

УДК 616.831:599.323.4:615.451.13

ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТ И МОРФОЛИНИЙ 3-МЕТИЛ-1,2,4,-ТРИАЗОЛИЛ-5-ТИОАЦЕТАТ: ВЛИЯНИЕ НА ПРОТЕОЛИЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

Ходос О.А.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, e-mail: Olga.kh@tut.by

Проведено исследование влияния лекарственных средств этилметилгидроксипиридина сукцинат и морфолиний 3-метил-1, 2, 4,-триазолил-5-тиоацетат на интенсивность протеолиза в сыворотке крови крыс при хронической интоксикации этанолом. Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводилась путем предоставления экспериментальным животным 15% раствора этанола ad libitum в качестве единственного источника питья. Длительность потребления животными раствора этанола составляла 29 недель. Активность протеиназ и их эндогенных ингибиторов изучали спектрофотометрически. Исследования проводились с использованием хромогенного субстрата N- α -бензоил-D, L-аргинин-пара-нитроанилида (БАПНА). Показано, что этанол при длительном употреблении приводит к нарушению протеиназо-ингибиторного баланса в сыворотке крови. Введение лекарственных средств этилметилгидроксипиридина сукцинат и морфолиний 3-метил-1, 2, 4,-триазолил-5-тиоацетат способствует нормализации протеиназо-ингибиторного баланса сыворотки крови экспериментальных животных.

Ключевые слова: этанол, этилметилгидроксипиридина сукцинат, морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат, протеолиз, сыворотка крови

ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE SUCCINATE AND MORPHOLINE 3-METHYL-1,2,4-TRIAZOLIL-5-THIOACETATE INFLUENCE ON PROTEOLYSIS IN BLOOD SERUM IN RATS

Khodos O.A.

Vitebsk state medical university, Vitebsk, e-mail: Olga.kh@tut.by

The influence of ethylmethylhydroxypyridine succinate and morpholine 3-methyl-1,2,4-triazolin-5-thioacetate on proteolysis in blood serum in rats after chronic alcohol intoxication was studied. The chronic alcohol intoxication was made by everyday giving of 15% ethanol solution for the experimental animals. Ethanol solution was the source of liquid for experimental animals during 29 weeks. The source of liquid for control group of rats was drinking water. The activity of proteinases and their endogenous inhibitors in blood serum of experimental animals was studied spectrophotometrically. The substrate was N- α -benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA). We noted in this study that chronic alcohol intoxication is accompanied by disorders of the proteinase-inhibitor balance of blood serum. The results of our study indicate that ethylmethylhydroxypyridine succinate and morpholine 3-methyl-1,2,4-triazolin-5-thioacetate normalize activity of proteinases and their endogenous inhibitors in blood serum of experimental animals.

Keywords: ethanol, ethylmethylhydroxypyridine succinate, morpholine 3-methyl-1,2,4-triazolin-5-thioacetate, proteolysis, blood serum

Активация протеолиза является причиной развития многих патологических процессов [2]. При очевидной важности данной проблемы выбор лекарственных средств, способных оказывать воздействие на систему протеолиза, в настоящее время весьма ограничен. Этилметилгидроксипиридина сукцинат и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат широко используются при различных патологических процессах, в том числе и при интоксикации этанолом. В настоящее время доказана антиоксидантная активность данных лекарственных средств [3, 4, 7], но их действие на протеолиз не изучено.

