

©Коллектив авторов

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ ЛИТИЯ ПРИ ЭТАНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

В.Д. Прокопьева^{1}, Е.В. Плотников^{1,2}, Е.Г. Ярыгина¹, Н.А. Бохан¹*

¹Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИМЦ),
Научно-исследовательский институт психического здоровья,
634014, Томск, ул. Алеутская, 4; *эл. почта: valyaprok@mail.ru

²Национальный исследовательский томский политехнический университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 30

Исследовали защиту белков и липидов плазмы крови от окисления этанолом при использовании органических солей лития, содержащих в своем составе анионные компоненты (сукцинат, fumarat, пируват), а также антиоксидант аскорбат. В качестве препаратов сравнения использовали нормотимик карбонат лития и известный антиоксидант дипептид карнозин (β -аланил-L-гистидин). Окисленные белки определяли по уровню карбонилированных белков (КБ), окислительную модификацию липидов – по ТБК-реактивным продуктам (ТБК-РП). У больных алкоголизмом уровень окисленных белков и липидов повышен по сравнению со здоровыми лицами. Инкубация крови с этанолом приводит к увеличению окисленных белков и липидов в плазме крови здоровых лиц, но не влияет на уровень окисленных биомолекул в плазме крови больных алкоголизмом. Защитное действие от этанол-индуцированного окисления биомолекул плазмы крови здоровых людей, сопоставимое по эффективности с карнозином, оказывали карбонат лития, аскорбат лития и сукцинат лития. Влияния исследуемых соединений на уровень КБ и ТБК-РП плазмы крови больных алкоголизмом не обнаружено.

Ключевые слова: органические соли лития; этанол-индуцированное окисление; биомолекулы плазмы крови; антиоксиданты; алкоголизм

DOI: 10.18097/PBMC20196501028

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых препаратов для лечения алкоголизма, обладающих рядом полезных свойств, сочетание которых позволит более эффективно решать сразу несколько задач – снижать патологическое влечение к алкоголю, корректировать психические и соматические изменения, стабилизировать настроение, устранять или уменьшать патофизиологические и биохимические нарушения в нервных клетках, уменьшать выраженность окислительного стресса (ОС) – является актуальной проблемой. Перспективным является создание новых препаратов на основе солей лития, поскольку они широко применяются в психиатрии как нормотимические препараты [1]. При алкоголизме применение литиевых препаратов особенно эффективно при сопутствующих основному заболеванию расстройствах аффективной сферы, астено-депрессивных синдромах и эмоциональной лабильности.

В свете накопленных в последнее время сведений о роли окислительного стресса в формировании и развитии алкогольной зависимости становится понятным, что коррекция ОС при алкоголизме с использованием антиоксидантов является важным фактором улучшения соматического состояния пациента. Для проявления антиоксидантного действия соединениями лития (помимо нормотимического и нейропротекторного эффекта) можно использовать различные анионы. Ранее в модельной системе

вольтамперометрическим методом было показано, что соли лития и аскорбиновой кислоты (аскорбат лития), янтарной кислоты (сукцинат лития), аспарагиновой кислоты (аспартат лития), яблочной кислоты (малат лития), бензойной кислоты (бензоат лития), глутаминовой кислоты (глутамат лития) обладают выраженной антиоксидантной активностью [2]. В этом ряду наибольшей антиоксидантной активностью обладает аскорбат лития, который в экспериментальных условиях продемонстрировал нейропротекторные [3], иммуномодулирующие [4] и гематопротекторные [5] свойства. В качестве антиоксиданта и нейропротектора также предложена литиевая соль коеновой кислоты [6]. В терапии алкоголизма часто применяют никотинат лития. Он снижает влечение к алкоголю и аффективные расстройства, однако не обладает антиоксидантными свойствами.

Определенной проблемой являются известные токсические эффекты лития, которые проявляются при использовании больших доз препарата в терапии психозов. Однако степень кумуляции лития и его токсичность изменяются в зависимости от дозы, пути введения, продолжительности использования препарата, а также анионного компонента соли лития [7]. Поэтому подбор анионного компонента у литиевых препаратов важен как с точки зрения снижения их токсичности, так и с точки зрения появления у препаратов новых свойств (в частности, антиоксидантных), усиливающих положительный терапевтический эффект.

