

ORIGINAL RESEARCHES

Научная статья

УДК 615.235 + 616-092.4

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2024-21-1-141-145>**Влияние острой и хронической алкоголизации крыс на показатели окислительного стресса и метаболической активности печени в условиях *in vitro*****Владимир Иванович Петров, Назар Андреевич Осадченко** ✉

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Алкогольное похмелье требует изучения и разработки терапии. Окисление этанола под действием алкогольдегидрогеназы приводит к уменьшению количества восстановленного глутатиона. Целью работы стала *in vitro* валидация методов острой и хронической алкоголизации. В экспериментах использовали крыс линии Вистар, у которых после острой или хронической алкоголизации с лечением ацетилцистеином или без него проводили оценку состояния печени в ее перфузатах и гомогенате. Установили, что введение ацетилцистеина после острого отравления этанолом улучшало состояние антиоксидантных систем печени, активности перекисного окисления липидов и повреждение печени. В условиях хронической алкоголизации усиливалась экспрессия S9, но ацетилцистеин не оказывал влияния на это изменение. Таким образом, однократное введение этанола увеличивает содержание биохимических маркеров повреждения печени в ее перфузате, а при хроническом введении этанола – увеличивает активность фракции S9 выделенной из печени животных.

Ключевые слова: похмелье, фракция S9, крысы

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2024-21-1-141-145>**Acute and chronic alcoholization impact on the oxidative stress and metabolic activity markers of rats' liver *in vitro*****Vladimir I. Petrov, Nazar A. Osadchenko** ✉

Volograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. Hangover is a wide medical and social problem requiring exploration. The oxidation of ethanol under the action of alcohol dehydrogenase leads to a decrease in the amount of reduced glutathione. The aim of the study was an *in vitro* validation of methods for acute and chronic alcoholization in rats. We used acute or chronically alcoholised Wistar rats, that were treated with ACC. The state of the liver was assessed in its perfusates and homogenate. The introduction of ACC after acute ethanol poisoning improves the state of the antioxidant systems of the liver, LPO activity and liver damage. Under conditions of chronic alcoholization, S9 expression increased, but ACC did not affect this change. Thus, a single administration of ethanol increases the content of biochemical markers of liver damage in its perfusate, and chronic administration of ethanol increases the activity of the S9 fraction isolated from the liver of animals.

Keywords: hangover, S9 fraction, rats

Алкогольное похмелье – это состояние, требующее изучения и разработки терапии, так как похмелье является широко распространенным состоянием, снижающим некоторые аспекты качества жизни и создающее риск травм, как у человека, испытывающего его, так и у окружающих его людей. Синдром алкогольного похмелья определяют как «совокупность психических и физиологических симптомов, которые испытывает человек после однократного эпизода употребления алкоголя в большом количестве, развивающихся на фоне отсутствия этанола в крови» [1]. По данным отчета Всемирной организации здравоохранения о глобальном статусе потребления этанола на 2018 г. 18,2 % населения мира потребляет алкоголь в количестве, достаточном для развития похмелья [2].

Алкогольное похмелье является потенциально опасным состоянием, увеличивающим риск травматизации при управлении автомобилем или другим сложным механизмом. Люди, употреблявшие этанол перед тестовым заездом на велосипеде, показывали результаты, сопоставимые с людьми, концентрация алкоголя в крови которых составляла 0,3 г/кг [3]. Алкогольное похмелье также оказывает влияние на качества сна, недостаток которого также усиливает неврологический и когнитивный дефицит [4]. Состояние алкогольного похмелья у человека характеризуется возможным наличием 47 симптомов [5], поэтому при моделировании алкогольного похмелья у животных для последующей оценки влияния лекарственных средств на данное состояние следует использовать большое количество валидационных методов [6].

