а также укреплении эндогенной антиокислительной системы. При пероральном введении происходит, по-видимому, более быстрое и полное попадание препарата через систему циркуляции в печень, чем при инъекционном введении, на что указывают данные, согласно которым при инъекционном введении до 40% препарата быстро экскретируется почками в неизменном виде. Именно печень служит органом, где осуществляется метаболизм большинства токсикантов, в том числе наркотиков. Быстрое попадание препарата в печень косвенно подтверждается данными приведенного эксперимента по острой интоксикации морфином, когда эффект перорального введения унитиола проявлялся уже через 2,5 ч после однократного приема препарата.

Конкурентное ингибирование унитиолом процессов ПОЛ в печени можно, по-видимому, исключить с учетом гидрофильности молекулы унитиола. Зато весьма велика вероятность реактивации эндогенных сульфгидрильных соединений, принимающих на себя первыми «удар» при окислительном стрессе. На это указывают данные эксперимента по хронической интоксикации крыс морфином: снижение уровня SH-групп вдвое у наркотизированных животных без применения унитиола и достоверное сохранение показателя на уровне контроля при его использовании. Эндогенные антиоксиданты, как известно, функционируют в организме преиму-

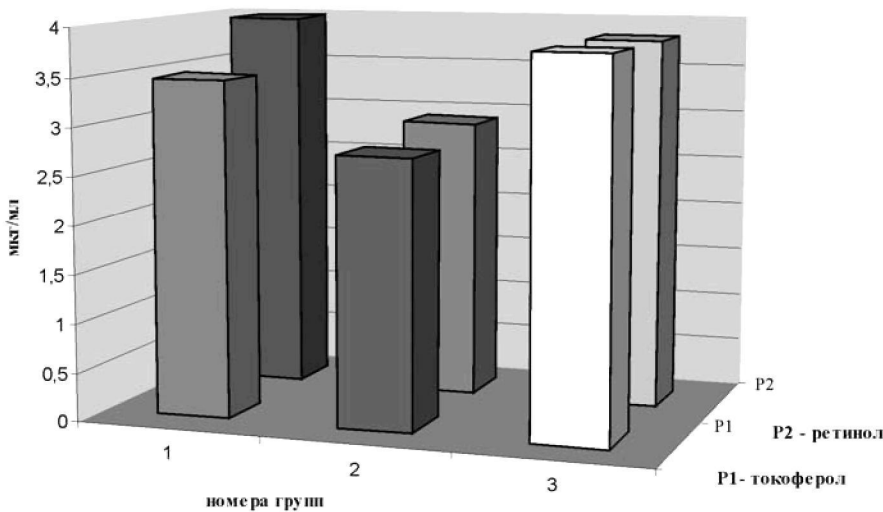


Рис. 2. Концентрации витаминов Е и А в плазме крови крыс в эксперименте по хронической интоксикации морфином: 1 – ОГ-1 – с приемом унитиола; 2 – ОГ-2 – без приема унитиола; 3 – контроль. P1 – ряд 1 – витамин Е; P2 – ряд 2 – витамин А.

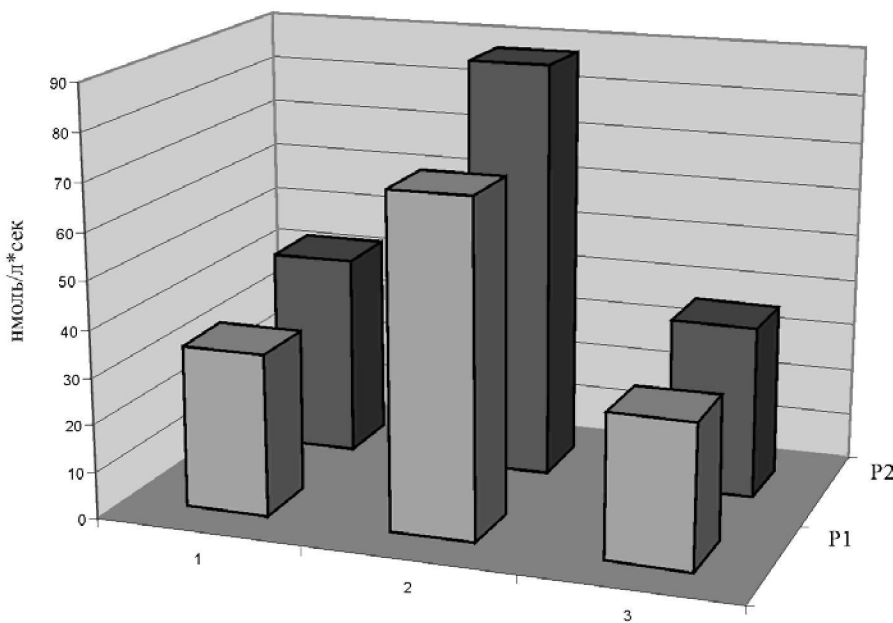


Рис. 3. Активности ферментов-маркёров повреждения печени в гомогенатах печени крыс в эксперименте по хронической интоксикации морфином: 1 – ОГ-1 – с приемом унитиола; 2 – ОГ-2 – без приема унитиола; 3 – контроль. P1 – ряд 1 – активность АСТ; P2 – ряд 2 – активность АЛТ.