Синтезированные новые соли лития, содержащие в своём составе анионы с возможным антиоксидантным эффектом, необходимо тестировать в модельной биологической системе. Для этого можно использовать оценку способности солей лития препятствовать окислению белков и липидов плазмы при инкубации крови *in vitro* с каким-либо повреждающим агентом, в частности, с этанолом. Ранее нами была показана способность дипептида карнозина (β -аланил-L-гистидина) – природного антиоксиданта, свойства которого хорошо изучены [8], – защищать биомолекулы плазмы крови от окисления этанолом и ацетальдегидом *in vitro* [9]. В других исследованиях показано, что препарат, основным действующим веществом которого является карнозин, способен снижать выраженность окислительного стресса [10] и уменьшать патологическое влечение к алкоголю [11] у больных алкоголизмом на стадии формирования ремиссии.

В данной работе проведено сравнительное изучение протекторного действия карнозина и некоторых соединений на основе органических солей лития при этанол-индуцированном окислительном повреждении *in vitro* белков и липидов плазмы крови у здоровых лиц и больных алкоголизмом.

МЕТОДИКА

В исследовании принимали участие 34 больных алкоголизмом (основная группа) и 24 практически здоровых человека (группа контроля). Средний возраст участников исследования составил 42 (32-56) года, различий по данному показателю между группами не было.

Больные поступали на лечение в наркологическое отделение НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Диагноз больных по МКБ-10 квалифицировался как “Психические и поведенческие расстройства в результате употребления алкоголя (синдром зависимости – F10.21 и синдром отмены – F10.30)”. В контрольную группу вошли здоровые лица,

которые не состояли на учёте у психиатра или нарколога, не имели хронических соматических заболеваний в стадии обострения и не употребляли алкоголь, по крайней мере, последние 10 суток перед исследованием.

Для получения плазмы кровь брали из локтевой вены утром натощак с использованием стерильной системы однократного применения Vacutainer (“Becton Dickinson”, США) с антикоагулянтом Sodium Heparin. В качестве препаратов сравнения использовали L-карнозин фирмы “Yonezawa Hamagi Chemicals, Ltd” (Япония) и карбонат лития фирмы “Sigma-Aldrich” (Германия). Другие соли лития были синтезированы для данного исследования на кафедре физической и аналитической химии Томского политехнического университета [12]. Синтез проводили на основе обменной реакции с использованием карбоната лития и соответствующей кислоты. При получении солей лития в качестве биоактивного лиганда использовали пируват, сукцинат, фумарат и аскорбиновую кислоту. Состав полученных соединений устанавливали атомно-эмиссионной спектроскопией (на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивной связанной плазмой iCAP 6300 Duo), элементным анализом CHNS (анализатор CHNS Flash2000), термогравиметрическим анализом (термоанализатор с MC SDTQ 600 (“Thermo Electron Corp.”, США). Формулы используемых в настоящей работе соединений приведены в таблице 1.

Антиоксидантные свойства соединений в биологической системе оценивали по их эффектам на содержание маркеров окислительного стресса – продуктов окислительной модификации белков и липидов – в плазме крови после инкубации крови с 85 мМ (0,5%) этанолом *in vitro*. Конечная концентрация всех соединений в пробах составляла 1,2 ммоль/л в пересчёте на ионы лития. Данная концентрация соответствует терапевтической концентрации лития в крови пациентов при терапии психозов, что позволяет экстраполировать эффекты лития, установленные *in vitro*, на их эффекты *in vivo*.

Таблица 1. Структурные формулы исследуемых соединений

Аскорбат лития	Фумарат лития	Пируват лития
Сукцинат лития	Карбонат лития	Карнозин

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ ЛИТИЯ

Для каждого образца крови готовили экспериментальные пробы с исследуемыми солями лития и этанолом, а также контрольные пробы без этанола и с этанолом. Затем пробы инкубировали при 37°C в термостате ("ThermoFisher Scientific", США) в течение 1 ч, после чего центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин (центрифуга серии СМ-6М, ротор 6М). Полученную плазму замораживали и хранили при -80°C до исследования окисленных биомолекул. Окислительную модификацию белков оценивали по уровню карбонилированных белков (КБ) с использованием 2,4-динитрофенилгидразина ("Panreac", Испания) [13]. Окислительную модификацию липидов – по содержанию ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП) с применением набора реактивов ТБК АГАТ ("Агат-Мед", Россия). Методики были адаптированы для измерения оптической плотности в планшетах ("Orange Scientific", Бельгия) на спектрофотометре ЕРОСН ("BioTek Instruments", США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы "Statistica-10". Для проверки согласия с нормальным законом распределения количественных показателей использовали критерий Шапиро-Уилка. Данные представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (QL–QU). Для оценки достоверности использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 2. Влияние соединений лития и карнозина (1,2 мМ) на уровень карбонилированных белков и ТБК-реактивных продуктов в плазме крови здоровых лиц и больных алкогольной зависимостью (АЗ) при инкубации крови 1 ч (37°C) в присутствии 85 мМ этанола. Me (QL–QU)