Цель работы – исследовать влияние этилметилгидроксипиридина сукцината и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетата на протеолиз при хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования

Для проведения экспериментов использовали половозрелых самцов крыс линии Wistar средней массой 360 г. Животные содержались в стандартных условиях специализированного вивария НИЛ УО «Витебский государственный медицинский университет». Для эксперимента отбирали животных, расположенных к добровольному потреблению алкоголя. Разделение животных по степени мотивации потребления алкоголя осуществляли с помощью теста «этанолового наркоза» путем однократного внутривенного введения 25% раствора этанола [1]. Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводилась путем предоставления животным 15% раствора этанола ad libitum в качестве единственного источника питья [1]. Животным контрольных групп в качестве источника питья предоставляли водопроводную воду. Длительность потребления животными раствора этанола составляла 29 недель. Введение лекарственных средств опытным группам крыс осуществлялось в хвостовую вену в следующих дозах: этилметилгидроксипиридина сукцинат – 10 мг/кг

массы тела животного, морфолиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат – 50 мг/кг массы тела животного. Контрольным группам животных внутривенно вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Интенсивность протеолиза в сыворотке крови экспериментальных животных изучали через 1, 3 и 7 суток после отмены этанола.

Исследование интенсивности протеолиза в сыворотке крови крыс осуществляли с использованием высокостабильного в растворе, низкомолекулярного хромогенного субстрата N- α -бензоил-D,L-аргинин-пара-нитроанилида (БАПНА). Для определения общей протеолитической активности сыворотки крови применяли метод, описанный Erlanger В. и др. [9]. При изучении активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина сыворотки крови использовали методики, предложенные Хватовым Т.А. и соавт. и Карягиной И.Ю. и соавт. [5, 6]. При исследовании активности эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ в сыворотке крови применяли метод Lenney J.F. [10].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью непараметрических методов (тесты Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса, применялась поправка Бонферрони).

Результаты исследования и их обсуждение

При хронической алкогольной интоксикации установлено снижение актив-

ности α_1 -протеиназного ингибитора в течение 7 суток после отмены этанола (на 11,44%, $p = 0,0027$ и 9,49%, $p = 0,0027$ через 3 и 7 суток соответственно) (таблица). Аналогичные изменения были отмечены и для α_2 -макроглобулина во все периоды наблюдений: снижение его активности на 1 сутки составило 52,63% ($p = 0,0044$), 3 сутки – на 42,98% ($p = 0,0027$), 7 суток – 48,24% ($p = 0,0027$). В то время как общая протеолитическая активность сыворотки крови и активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ не подвергались изменениям. Снижение активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина может быть обусловлено повышенной потребностью ингибиторов вследствие активации протеолиза. Таким образом, с учетом того, что при хронической алкогольной интоксикации имеет место нарушение протеиназо-ингибиторного баланса, данное состояние может служить моделью для того, чтобы оценить способность этилметилгидроксипиридина сукцината и морфолиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата оказывать влияние на систему протеолиза.

Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в сыворотке крови

Показатель	Контрольная группа (n = 7)	1 сутки после отмены этанола (n = 6)	1 сутки после отмены этанола + этилметилгидроксипиридина сукцинат (n = 6)	1 сутки после отмены этанола + морфолиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (n = 6)	3 суток после отмены этанола (n = 6)	3 суток после отмены этанола + этилметилгидроксипиридина сукцинат (n = 6)	3 суток после отмены этанола + морфолиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (n = 6)	7 суток после отмены этанола (n = 6)	7 суток после отмены этанола + этилметилгидроксипиридина сукцинат (n = 6)	7 суток после отмены этанола + морфолиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (n = 6)
Общая протеолитическая активность сыворотки крови, нмоль/с.л.	23,37 (19,93–33,65)	37,39 (30,63–45,41)	34,80 (15,72–60,46)	50,125 (23,484–71,745)	23,63 (14,25–41,50)	21,56 (14,85–37,78)	26,750 (18,345–33,770)	20,78 (11,83–40,28)	31,17 (18,08–45,98)	34,023 (16,431–52,999)
Активность α_1 -протеиназного ингибитора сыворотки крови, мкмоль/с.л.	5,72 (5,47–5,80)	5,43 (5,31–5,57)	5,35 (5,26–5,57)	5,241 (4,908–5,536)	5,07* (4,97–5,20)	5,21* (4,93–5,39)	5,110* (4,982–5,400)	5,18* (4,79–5,31)	5,33 (4,89–5,59)	5,016* (4,723–5,329)
Активность α_2 -макроглобулина, мкмоль/с.л.	0,23 (0,18–0,27)	0,11* (0,09–0,12)	0,12* (0,09–0,17)	0,093* (0,056–0,175)	0,13* (0,10–0,15)	0,11* (0,08–0,16)	0,151 (0,106–0,181)	0,12* (0,09–0,14)	0,21 (0,11–0,26)	0,176 (0,109–0,226)
Активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ, отн. ед.	4030,73 (3791,39–168,76)	4089,83 (3884,31–4423,02)	3894,79 (3642,99–4122,97)	3701,298 (3236,857–4200,370)	4036,64 (3843,40–4206,24)	3770,69 (3512,04–4163,29)	3889,610 (3720,967–4092,884)	4143,03 (3576,209–4477,39)	3766,23 (3672,88–3850,93)	4162,337 (3759,055–4409,775)