Окисление этанола под действием алкогольдегидрогеназы приводит к образованию ацетальдегида, который превращается в ацетат; обе эти последовательные и потом параллельные реакции уменьшают запасы никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и увеличивают концентрацию НАДН, снижая количество восстановленного глутатиона (GSH) [7]. Этанол подавляет синтез GSH, потеря этого соединения в митохондриях печени способствует повреждению органелл гепатоцитов и снижению их эффективности в отношении утилизации ксенобиотиков [7, 8]. Повышение концентрации НАДН вызывает ряд метаболических нарушений, включая гиперлактацидемию, которая способствует ацидозу и снижает экскрецию мочевой кислоты с мочой.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние введения ацетилцистеина на показатели метаболической активности печени *in vitro*, в условиях острой и длительной алкоголизации.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Провели 2 эксперимента с использованием крыс линии Вистар (масса тела 280–350 г). В первом эксперименте животных распределили на 3 группы по 10 особей. Крысам из первой группы (отрицательный контроль) вводили физиологический раствор (сначала внутривенно, а через 3 ч – внутривенно); крысам из второй группы (опытная) и третьей группы (положительный контроль) однократно внутривенно вводили 20%-й раствор этанола в дозе 3 г/кг, а затем (после пробуждения) однократно внутривенно вводили водный раствор ацетилцистеина в дозе 1 г/кг или физиологический раствор (в соответствии с группой). Объем растворов при внутривенном и внутривенном введении составлял 15 и 5 мл/кг соответственно. Проводили перфузию печени с помощью стандартной методики. Животных наркотизировали при помощи внутривенной инъекции хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг, после чего проводили лапаротомию и выделяли воротную вену и нижнюю полую вену, которые фиксировали канюлями 14 Fr. На протяжении перфузии из перфузионного контура выполняли отбор проб перфузата для общего и биохимического анализа. Изолированную печень подключали к перфузионной установке в порядке – воротная вена, нижняя полая вена. Базовый раствор для перфузии содержал: NaCl 120 ммоль/л, K_2HPO_4 1,2 ммоль/л, MgSO_4 1,2 ммоль/л, CaCl_2 2,6 ммоль/л, NaHCO_3 25 ммоль/л. Водородный показатель (pH) раствора составил 7,4, раствор при 37° обогащали газовой смесью, содержащей 95%-й O_2 и 5%-й CO_2 [9].

Во втором эксперименте у всех животных, кроме интактных, в качестве единственного источника жидкости использовали 15%-й раствор этанола. В течение

1 недели животные получали стандартное питание и раствор этанола (положительный контроль, опыт) или обычную питьевую воду. Начиная со 2-й недели эксперимента животным из опытной группы ежедневно начинали вводить внутривенно ацетилцистеин в дозе 500 мг/кг/сут. в течение 1 недели. Животным из обеих контрольных групп вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Для отбора образцов печени животных наркотизировали однократным внутривенным введением хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг, после чего брюшную полость вскрывали, портальную вену изолировали и катетеризировали для подключения перфузионной системы, состоящей из перистальтического насоса, емкости с перфузионным раствором, который представлял собой 0,1 М фосфатно-солевой буфер (pH = 7,4). Об эффективности перфузии судили по изменению окраски и консистенции печени. По окончании перфузии животных умерщвляли, печень извлекали, измельчали и гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере (1 : 4), после чего полученные гомогенаты центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин. Определение активности ферментативных систем проводили в 96-луночных планшетах, в лунки которых вносили по 50 мкл супернатанта и 200 мкл среды RPMI, содержащей феноловый красный в качестве кислотно-основного индикатора. В качестве отрицательного контроля использовали супернатант, прокипяченный при 100 °C в течение 20 мин [10]. Планшеты помещали в шейкер-инкубатор (500 об./мин, 37 °C) на 30 минут, затем определяли абсорбцию образцов при 415 нм, что близко к максимуму поглощения кислотной формы фенолового красного.

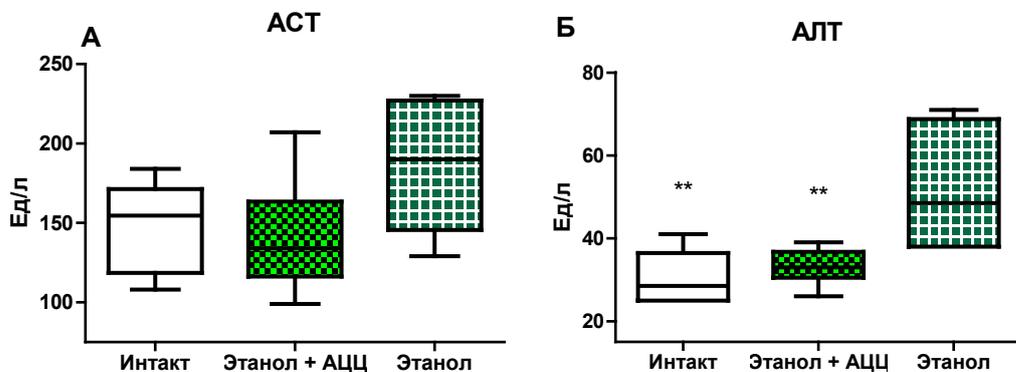
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Не выявили статистически значимых отличий между показателями активности АСТ в перфузате печени крыс из групп положительного, отрицательного контроля и из опытной группы (рис. 1 А). Активность АЛТ у животных из группы положительного контроля ($52,00 \pm 15,14$) Ед/л и у животных, которым после интоксикации вводили ацетилцистеин ($33,17 \pm 4,36$) Ед/л оказалась статистически значимо ($p < 0,01$) ниже, чем у животных, которым после интоксикации вводили физиологический раствор ($30,50 \pm 6,38$) (рис. 1 Б).

