

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ АЛКОГОЛЬ- И АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА
ТОКСИЧНОСТЬ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ЕГО ЭФИРОВ (ЦЕЛЛОЗОЛЬВОВ)**

Бонитенко Е.Ю., Бонитенко Ю.Ю.

Федеральное учреждение науки «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург,
Федеральное государственное учреждение здравоохранения
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России», Санкт-Петербург

Бонитенко Евгений Юрьевич, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России, 192019 Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1, тел. (812) 365-06-80

Резюме. В эксперименте на самцах белых крыс, массой 140-180 г., изучалось влияние отдельного и сочетанного внутрибрюшинного введения ингибитора алкогольдегидрогеназы амида изовалериановой кислоты (АИК) и ингибитора альдегиддегидрогеназы цианамид (ЦА) на токсичность и концентрации этиленгликоля (ЭГ), метил- (МЦ) и этилцеллозольва (ЭЦ), а также их кислотных метаболитов в биосредах при острых пероральных отравлениях ЭГ, МЦ и ЭЦ. Установлено, что при сочетанном введении ингибиторов влияние на содержание неизмененных ядов в крови и их кислотных метаболитов близко к таковому при введении только АИК. Цианамид не влиял существенно на концентрации ЭГ, МЦ и ЭЦ и несколько снижал уровни их кислотных метаболитов. Самые низкие уровни этих метаболитов наблюдались при сочетании АИК и МЦ. Указанное сочетание оказывало и наибольшее лечебное действие – эффект суммации при интоксикациях целлозольвами и потенцирования – при отравлениях этиленгликолем

Ключевые слова: отравления острые, отравления этиленгликолем, его метиловым и этиловым эфирами, антидотная терапия

E.Yu. Bonitenko, Yu.Yu. Bonitenko

The inhibitors of alcohol and aldehyde dehydrogenase affect ethylene glycol and ethylene glycol ethers toxicity

Federal State Science Institution «The Institute of toxicology»
FMBA Russian Federation, St-Petersburg,
Federal State Institute of Public Health
«The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine»
EMERCOM of Russia, St-Petersburg

Abstract. The main goal was study of separate and combined intraperitoneal administration of alcohol dehydrogenase inhibitor – amide of iso-valerian acid (AIA) and aldehyde dehydrogenase inhibitor – cyanamide affect ethylene glycol, methylcellosolve, ethylcellosolve and its acid metabolites at acute poisons.

It was showed that intraperitoneal administration of inhibitors is the same as only AIA administration. Cyanamide did not affect ethylene glycol, methylcellosolve, ethylcellosolve concentration and led to its acid metabolite concentration decreasing. The lowest concentration of these metabolites were registered at combined intraperitoneal administration of alcohol dehydrogenase inhibitor – amide of iso-valerian acid with the maximum therapeutic effect. The effect was a summation result at cellosolve poisons and potencies result at ethylene glycol poisons.

Key words: acute poison, cellosolve poison, ethylene glycol poison, methylcellosolve and ethylcellosolve poison, antidote treatment.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка антидотной терапии острых отравлений этиленгликолем (ЭГ) и его эфирами (целлозольвами) представляет несомненный интерес, так как интоксикации, вызванные этими соединениями, нередко приобретают характер групповых или массовых, отличаются тяжелым течением и высокой летальностью (Бонитенко Е.Ю. и др., 2003; Бонитенко Ю.Ю. и др., 2005). В последние годы, наряду с традиционным этанолом, для лечения отравлений токсифицирующимися спиртами рекомендуется 4-метилпиразол (4-МП; фомепизол), более надежный ингибитор алкогольдегидрогеназы (АДГ) – фермента первой стадии метаболизма этих спиртов (Лужников Е.А., Суходолова Г.Н., 2009). Однако этот препарат является дорогостоящим и в нашей стране не лицензирован. Ранее нами (Бонитенко Е.Ю., 1995) в эксперименте было показано, что аналогичными свойствами обладает амид изовалериановой кислоты (АИК), также оказывающий отчетливый защитный эффект при отравлениях подобными спиртами, но более доступный для химического синтеза и менее дорогостоящий, чем 4-МП.