Соединения	Карбонилы белков, нмоль/мг белка		ТБК-реактивные продукты, нмоль/мл	
	Здоровые (n=24)	Больные АЗ (n=34)	Здоровые (n=24)	Больные АЗ (n=34)
Контроль без этанола	0,19 (0,15-0,23)	0,25 (0,18-0,32) **p=0,017934	2,36 (2,05-2,79)	2,87 (2,26-3,70) **p=0,046553
Контроль + этанол	0,25 (0,21-0,28) *p=0,000517	0,25 (0,21-0,31) *p=0,909351	2,77 (2,46-3,38) *p=0,000355	2,53 (2,05-3,62) *p=0,925085
Li-сукцинат	0,19 (0,18-0,22) *p=0,601213 #p=0,043805	0,23 (0,19-0,29) *p=0,425452 #p=0,673279	2,36 (2,15-3,49) *p=0,145078 #p=0,010182	2,56 (2,05-3,27) *p=0,373994 #p=0,293069
Li-аскорбат	0,21 (0,14-0,25) *p=0,827623 #p=0,029443	0,26 (0,18-0,29) *p=0,289659 #p=0,238612	2,54 (2,36-2,89) *p=0,586181 #p=0,004337	2,56 (2,21-3,18) *p=0,342694 #p=0,416719
Li-фумарат	0,21(0,18-0,24) *p=0,370262 #p=0,156005	0,24(0,19-0,31) *p=0,487351 #p=0,319899	2,77 (2,17-3,12) *p=0,007238 #p=0,303682	2,51(1,95-3,0) *p=0,499478 #p=0,547278
Li-пируват	0,20 (0,17-0,30) *p=0,197834 #p=0,277241	0,26 (0,22-0,36) *p=0,553813 #p=0,319899	2,72 (2,36-3,12) *p=0,042503 #p=0,145078	2,36 (2,05-2,87) *p=0,139182 #p=0,511662
Li-карбонат	0,19 (0,14-0,23) *p=0,760479 #p=0,015648	0,25(0,21-0,28) *p=0,775918 #p=0,411259	2,56 (2,05-2,93) *p=0,939389 #p=0,032013	2,26 (1,62-3,28) *p=0,141481 #p=0,114908
Карнозин	0,19 (0,12-0,28) *p=0,601250 #p=0,034671	0,26 (0,19-0,31) *p=0,435877 #p=0,465099	2,15 (1,85-2,67) *p=0,414041 #p=0,028544	2,17 (1,85- 2,97) *p=0,006227 #p=0,011080

Примечание: * – p по сравнению с соответствующим контролем без этанола; # – p по сравнению с контролем с этанолом; ** – p сравнение соответствующих показателей у здоровых и больных АЗ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление исследуемых соединений лития в кровь без этанола как здоровых лиц, так и больных алкоголизмом, не приводило к изменению уровня карбонилированных белков (КБ) и ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП) в плазме, что свидетельствует об отсутствии у всех соединений собственного повреждающего действия на биомолекулы плазмы крови.

Результаты оценки антиоксидантного потенциала исследуемых соединений в модельной биологической системе путём измерения КБ и ТБК-РП в плазме крови в присутствии этанола представлены в таблице 2.

Обнаружено, что в контрольных пробах без этанола у больных алкоголизмом и белки, и липиды плазмы крови окислены больше, чем у здоровых; различия между группами больных и здоровых по обоим показателям статистически значимы (табл. 2). Этот результат хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными о наличии окислительного стресса у больных алкогольной зависимостью [10, 14, 15].

Этанол (85 мМ) *in vitro* окисляет белки и липиды плазмы крови у здоровых лиц, о чём свидетельствует увеличение КБ и ТБК-РП в пробах с этанолом по сравнению с контролем без этанола (табл. 2).

На белки и липиды плазмы крови больных алкоголизмом этанол, как и используемые в работе соли лития на фоне этанола, заметного эффекта не оказывали (табл. 2). При этом исследуемые соединения продемонстрировали различный защитный потенциал для белков и липидов плазмы крови здоровых лиц от повреждающего действия этанола (табл. 2).