Не выявили статистически значимых отличий между показателями концентрации ТГ в перфузате печени крыс из групп положительного, отрицательно контроля и из опытной группы (рис. 2 А). Концентрация глутатиона в перфузате печени крыс, получавших только этанол без лечения, была статистически значимо ниже ($p < 0,01$), чем у животных из группы отрицательного контроля. Данный показатель также был статистически значимо ниже ($p < 0,05$) у животных, получавших ацетилцистеин после

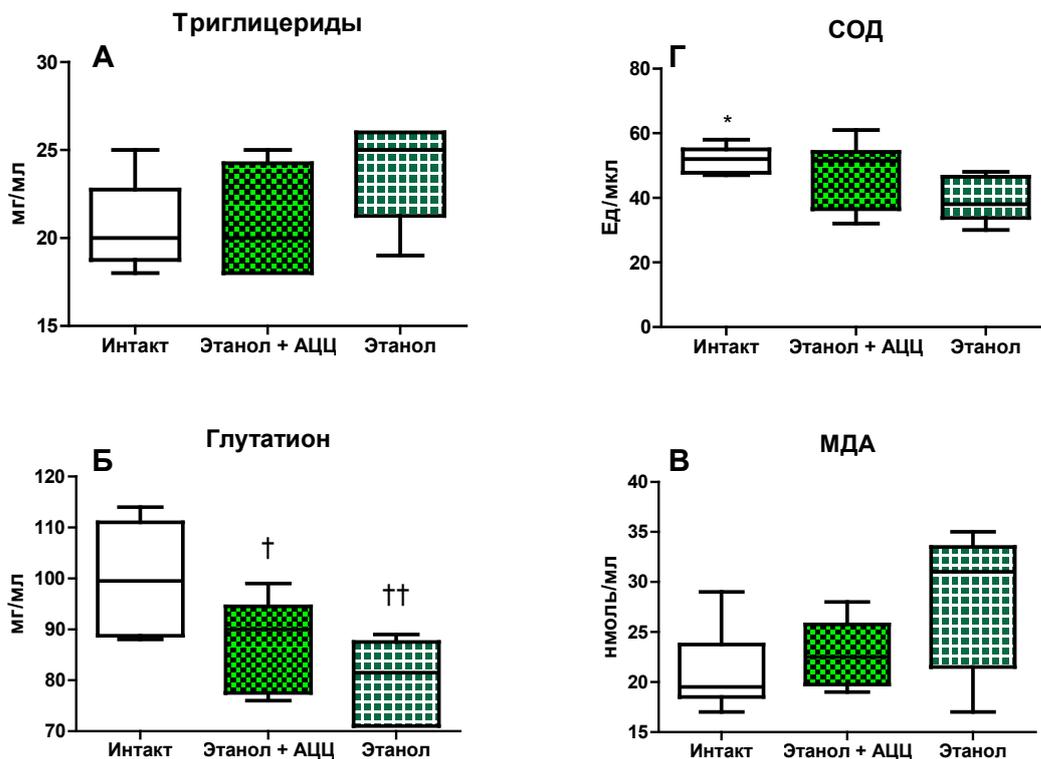
интоксикации этанолом (рис. 2 Б). Не обнаружили статистически значимых отличий между показателями концентрации МДА у животных всех исследуемых групп (рис. 2 В). Обнаружили статистически значимое отличие показателей активности СОД у интактных животных при

сравнении с показателями у животных, которым вводили этанол без лечения ($p < 0,05$). Показатель у животных, получавших ацетилцистеин, не отличался статистически значимо от показателей у животных из групп положительного и отрицательного контроля (рис. 2 Г).



