

УДК 547.262 : 615.91 : 616.36-004

# ВЛИЯНИЕ ИНОЗИНА ГЛИЦИЛ-ЦИСТЕИНИЛ- ГЛУТАМАТ ДИНАТРИЯ НА КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ И ИСХОД ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛКОГОЛЬ-ИНДУЦИРОВАННОГО ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

А.Е. Антушевич<sup>1</sup>,  
А.Н. Гребенюк<sup>1,2</sup>, Д.А. Халютин<sup>1</sup>,  
А.А. Ярцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044,

г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 191036, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**В** экспериментах на белых беспородных крысах проведена оценка эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия в качестве средства терапии токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени. Экспериментальное моделирование цирроза печени осуществляли путем введения крысам в течение трех недель двух гепатотоксикантов – 40% раствора этанола в дозе 3 г/кг, внутривенно, через день, и 1% раствора диметилнитрозамина в дозе 5 мг/кг, внутривенно, первые 4 суток каждой недели. Инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия вводили подкожно в дозе 30 мг/кг в течение трех недель ежедневно; применение препарата начинали после окончания введения гепатотоксикантов и клинико-морфологического подтверждения токсического цирроза печени. Оценку эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия в качестве средства терапии алкоголь-индуцированного цирроза печени проводили морфологическими, гистологическими и биохимическими методами. Установлено, что комбинированное действие этанола и диметилнитрозамина приводило к развитию токсического цирроза печени, который проявлялся повышением массы тела крыс, характерными морфологическими и гистологическими изменениями тканей печени, повышением активности аланин- и аспартатаминотрансферазы, гамма-глутамил-транспептидазы, щелочной фосфатазы и уровня общего билирубина, а также увеличением концентрации в плазме крови интерлейкина-1 $\beta$ , интерферона- $\gamma$  и фактора некроза опухолей- $\alpha$ . Курсовое введение инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия способствовало уменьшению объема соединительной ткани в печени животных, снижению активности печеночных ферментов, уменьшению уровня общего билирубина и концентрации провоспалительных цитокинов в плазме крови. Полученные данные свидетельствуют об эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия как средства лечения алкоголь-индуцированного цирроза печени.

**Ключевые слова:** этанол, диметилнитрозамин, отравление, цирроз печени, лечение, инозин, окисленный глутатион.

**Введение.** Одним из главных направлений деятельности современной токсикологии как науки является разработка новых методов профилактики, диагностики и терапии наиболее часто встречающихся отравлений и заболеваний химической

этиологии. Для нашей страны, как, впрочем, и для всего западного мира, в качестве ведущей этиологической причины химически обусловленной заболеваемости и смертности работоспособного населения выступает алкоголь и его суррогаты [1, 2].

**Антушевич Александр Евгеньевич (Antushevich Aleksandr Evgenyevich)**, доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории военной терапии научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, a.antushevich@mail.ru

**Гребенюк Александр Николаевич (Grebenuk Aleksandr Nikolaevich)**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры военно-медицинского снабжения и фармации Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ, заведующий лабораторией токсикологии Северо-Западного научного центра гигиены и общественного здоровья Роспотребнадзора, 194044, 191036, г. Санкт-Петербург, grebenuk\_an@mail.ru

**Халютин Денис Александрович (Halutin Denis Aleksandrovich)**, кандидат медицинских наук, преподаватель кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, hal-denis81@yandex.ru

**Ярцева Анна Александровна (Yarceva Anna Aleksandrovna)**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории военной терапии научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, antu-anna@yandex.ru

По данным Всемирной организации здравоохранения, в связи с употреблением алкогольной продукции в мире ежегодно умирает около 2,3 млн. человек, что соответствует 3,8% общей смертности от всех причин [3]. По состоянию на 2012 г., для стран Европы количество смертей по этой причине оценивается в среднем в 41,6 случаев на каждые 100 тыс. жителей при общем уровне потребления 9,3 л чистого алкоголя на душу населения [4, 5]. По оценкам экспертов, уже в этом тысячелетии в Российской Федерации только из-за острых отравлений алкоголем и его суррогатами ежегодно погибало от 30 до 40 тыс. человек; причем эти цифры практически не меняются на протяжении последнего десятилетия, несмотря на предпринимаемые государством и обществом меры по уменьшению объемов потребления алкоголя [6–9].

Однако острые отравления не являются единственной причиной заболеваемости и смертности, обусловленной употреблением этанол-содержащей продукции [9, 10]. Не менее значимым фактором является хроническая интоксикация алкоголем, приводящая к развитию значительного числа соматических заболеваний, нарушений психической сферы человека и, в конечном итоге, к сокращению продолжительности жизни [11–13]. Одним из наиболее тяжелых проявлений хронической интоксикации алкоголем является токсический цирроз печени – хроническое прогрессирующее заболевание печени, характеризующееся нарушением ее дольковой структуры за счет разрастания соединительной ткани и патологической регенерации паренхимы, проявляющееся функциональной недостаточностью печени и портальной гипертензией [14, 15]. За период с 2002 по 2013 гг. в России ежегодная смертность от алкогольной болезни, включая алкогольный цирроз печени, составила 16,3%, что в 3,5 раза выше, чем в США и других экономически развитых странах; при этом частота цирроза печени алкогольной этиологии была почти в два раза выше, чем цирроза другой этиологии [16, 17].