Примечания:

1. Данные представлены в виде медианы (–95...+95%) – доверительный интервал.
2. * – статистически значимые различия показателей по отношению к контролю.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат нормализовал активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина до уровня контроля к 7 суткам после отмены этанола ($p = 0,0222$, $p = 0,5203$).

При использовании морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетата активность α_1 -протеиназного ингибитора оставалась сниженной (к 3 суткам на 10,67%, $p = 0,0082$ и к 7 суткам на 12,32%, $p = 0,0027$). Активность α_2 -макроглобулина на фоне введения морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетата нормализовалась до контрольных значений на 3 и 7 сутки ($p = 0,0124$ и $p = 0,1160$ соответственно).

Ни этилметилгидроксипиридина сукцинат, ни морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат не оказали влияния на общую протеолитическую активность сыворотки крови и активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ.

В сыворотке крови крыс контрольной группы этилметилгидроксипиридина сукцинат и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат не вызывали изменений в системе протеолиза. При моделировании процесса *in vitro* нами установлено, что внесение в инкубационную смесь этилметилгидроксипиридина сукцината и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетата не оказало влияния на активность протеиназ и их эндогенных ингибиторов в сыворотке крови [8]. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что этилметилгидроксипиридина сукцинат и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат не обладают прямым эффектом на изучаемые показатели *in vitro*, что не исключает возможности регуляции активности протеолитических ферментов и их эндогенных ингибиторов *in vivo* опосредованным путем.

Возможный механизм влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на протеолиз может быть связан с тем, что данное лекарственное средство ингибирует процессы перекисного окисления липидов, уменьшает уровень оксида азота в тканях, а также увеличивает активность антиоксидантных ферментов (в том числе супероксиддисмутазы), что способствует нормализации процессов свободно-радикального окисления и восстановлению функционирования липидного слоя биологических мембран, ионных каналов, рецепторов, мембранно-связанных ферментов, что оказывает модулирующее влияние на активность ферментов и может способствовать восстановлению протеиназо-ингибиторного баланса в тканях.

Морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат снижает гиперпродукцию лак-

тата и уменьшает явления некомпенсированного ацидоза, увеличивает активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы), что также способствует сохранению структурно-функциональной целостности биологических мембран и угнетению процессов окислительной модификации белковых структур рецепторов, ионных каналов и ферментов. С другой стороны, морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат предупреждает обратимую и необратимую модификацию метиониновых и цистеиновых фрагментов белков, снижает интенсивность процесса накопления свободных аминокислот, увеличивает уровень содержания РНК и стимулирует адаптивный синтез белков, что также может способствовать восстановлению нормального физиологического баланса активности протеиназ и их эндогенных ингибиторов.

Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат однонаправленно изменяют активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина и способствуют нормализации протеиназо-ингибиторного баланса в сыворотке крови крыс в модели хронической алкогольной интоксикации. Несмотря на то, что при введении морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетата через 7 суток после отмены этанола не отмечено достижения уровня контроля, при этом степень выраженности изменений не отличалась при применении этилметилгидроксипиридина сукцината и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетата.