** Статистически значимое отличие при сравнении с показателями у животных из группы положительного контроля при $p < 0,01$; данные представлены в виде среднего значения, минимума-максимума (усы) и интерквартильного размаха (короб).

Рис. 1. Активность аспаратаминотрансферазы (А) и аланинаминотрансферазы (Б) в перфузате печени крыс: АЦЦ – ацетилцистеин; АСТ – аспаратаминотрансфераза; АЛТ – аланинаминотрансфераза



* Статистически значимое отличие при сравнении с показателями у животных из группы положительного контроля при $p < 0,05$; † статистически значимое отличие при сравнении с показателями у животных из группы отрицательного контроля при $p < 0,05$; †† статистически значимое отличие при сравнении с показателями у животных из группы отрицательного контроля при $p < 0,01$; данные представлены в виде среднего значения, минимума-максимума (усы) и интерквартильного размаха (короб).

Рис. 2. Результаты измерения концентрации триглицеридов (А), глутатиона (Б) и малонового диальдегида (В) и активности супероксиддисмутазы (Г) в перфузате печени:

АЦЦ – ацетилцистеин; СОД – супероксиддисмутаза; МДА – малоновый диальдегид

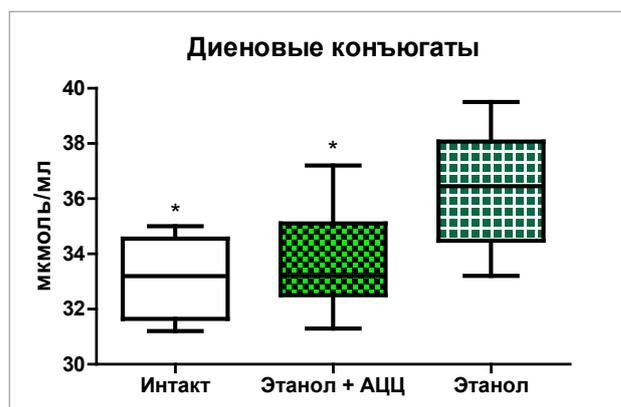
Введение этанола с последующим введением ацетилцистеина или физиологического раствора не оказывало влияния на активность АСТ концентрацию ТГ и МДА. Выявили, что активность СОД в перфузате статистически значимо, но несущественно уменьшалась у животных, получавших этанол без последующего лечения относительно значений у интактных животных. Влияния введения ацетилцистеина на данный показатель не выявили.

Активность АЛТ в перфузате животных, которым после интоксикации этанолом вводили ацетилцистеин, оказалась статистически значимо ниже, чем у животных с похмельем без лечения. Таким образом, введение ацетилцистеина снижало активность АЛТ в перфузате печени крыс, подвергнутых острой алкоголизации. Концентрация глутатиона, наоборот, существенно снижалась, как при введении этанола без последующего лечения, так и при введении этанола с последующим введением ацетилцистеина. Тем не менее, среднее значение концентрации глутатиона было выше ($87,67 \pm 9$) мг/мл, чем у животных из группы положительного контроля ($80,17 \pm 7,86$) мг/мл.

Концентрация диеновых конъюгатов при индукции отравления этанолом увеличивалась статистически значимо ($p < 0,05$), при сравнении с показателями, полученными у интактных животных. Концентрация диеновых конъюгатов в перфузате животных, которым вводили ацетилцистеин, была сопоставима с показателем у животных из группы отрицательного контроля и была статистически значимо ($p < 0,05$) ниже, чем показатель у животных из группы положительного контроля (рис. 3).

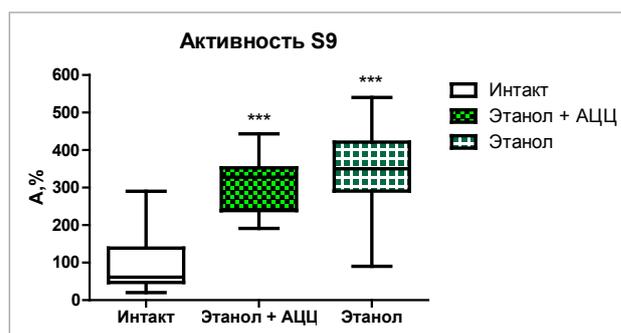
Таким образом, концентрация диеновых конъюгатов в перфузате существенно увеличивалась при алкогольной интоксикации и приближалась к значениям у интактных животных при введении ацетилцистеина в постинтоксикационном периоде.