Все указанные выше соединения подавляют первую стадию метаболизма спиртов до соответствующих альдегидов. Вместе с тем, не ясно, являются ли эти альдегиды основными носителями токсичности токсифицирующихся алкоголей, или этими свойствами обладают кислоты, следующие за альдегидами в метаболической цепочке. Не ясно также, каково влияние торможения биотрансформации альдегидов на токсичность подобных алкоголей. Изложенное послужило основанием для проведения настоящего исследования

Цель работы. Изучить влияние отдельного и сочетанного применения ингибитора АДГ АИК и ингибитора альдегиддегидрогеназы (АльДГ) цианамида (ЦА) на токсичность ЭГ, метил- и этилцеллозольвов (МЦ и ЭЦ), а также содержание ядов и их кислотных метаболитов в биосредах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на самцах белых беспородных крыс, массой 140 – 180 г., содержащихся на стандартной диете вивария. Ядовитые агенты вводились однократно внутрижелудочно в нарастающих (для вычисления ЛД₅₀) и фиксированных (1,5 ЛД₅₀; для определения концентраций ядов и их метаболитов в крови и моче) дозах. Кровь для исследования забирали через 3, 6, 12 и 18 часов, мочу собирали с 12-часовыми интервалами дважды. Выживаемость животных оценивали при наблюдении в течение

2 недели. Внутривенное введение АИК и ЦА начинали через 1 час после аппликации ядов. АИК использовали в разовой дозе 250 мг/кг через каждые 6 часов в течение первых суток, ЦА применяли однократно в дозе 30 мг/кг.

Концентрации ЭГ и гликолевой кислоты (ГК), МЦ и метоксиацетата (МА), ЭЦ и этоксиацетата (ЭА) в крови и моче определяли с помощью газожидкостной хроматографии по оригинальной (Бонитенко Е.Ю. и др., 2003) и представленной в литературе (Гуляева Т.Н., 1992) методикам.

Для вычисления показателей летальности использовали пробит-анализ наименьших квадратов по методу В.Б.Прозоровского (1980). Полученные данные обработаны традиционными статистическими методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

При изучении концентрации ядов в крови (табл.1) установлено, что после введения АИК уровни всех изучавшихся токсикантов достоверно ($p < 0,01 - 0,001$) превышали показатели контрольной группы. Лишь через 18 часов после отравлений ЭГ различия не существенны ($p > 0,05$), по видимому вследствие того, что к этому сроку у животных контрольной группы развивалась анурия и прекращалось удаление яда с мочой. Введение цианамида практически не влияло на изучавшиеся показатели, а при сочетании АИК с ЦА концентрации ЭГ, МЦ и ЭЦ, достоверно превышавшие цифры контроля, были лишь незначительно выше ($p > 0,05$), чем в группе, получавшей только АИК.

Определение в крови кислотных метаболитов ЭГ, МЦ и ЭЦ (табл.2) позволило установить, что под влиянием введения АИК концентрации ГК, МА и ЭА за весь период наблюдения были достоверно ($p < 0,05 - 0,001$) ниже показателей контрольной группы. Введение цианамида приводило к умеренному, хотя и достоверному ($p < 0,05$), преимущественно в поздние сроки, снижению концентраций кислотных метаболитов ядов, или зарегистрирована тенденция к их снижению ($p > 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1

Концентрации ЭГ, МЦ и ЭЦ в крови (моль/л) при применении ингибиторов АДГ и АльДГ ($M \pm m$)

Яды (1,5 ЛД ₅₀)	Группы животных	Время с момента отравления (часы)			
		3	6	12	18

ЭГ	Контроль	68,7 4,3	35,0 4,7	26,5 2,6	27,0 2,6
	Получавшие:				
	АИК	82,5* 6,3	68,9* 2,8	41,0* 3,7	30,9 4,4
	ЦА	64,7 4,0	45,3* 3,7	22,0 2,2	23,5 2,9
	АИК + ЦА	89,4* 5,9	73,5* 5,7	48,0* 3,8	33,7 5,1
МЦ	Контроль	19,1 1,3	16,8 1,8	9,1 1,3	3,7 0,6
	Получавшие:				
	АИК	96,2* 3,7	74,3* 2,4	47,1* 1,2	40,2* 1,0
	ЦА	18,0 3,1	18,5 2,1	7,6 0,9	5,3 0,8
	АИК + ЦА	91,3* 4,1	83,2* 4,2	53,1* 1,8	43,4* 1,5
ЭЦ	Контроль	15,6 2,5	12,3 1,8	4,9 1,1	2,5 0,2
	Получавшие:				
	АИК	47,3* 3,2	35,9* 1,0	30,2* 1,1	21,4* 3,7
	ЦА	16,4 2,0	13,6 2,3	7,3 1,4	4,5 1,3
	АИК + ЦА	45,9* 4,2	32,2* 2,5	33,4* 1,6	23,8* 2,7

Примечание: * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05 - 0,001$)