Достоверное снижение повышенного в результате действия этанола уровня карбонилированных белков в плазме крови здоровых лиц выявлено в пробах с Li-сукцинатом и Li-аскорбатом (табл. 2). Аналогичное снижение уровня окисленных белков наблюдалось в присутствии препарата сравнения – карнозина (табл. 2). При этом все исследуемые соли лития снижали уровень карбониллов белков до величин, статистически не отличающихся от контроля без этанола.

На уровень ТБК-РП в плазме крови здоровых лиц при воздействии этанола протекторный эффект также оказывал Li-сукцинат (табл. 2). Защитный эффект также продемонстрировали и карнозин, и карбонат лития. Пируват лития и фумарат лития не показали значимого снижения содержания ТБК-РП в плазме крови относительно соответствующего контроля с этанолом (табл. 2). При этом в присутствии этих солей лития уровень ТБК-РП в плазме крови здоровых лиц превышал ТБК-РП в контроле без этанола, что говорит об отсутствии протекторного эффекта у Li-пирувата и Li-фумарата в данных условиях.

Выявленное в настоящем исследовании протекторное действие солей лития на биомолекулы плазмы крови, повреждённые этанолом, не коррелирует с антиоксидантной активностью этих соединений, определенной в работе [2], где антиоксидантную активность оценивали вольтамперометрическим методом в модельной системе по реакции электровосстановления кислорода, протекающей на катоде. Измеренная таким методом антиоксидантная активность исследуемых веществ уменьшалась в ряду аскорбат лития > пируват лития > карнозин = фумарат лития > сукцинат лития > карбонат лития. Прямое антиоксидантное действие соединения в таком модельном эксперименте отражает его способность нейтрализовать свободные радикалы кислорода. То есть, обнаруженный в нашем исследовании защитный эффект солей лития в отношении белков и липидов плазмы крови не может быть объяснён только прямой нейтрализацией свободных радикалов.

В биологической системе, каковой является кровь, механизмы окисления биомолекул в присутствии этанола могут быть связаны не только с генерацией свободных радикалов, но и со способностью как самого этанола, так и продуктов его метаболизма (в частности, ацетальдегида) оказывать опосредованные токсические эффекты. Определённую роль также может играть активация или ингибирование антиоксидантных ферментных систем, влияние металлов переменной валентности и др. Эффективность защиты белков и липидов плазмы крови от окисления тем или иным соединением, вероятно, обусловлена

сочетанием эффектов этого соединения на разные звенья сложной антиоксидантной системы крови.

В экспериментах на крови пациентов с алкогольной зависимостью не было обнаружено повреждающего эффекта этанола на биомолекулы плазмы крови *in vitro*. Это может быть связано с длительным предшествующим воздействием этанола на организм пациентов. Добавление соединений лития не приводило к изменениям в уровне окислительной модификации как белков, так и липидов плазмы при воздействии этанола на кровь пациентов с алкогольной зависимостью. Только в присутствии карнозина было выявлено снижение ТБК-РП в плазме крови пациентов (табл. 2). Этот эффект карнозина может быть обусловлен его способностью взаимодействовать с промежуточными продуктами окислительной модификации биомолекул, образуя с ними нетоксичные комплексы [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты выявили протекторное действие карнозина, аскорбата лития, сукцината лития и карбоната лития в отношении биомолекул плазмы крови при токсическом воздействии этанола. Поскольку известно, что соли лития оказывают также выраженное системное действие и нормализуют аффективную сферу, выявленная в настоящем исследовании способность литиевых солей защищать биомолекулы от окислительного повреждения позволяет обосновать возможность использования этих соединений в комплексной терапии алкоголизма для повышения эффективности терапии, увеличения длительности ремиссии. Очевидно, механизмы защитного действия этих соединений не ограничиваются их прямой способностью нейтрализовать свободные радикалы. Для выяснения молекулярных механизмов защитного действия этих соединений на биомолекулы крови необходимы дополнительные исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20045) “Действие органических солей лития на клетки и плазму крови больных с расстройствами аффективного спектра и синдромом зависимости”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили с соблюдением всех принципов информированного согласия Хельсинской декларации всемирной медицинской ассоциации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машиковский М.Д. (2006) Лекарственные средства. М.: Новая волна, 1200 с.
2. Plotnikov E., Voronova O., Linert W., Martemianov D., Korotkova E., Dorozhko E., Astashkina A., Martemianova I., Ivanova S., Bokhan N. (2016) J. App. Pharm. Sci., 6(1), 86-89.