щественно комплексно. Как ферментные системы, так и неферментативные ингибиторы органических радикалов выстроены в цепь синергических взаимопревращений, в условном конце которых образуется менее активная форма радикала [7]. В такой цепи эффективность каждого компонента определяется работой всех остальных. Поэтому, реактивируя SH-содержащие антиоксиданты организма, унитиол запускает своеобразный «каскад» поддержки остальных эндогенных неферментативных антиоксидантов.

Полученные в настоящем исследовании данные позволяют сделать вывод о возможности и перспективности перорального применения унитиола в составе детоксикационных мероприятий в условиях клиники, а также в доклинической ситуации при интоксикациях наркотическими анальгетиками.

Список литературы

1. Голота Л.Г. Лікувальні та антидотні властивості унітіолу // Фармацевтичний журнал. — 1980. — №1. — С. 18—22.
2. Применение препарата «Унитиол» при отравлениях и радиационных поражениях. Перспективы расширения показаний: Методические рекомендации. — СПб, 1999.
3. Neiman J., Hillbom M., Jones A.N. et al. Effects of a small dose of ethanol and calcium carbamide induced acetaldehyde intoxication on human platelet aggregation, associated thromboxane formation and urinary excretion of 2,3-dinor-6-keto prostaglandin F// Clin. Toxicol., 1987.
4. Wade C.R., van Rij A.M. Plasma thiobarbituric acid reactivity: reaction condition and role of iron, antioxidants and lipid peroxid radicals on the quantitation of plasma lipid peroxides// Life Sci. — 1988. — Vol. 43. — P. 1085—1095.
5. Thompson J.N., Erdory P., Maxwell W.B. Simultaneous fluorometric determination of vitamins A and E in human serum and plasma// Biochem. Med. — 1973. — Vol. 8. — P. 403—414.
6. Wayner D.D.H., Buron G.W., Imgold V.U., Barclay L.R. C., Locke A.J. The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radicaltrapping antioxidant activity of human blood plasma// Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — Vol. 924. — P. 408—419.
7. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. — М., 2001.
8. Коновалова Г.Г., Лисина М.О., Тихазе А.К., Ланкин В.З. Комплекс витаминов-антиоксидантов эффективно подавляет свободно-радикальное окисление фосфолипидов в ЛПНП плазмы крови и мембранных структурах печени и миокарда// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2003. — Т. 135, №2. — С. 166—169.
9. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Коновалова Г.Г., Козаченко А.И. «Концентрационная инверсия антиоксидантного действия в прооксиданте» // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1999. — Т. 128, №9. — С. 314—316.
10. Панченко Л.Ф., Надеждин А.В., Пирожков С.В., Усманова Н.Н., Баронцев В.Ю., Алябьева Т.Н., Наумова Т.А. Клинико-биохимическое исследование антиоксидантной эффективности препарата Эйковит у несовершеннолетних больных героиновой наркоманией // Вопросы наркологии. — 2000. — №2. — С. 27—32.
11. Борщенко И.А., Басков А.В., Коршунов А.Г., Сатанова Ф.С. Некоторые аспекты патофизиологии травматического повреждения и регенерации спинного мозга// Вопросы нейрохирургии. — 2000, №2. — С. 28—31.
12. Мирсальков Д.А., Артарян А.А., Промыслов М.Ш., Арефьева И.А. О роли биохимических процессов в патогенезе осложнённой водянки головного мозга у детей // Вопросы нейрохирургии. — 1999. — №4. — С. 26—28.

EXAMINATION OF THE ANTIOXIDATIVE QUALITY OF UNITHIOL FOR THE EXPERIMENTAL POSTNARCOTIC DETOXICATION

ZENOVICH S.M.	Scientist, Moscow Scientific-Applied Centre for the Prevention of Drug Abuse (MSAC PDA), Moscow City Health Administration
KALININA A.G.	Deputy Director (Science), MSAC PDA
KHALILOV E.M.	Laboratory Chief (Biochemistry and Autoanalysis), the Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Ministry of Health
PANCHENKO L.F.	Academician RAMS, Laboratory Chief (Biochemistry), National Scientific Centre of the Drug Abuse, Ministry of Health

A Unithiol influence at oral administration during post poisonous period at acute and chronic introduction of morphine at in vivo experiment was researched. Membrane protective properties of the remedy, inhibition of lipid peroxidation, maintaining the antioxidant organism state were shown.