Таблица 2

Концентрации кислотных метаболитов в крови (моль/л) при применении ингибиторов АДГ и АльДГ ($M \pm m$)

Метаболиты ядов	Группы животных	Время с момента отравления (часы)			
		3	6	12	18
ГК	Контроль	25,2 1,8	27,0 3,2	32,7 2,3	33,6 1,7
	Получавшие:				
	АИК	20,0 0,9	14,1* 1,1	8,6* 0,3	10,1* 1,2
	ЦА	21,5 2,6	23,8 3,8	24,3* 2,7	21,7* 3,2
	АИК + ЦА	17,9* 1,6	11,8* 2,0	7,6* 1,0	4,1*# 1,2
МА	Контроль	32,6 1,2	45,2 1,4	39,2 1,3	28,0 1,7
	Получавшие:				

	АИК	17,6* 1,2	29,8* 1,3	20,6* 0,9	14,0* 1,0
	ЦА	27,3 2,3	32,7* 2,3	29,8* 3,1	24,9 1,9
	АИК + ЦА	18,2* 1,1	22,3*# 1,9	16,7*# 1,2	9,8* 1,7
ЭА	Контроль	20,8 1,3	34,8 5,2	20,6 2,3	12,8 1,8
	Получавшие:				
	АИК	10,8* 1,3	17,8* 1,3	8,9* 0,7	8,2* 1,3
	ЦА	14,8 1,4	26,3* 2,1	15,2 2,2	9,8 1,3
	АИК+ЦА	9,6* 1,5	10,9*# 1,8	7,8* 1,4	4,9*# 1,2

Примечание: * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05 - 0,001$); # – различие с группой АИК достоверно ($p < 0,05$)

Применение АИК + ЦА также вызывало значительное, по сравнению с контролем, снижение концентраций ГК, МА и ЭА ($p < 0,01 - 0,001$). Во всех опытных группах за весь период наблюдения уровни кислотных метаболитов в крови были ниже показателей, полученных после введения только АИК; различие проявлялось либо в виде тенденции, либо было статистически достоверным ($p < 0,05$).

Таблица 3

Суточная экскреция ЭГ, МЦ, ЭЦ и их метаболитов с мочой (M±m)

при введении ингибиторов АДГ и АльДГ

Отравления	Суточная экскреция с мочой (ммоль)	Группы животных			
		Контрольная	АИК	ЦА	АИК + ЦА
ЭГ	ЭГ	0,590 0,040	1,070 0,040	0,800 0,020	1,120 0,062
	P (контр/опыт)	-	<0,001	<0,01	<0,001
	Гликолят	1,119 0,200	1,850 0,073	2,324 0,084	2,212 0,123
	P (контр/опыт)	-	<0,05	<0,001	<0,01
МЦ	МЦ	0,072 0,002	0,273 0,016	0,185 0,013	0,265 0,021
	P (контр/опыт)	-	<0,001	<0,001	<0,001
	Метоксиацетат	5,875 0,182	3,814 0,182	3,335 0,179	3,905 0,252
	P (контр/опыт)	-	<0,001	<0,001	<0,001

ЭЦ	ЭЦ	0,065 0,008	0,327 0,011	0,219 0,021	0,307 0,033
	P (контр/опыт)	-	<0,001	<0,001	<0,001
	Этоксиацетат	2,573 0,097	1,024 0,044	1,811 0,078	2,051 0,210
	P (контр/опыт)	-	<0,001	<0,001	>0,05

Выделение ядов и их метаболитов с мочой характеризовалось определенными особенностями (табл.3). При отравлениях ЭГ его экскреция, а также выведение гликолята в контроле было заметно ниже, чем в опытных группах, прежде всего вследствие того, что в контроле через 12 часов развивалась анурия. При отравлениях МЦ и ЭЦ анурия у животных контрольной группы не развивалась. В опытных группах при этих отравлениях экскреция неизменных ядов была достоверно выше, а выведение метаболитов – существенно ниже, чем в контроле. Указанные особенности выведения целлозольвов и их метаболитов связаны, по-видимому, с их концентрациями в крови и должны учитываться при оценке влияния ингибиторов на биотрансформацию этих ксенобиотиков.