В ходе оценки активности ферментативных систем гепатоцитов на фоне хронической алкоголизации обнаружили статистически значимое увеличение в 3,5 раза абсорбции кислотной формы фенолового красного в лунках планшета, содержащих фракцию S9 крыс, подвергнутых алкоголизации, и в 3 раза – в лунках, содержащих фракцию S9 крыс, которых подвергли алкоголизации, после чего ввели ацетилцистеин (рис. 4, $p < 0,001$ в обоих случаях). Данные изменения связаны с индукцией цитоплазматических оксидаз, а также митохондриальных оксигеназ и ряда изоферментов систем цитохрома P450, которая наблюдается как при острой, так и при хронической алкоголизации.



* Статистически значимое отличие при сравнении с показателями у животных из группы положительного контроля при $p < 0,05$; данные представлены в виде среднего значения, минимума-максимума (усы) и интерквартильного размаха (короб).

Рис. 3. Концентрация диеновых конъюгатов в перфузате печени крыс: АЦЦ – ацетилцистеин



*** $p < 0,001$ (U-критерий Манна – Уитни).

Рис. 4. Относительная ферментативная активность фракции S9 печени крыс. Данные нормализованы по среднему значению Ar в контроле, данные представлены в виде среднего значения, минимума-максимума (усы) и интерквартильного размаха (короб): АЦЦ – ацетилцистеин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение ацетилцистеина после острого отравления этанолом благоприятно сказывалось на состоянии антиоксидантных систем печени (глутатион), активности перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) и токсическом повреждении печени (АЛТ).

Хроническая же алкоголизация приводила к изменению экспрессии и усилению активности оксидоредуктаз в печени. Активность S9 при использовании АЦЦ хоть и не отличалась от показателя у животных без лечения статистически значимо, была заметно ниже.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Van Schrojenstein Lantman M., van de Loo A.J., Mackus M., Verster J.C. Development of a definition for the alcohol hangover: consumer descriptions and expert consensus. *Current drug abuse reviews*. 2016;9(2):148–54.
2. Global status report on alcohol and health [Internet]. 2018 [cited 2023 Feb 21]. URL: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565639>.
3. Hartung B., Schwender H., Mindiashvili N. et al. The effect of alcohol hangover on the ability to ride a bicycle. *International journal of legal medicine*. 2015;129(4):751–758.
4. Devenney L.E., Coyle K.B., Roth T., Verster J.C. Sleep after Heavy Alcohol Consumption and Physical Activity Levels during Alcohol Hangover. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(5).
5. Penning R., McKinney A., Verster J.C. Alcohol hangover symptoms and their contribution to the overall hangover severity. *Alcohol and alcoholism*. 2012;47(3):248–52.
6. Palmer E., Arnoldy L., Ayre E. et al. Proceedings of the 11th Alcohol Hangover Research Group Meeting, in Nadi, Fiji. *Proceedings*. 2020;43:1.
7. Cederbaum A.I. Alcohol metabolism. *Clinical Liver Disease*. 2012;16(4):667–685.
8. Rushworth G.F., Megson I.L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014;141(2):150–159.
9. Морковин Е.И., Доценко А.М., Стрыгин А.В., Тарасов А.С. Оптимизация метода выделения микросомальной фракции печени крыс. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2017;1(53):42–44. URL: <https://www.volgmed.ru/uploads/journals/articles/1506585534-bulletin-2017-1-2966.pdf>.
10. Benford D.J., Reavy H.J., Hubbard S.A. Metabolizing systems in cell culture cytotoxicity tests. *Xenobiotica*. 1988; 18(6):649–656

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

В.И. Петров – академик Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; brain@sprintnet.ru

Н.А. Осадченко – очный аспирант кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; ✉ n.a.osadchenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7398-2186>

Статья поступила в редакцию 17.12.2023; одобрена после рецензирования 10.02.2024; принята к публикации 15.02.2024.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

V.I. Petrov – Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Intensive Care, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; brain@sprintnet.ru

N.A. Osadchenko – a full-time postgraduate student at the Department of Clinical Pharmacology and Intensive Care at Volgograd State Medical University, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; ✉ n.a.osadchenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7398-2186>

The article was submitted 17.12.2023; approved after reviewing 10.02.2024; accepted for publication 15.02.2024.