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ ЛИТИЯ

3. Балашов П.П., Аникина Е.Ю., Плотников Е.В., Потапов А.В., Чучалин В.С. (2008) Сибирский вестник психиатрии и наркологии, №4, 83-84.
4. Плотников Е.В., Короткова Е.И. (2012) Патент РФ №2444358. Бюлл. Изобр. №7.
5. Балашов П.П., Плотников В.М., Расташанский В.В. (2009) Патент РФ №2351326. Бюлл. Изобр. №10.
6. Скороход Н.С., Абрамова Н.О., Злищева Э.И., Андросова Т.В., Полеицук Л.А., Шурыгин А.Я., Кравцов А.А., Немчинова Е.А. (2013) Патент РФ №2477722. Бюлл. Изобр. №8.
7. Замощина Т.А. (2006) Бюллетень сибирской медицины, 5(S2), 26-29.
8. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. (2013) *Physiol. Rev.*, **93**(4), 1803-1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012.
9. Ярыгина Е.Г., Прокопьева В.Д. (2015) Сибирский вестник психиатрии и наркологии, **3**, 5-8.
10. Прокопьева В.Д., Бохан Н.А., Молькина Л.Г., Патышева Е.В., Ярыгина Е.Г., Козлова И.Л., Ляшенко Г.П. (2007) Вопросы наркологии, №5, 17-22.
11. Прокопьева В.Д., Бохан Н.А., Молькина Л.Г., Ярыгина Е.Г., Патышева Е.В., Ляшенко Г.П. (2008) Сибирский вестник психиатрии и наркологии, №1, 69-70.
12. Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Dorozhko E., Bohan N., Plotnikov S. (2015) *Physiology Pharmacology*, **19**, 107-113.
13. Levine R.L. (2002) *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 790-796.
14. Parthasarathy R., Kattimani S., Sridhar M.G. (2015) *Ind. J. Psychol. Med.*, **37**(2), 175-180. DOI: 10.4103/0253-7176.155617.
15. Galicia-Moreno M., Rosique-Oramas D., Medina-Avila Z., Álvarez-Torres T., Falcón D., Higuera-de la Tijera F., Béjar Y.L., Cordero-Pérez P., Muñoz-Espinosa L., Pérez-Hernández J.L., Kershenobich D., Gutierrez-Reyes G. (2016) *Oxid. Med. Cell Longev.*, 9370565. DOI: 10.1155/2016/9370565.
16. Reddy V.P., Garrett M.R., Perry G., Smith M.A. (2005) *Sci. Aging Knowledge Environ.*, **18**, 12.

Поступила в редакцию: 22. 06. 2018.
После доработки: 12. 10. 2018.
Принята к печати: 12. 10. 2018.

PROTECTIVE ACTION OF CARNOSINE AND ORGANIC LITHIUM SALTS IN CASE OF ETHANOL-INDUCED OXIDATIVE DAMAGE OF PROTEINS AND LIPIDS OF BLOOD PLASMA IN HEALTHY PERSONS AND ALCOHOLIC PATIENTS

V.D. Prokopieva^{1}, E.V. Plotnikov^{1,2}, E.G. Yarygina¹, N.A. Bokhan¹*

¹Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
4 Aleutskaya str., Tomsk, 634014 Russia; *e-mail: valyaprok@mail.ru

²National Research Tomsk Polytechnic University, 30 Lenin ave., Tomsk, 634050 Russia

Organic lithium salts containing anionic components (succinate, fumarate, pyruvate and antioxidant ascorbate) were tested for protection of blood plasma proteins and lipids against ethanol-induced oxidation in vitro. We used normothymic lithium carbonate and well-known antioxidant dipeptide carnosine (β -alanyl-L-histidine) as the reference drugs. The oxidized proteins and lipids were determined by the level of carbonylated proteins (CP) and TBA-reactive products (TBA-RP), respectively. In alcoholic patients the level of oxidized proteins and lipids was higher than in healthy persons. Incubation of blood with ethanol resulted in an increase in oxidized proteins and lipids in blood plasma of healthy persons but had no influence on the level of CP and TBA-RP in blood plasma of alcoholic patients. Lithium carbonate, lithium ascorbate, and lithium succinate exhibited protective action against ethanol-induced oxidation of biomolecules of blood plasma of healthy people. These effects were comparable with carnosine action. The studied compounds had no effect on the level of CP and TBA-RP of blood plasma of alcoholic patients.

Key words: organic lithium salts; ethanol-induced oxidation; biomolecules of plasma; antioxidants; alcoholism