При изучении влияния ингибиторов метаболизма на токсичность ЭГ, МЦ и ЭЦ установлено (табл. 4), что АИК вызывает достоверное, по сравнению с контролем, увеличение показателей ЛД₅₀ этиленгликоля, ЭЦ и МЦ ($p < 0,001$). В то же время при введении ЦА животным, отравленным ЭГ, лечебный эффект практически отсутствует, а при отравлениях МЦ и ЭЦ – проявляется отчетливо по сравнению с контролем ($p < 0,05 - 0,01$), хотя и уступает по показателям коэффициента защиты результатам применения АИК. В случае совместного использования АИК + ЦА при отравлении ЭГ можно говорить о феномене потенцирования, а при отравлениях целлозольвами – об эффекте суммации лечебного эффекта.

Таблица 4.

Влияние ингибиторов метаболизма на токсичность ЭГ, МЦ и ЭЦ

№№ п/п	Группы животных	Токсические агенты					
		ЭГ		МЦ		ЭЦ	
		ЛД ₅₀ (мг/кг)	КЗ	ЛД ₅₀ (мг/кг)	КЗ	ЛД ₅₀ (мг/кг)	КЗ
1	Контроль	6928	-	1761	-	2634	-
		325		204		316	
2	АИК	9825	1,44	2919	1,66	4433	1,68
	p	492		216		383	
		$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-2} < 0,001$	
3	ЦА	7126	1,03	2528	1,44	3284	1,24

		324		251		321	
	p	$p_{1-3}>0,05$ $p_{2-3}<0,01$		$p_{1-3}<0,01$ $p_{2-3}>0,05$		$p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$	
4	АИК + ЦА	12036 496	1,73	3446 272	1,96	5200 305	1,97
	p	$p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}<0,05$ $p_{3-4}<0,001$		$p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}<0,05$ $p_{3-4}<0,01$		$p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}>0,05$ $p_{3-4}<0,01$	

Для анализа полученных результатов целесообразно обратиться к схемам биотрансформации ЭГ и целлозольвов (Parry M., Wallach R., 1974; Ghanayem B.J. et al, 1987), не претерпевшим за последние годы существенных изменений. Первая стадия основного пути их метаболизма от спирта до соответствующего альдегида осуществляется АДГ, что подтверждается и результатами наших исследований по влиянию АИК на концентрации неизмененных ядов и (косвенно) соответствующих кислот в крови. Прямым доказательством было бы снижение концентрации альдегидных метаболитов, однако определение альдегидов в биосредах связано с серьезными трудностями методического характера.

Вторая фаза биотрансформации – от альдегида до соответствующей кислоты, судя по данным литературы, для ЭГ осуществляется при участии ФАД–зависимой альдегидоксидазы (Е.С.1.2.3.1), а для целлозольвов – НАД–зависимой альдегиддегидрогеназы (Е.С.1.2.1.3). Использованный в нашей работе цианамид является селективным, неконкурентным ингибитором АльДГ (Cederbaum A.I., 1981); достоверных сведений о его способности подавлять альдегидоксидазу, активность которой реализуется преимущественно при высоких концентрациях субстратов, в доступной литературе мы не обнаружили. Блокада АльДГ цианамидом происходит за счет его метаболита (оксида азота), начинается через 1 – 2 часа после введения в организм, достигает максимума через 12 часов и сохраняется, постепенно уменьшаясь, до конца суток. (Тарасов Ю.А. и др., 1988; Loomis C.W. et al., 1983).

Изложенное позволяет считать, что при отравлениях ЭГ биотрансформация гликолевого альдегида до гликолевой кислоты, хотя бы частично, происходит при участии АльДГ. В контрольной группе, где продуцируются высокие концентрации гликолевого альдегида, активность АльДГ перекрывается альдегидоксидазой и введение ЦА практически не влияет на токсичность ЭГ. В то же время на фоне применения АИК, существенно тормозящего продукцию этого альдегида, в биотрансформацию последнего включается АльДГ, а введение ингибитора этого фермента, цианамида, приводит к потенцированию лечебного эффекта блокатора АДГ. Отчасти, по–видимому, имеет

значение и временной фактор – на фоне ингибитора АДГ эффект медленно действующего цианамида реализуется в большей степени.

При отравлениях целлозольвами на фоне введения ингибитора АДГ временной фактор для реализации лечебного эффекта ЦА также, по всей вероятности, играет определенную роль. Однако наиболее значимы полученные данные для подтверждения существенного значения АльДГ в биотрансформации альдегидных метаболитов целлозольвов до этоксикислот и ведущей роли этих кислот в токсикодинамике эфиров этиленгликоля.

Таким образом, совместное применение ингибиторов АДГ и АльДГ при экспериментальных отравлениях этиленгликолем, его метиловым и этиловым эфирами, подавляя биотрансформацию ядов, повышает эффективность антидотной фармакотерапии этих интоксикаций. Полученные данные позволяют считать перспективным дальнейшее изучение предложенного лечения при интоксикациях, вызванных ЭГ и целлозольвами.