Выводы

1. Этанол при длительном употреблении приводит к нарушению протеиназо-ингибиторного баланса в сыворотке крови.
2. Этилметилгидроксипиридина сукцинат и морфолиний 3-метил-1,2,4,-триазолил-5-тиоацетат способствуют нормализации протеиназо-ингибиторного баланса сыворотки крови экспериментальных животных.

Список литературы

1. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. – М.: Медицина, 1985. – 240 с.
2. Высокогорский В.Е., Арзамасова О.А., Тютикова Д.М. Уровень гликопротеинов в сыворотке крови и ткани печени крыс, перенесших внутриутробную алкогольную интоксикацию // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 41–44.
3. Захарова Н.В. Взаимосвязь динамики показателей антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов при лечении болезни Легга-Кальве-Пертеса

с применением мексидола // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 4 (80). – С. 69–72.

4. Егоров Е.А., Давыдова Н.Г., Романенко И.А. Мексидол в комплексном лечении глаукомы // Клиническая офтальмология. – 2011. – № 3. – С. 107–111.

5. Карягина И.Ю., Зарембский Р.А., Балябина М.Д. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α 1-антитрипсина и α 2-макроглобулина в гастроэнтерологической клинике // Лабораторное дело. – 1991. – № 2. – С. 10–13.

6. Хватов В.Б., Белова Т.А. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: Метод. Рекомендации. – М., 1981. – 27 с.

7. Чурикова М.С. Коррекция функциональной активности печени, перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у пациенток с воспалительными заболеваниями органов малого таза // Медицинский альманах. – 2012. – № 5 (24). – С. 74–77.

8. Ходос О.А., Гидранович Л.Г., Сачек М.М. Действие этилметилгидроксипиридина сукцината и тиотриазолина на протеолиз в эксперименте *in vitro* // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2011. – Т.10, № 4. – С. 168–172.

9. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen M. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95, № 2. – P. 271–278.

10. Lenney J.F. Thermostable endogenous inhibitors of cathepsins B and H // Eur J Biochem. – 1979. – Vol. 101, № 1. – P. 153–161.

References

1. Burov Ju.V., Vedernikova N.N. *Nejrohimiya i farmakologija alkogolizma* [Neurochemistry and pharmacology of alcoholism]. Moscow, Medicina, 1985. 240 p.

2. Vysokogorskij V.E., Arzamasova O.A., Tjutikova D.M. *Sibirskij medicinskij zhurnal*, 2011, no. 2, pp. 41–44.

3. Zaharova N. V. *Bjulleten' VSNC SO RAMN*, 2011, no. 4 (80), pp. 69–72.

4. Egorov E.A., Davydova N.G., Romanenko I. A. *Klinicheskaja ofial'mologija*, 2011, no. 3, pp. 107–111.

5. Karjagina I.Ju., Zaremskij R.A., Baljabina M.D. *Laboratornoe delo*, 1991, no. 2, pp. 10–13.

6. Hvatov V.B., Belova T.A. *Uskorennyj metod opredelenija osnovnyh ingibitorov proteinaz v plazme krovi cheloveka: Metod. Rekomendacii* [Rapid method for determining the main protease inhibitors in human plasma: Method. recommendations]. Moscow, 1981. 27 p.

7. Churikova M.S. *Medicinskij al'manah*, 2012, no. 5 (24), pp. 74–77.

8. Khodos O.A., Hidranovich L.G., Sacek M.M. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 2011, no. 4, pp. 168–172.

9. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen M. *Arch Biochem. Biophys.*, 1961, no. 2, pp. 271–278.

10. Lenney J.F. *Eur J Biochem.*, 1979, no. 1, pp. 153–161.

Рецензенты:

Питкевич Э.С., д.м.н., профессор, зав. кафедрой лечебной физкультуры и спортивной медицины УО «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова», г. Витебск;

Осочук С.С., д.м.н., зав. НИЛ УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск.

Работа поступила в редакцию 01.04.2014.