ВЫВОДЫ

1. При отравлениях этиленгликолем введение ингибитора алкогольдегидрогеназы амида изовалериановой кислоты приводило к повышению концентрации в крови неизменного яда, снижению уровня его кислотного метаболита, гликолевой кислоты, а также к уменьшению летальности животных. Использование ингибитора альдегиддегидрогеназы цианамида влияло на изучавшиеся показатели в значительно меньшей степени. Сочетанное применение ингибиторов АДГ и АльДГ вызывало наиболее выраженные изменения токсикокинетических характеристик, а по влиянию на летальность – потенцирование защитного эффекта.

2. При отравлениях целлозольвами применение ингибитора АДГ вызывало изменения токсикокинетических показателей и летальности, сходные с выявленными при интоксикациях этиленгликолем. Введение цианамида не влияло на концентрации целлозольвов в крови, сопровождалось умеренным снижением уровней метокси- и тенденцией к уменьшению содержания этоксиацетата. Наиболее высокие концентрации неизменных целлозольвов и наиболее низкие – их кислотных метаболитов отмечены при сочетанном применении ингибиторов.

3. На выделение изучавшихся ядов и метаболитов с мочой влияют их концентрации в крови, а при интоксикациях этиленгликолем – развитие у животных контрольной группы, не получавших ингибиторов биотрансформации ЭГ, острой почечной недостаточности.

4. Применение АИК вызывало достоверное снижение летальности при отравлениях целлозольвами. Цианамид также оказывал защитное действие, но менее выраженное. Наиболее действенным (эффект суммации) оказалось сочетанное введение ингибиторов.

Список использованной литературы

1. Бонитенко Е.Ю. Интоксикации этиленгликолем и его эфирами. Вопросы патогенеза, антидотной и патогенетической терапии.: Дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 1995. – 211 с.
2. Бонитенко Е.Ю. Отравления этиленгликолем и его эфирами / Е.Ю.Бонитенко [и др.]. – СПб.: «Издательство НИИХ СПбУ», 2003. – 119 с.
3. Бонитенко Ю.Ю. и др. Острые отравления этанолом и его суррогатами / Ю.Ю. Бонитенко, Г.А. Ливанов, Е.Ю. Бонитенко и др. – СПб.: «ЭЛБИ-СПб», 2005. – 224 с.
4. Гуляева Т.Н. Сравнительная оценка методов определения этиленгликоля в биологических объектах / Т.Н.Гуляева // Акт. вопр. теории и практики суд.-мед. экспертизы. – СПб, 1992. – С. 100 – 108
5. Лужников Е.А., Суходолова Г.Н. Клиническая токсикология: Учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008. – 576 с.
6. Прозоровский В.Б. Табличный метод определения ED_{50} (DL_{50}) веществ с низкой биологической эффективностью / В.Б. Прозоровский // Фармакол. и токсикол., 1980. – Т.43, № 4. – С.733 – 735
7. Тарасов Ю.А. Влияние цианамиды на уровень эндогенного этанола в норме и при гиперкортицизме / Ю.А. Тарасов [и др.] // Фармакология и токсикология. – 1988. – Т. 51, № 1. – С. 80–83.
8. Cederbaum A.I. The effect of cyanamide on acetaldehyde oxidation by isolated rat liver mitochondria and on the inhibition of pyruvate oxidation by acetaldehyde / A.I.Cederbaum // *Alcoh. Clin. Exp. Res* – 1981. – Vol.5, № 1. – P. 38 – 44
9. Ghanayem B.J., Burka J., Matthews H.R. Metabolic basis of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) toxicity: role of alcohol and aldehyde dehydrogenases // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1987. – Vol.242, № 1. – P. 222 – 228
10. Loomis C.W. Specificity of hepatic aldehyde dehydrogenase inhibition by calcium carbomide (calcium cyanamide) in rat / C.W. Loomis, J.F. Brien // *Can. J. Physiol. Pharmacol* – 1983. – Vol.61, № 4. – P. 431–435.
11. Parry M., Wallach R. Ethylene glycol poisoning // *Amer. J. Med.* – 1974. – Vol.57, № 1. – P. 143 – 150.

Сведения об авторах.

Бонитенко Евгений Юрьевич, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России, 192019 Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1, тел. (812) 365-06-80

Бонитенко Юрий Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач России, профессор учебного отдела ФГУЗ ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова МЧС России.