В лечении больных циррозом печени большая роль отводится базисной терапии, направленной на лечение заболеваний, которые привели к развитию цирроза, купированию основных синдромов и симптомов болезни, а также предупреждению осложнений [18, 19]. Необходимым компонентом лечения цирроза является полное исключение приема алкоголя, гепатотоксических лекарств, а также полноценная и сбалансированная диета [20]. Однако существующие средства и схемы терапии этого заболевания не всегда оказываются эффективными, что диктует необходимость разработки новых подходов к лечению токсического цирроза печени.

В проведенных нами исследованиях ранее было показано, что для коррекции негативных эффектов острого отравления этанолом, наряду с суще-

ствующими антидотами и средствами патогенетической терапии, могут эффективно применяться пептиды, в частности комплексные препараты на основе восстановленного или окисленного глутатиона [21–24]. Однако сведений об эффективности пептидных препаратов окисленного глутатиона как средств терапии хронической интоксикации этанолом с формированием алкогольного цирроза печени в настоящее время нет, что и послужило основанием для проведения настоящего исследования.

*Цель исследования:* оценка эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия в качестве средства терапии алкоголь-индуцированного цирроза печени.

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальные исследования выполнены на 100 белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животных содержали в стандартных условиях вивария, по 5 особей в одной клетке при температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  в условиях инвертированного света 8.00–20.00 при свободном доступе к воде и пище (за сутки до эксперимента животных не кормили, доступ к воде не ограничивался). Больных и ослабленных животных в эксперимент не брали, распределение животных по экспериментальным группам осуществляли методом рандомизации. При содержании животных и проведении исследований выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [25].

Экспериментальное моделирование алкоголь-индуцированного цирроза печени у крыс осуществляли путем введения в течение 3-х недель двух гепатотоксикантов – 40% раствора этилового спирта в дозе 3 г/кг, внутривентрикулярно, через день, и 1% раствора диметилнитрозамина (ДМНА) в дозе 5 мг/кг, внутривентрикулярно, в течение первых 4-х суток каждой недели с последующим перерывом на три дня [26].

В качестве средства лечения алкоголь-индуцированного цирроза печени использовали инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия производства ЗАО «Фарма ВАМ» (г. Санкт-Петербург) – препарат, выпускающийся под коммерческим названием «Моликсан» (регистрационное удостоверение № 001355/02 от 14.07.2011). Моликсан является пептидным препаратом и представляет собой органическую соль, включающую окисленный глутатион (пептидный компонент) и инозин (пуриновый компонент) в соотношении 1:1. В исследовании использовали лекарственную форму для инъекций (30 мг/мл раствора); препарат вводили подкожно в дозе 30 мг/кг в течение 3-х недель ежедневно. Курсовое применение инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия начинали через 21 сут

после начала введения этанола и ДМНА (после клинико-морфологического подтверждения цирроза печени). Группам сравнения в те же сроки и по той же схеме вводили физиологический раствор.

На первом этапе исследования для оценки эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия в качестве средства лечения алкоголь-индуцированного цирроза печени были сформированы три группы по 20 крыс в каждой:

- 1-я (этанол + ДМНА) – внутрижелудочно вводили 40% этанол в дозе 3 г/кг в течение 3-х недель через 1 сут и внутрибрюшинно 1% раствор ДМНА в дозе 5 мг/кг течение 4-х последовательных суток каждой недели, затем следовал 3-дневный перерыв, после чего инъекции возобновлялись и продолжались по аналогичной схеме в течение 3-х недель;

- 2-я (этанол + ДМНА + моликсан) – комбинированное введение этанола в дозе 3 г/кг и ДМНА в дозе 5 мг/кг по схеме, описанной выше, и лечение инозином глицил-цистеинил-глутамат динатрия в дозе 30 мг/кг подкожно ежедневно в течение последующих 3-х недель после окончания моделирования токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени;

- 3-я (биологический контроль) – животным этой группы в те же сроки и в том же объеме, что и предыдущим, вводили физиологический раствор.

Для подтверждения факта развития токсического цирроза печени через 3 и 6 недель после начала эксперимента проводили этназию животных (по 5 особей из каждой группы) и осуществляли забор образцов печени с последующим макроскопическим и гистологическим исследованием по стандартным методикам с использованием исследовательских микроскопов «Polyvar» и «Leica DMRE», цифрового комплекса видеонаблюдения и программы анализа изображений «ВидеоТест-Размер 4.0» (ООО «Научно-производственная компания «ЗЕНИТ»). В качестве критериев формирования токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени и антицирротической эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия были использованы: тест оценки относительного содержания соединительной ткани в паренхиме печени, весовой индекс печени и наличие асцита (в % от общего количества животных); тест определения величины (объема) соединительной ткани в пределах 5–7 печеночных долек на 6-ти срезах печени, окрашенных по ван Гизону; морфометрические и гистологические исследования [27].

Кроме того, после окончания курса экспериментальной терапии алкоголь-индуцированного цирроза печени с помощью набора реактивов «Ольвекс» (Россия) на анализаторе «Roche Omni C» у животных регистрировали биохимические показатели плазмы крови, характеризующие основные функции печени: общий белок, креати-

нин, мочевины, глюкозу, общий билирубин, калий, натрий, хлор, кальций, аланинаминотрансферазу (АлАТ) и аспартатаминотрансферазу (АсАТ), гамма-глутамилтранспептидазу (ГГТП) и индикатор холестаза – щелочную фосфатазу (ЩФ).

На следующем этапе оценивали антицирротическую активность инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия по индукции интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и фактора некроза опухолей- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) в периферической крови. Животные были разделены на две группы по 20 крыс в каждой:

- 1-я (контроль): введение физиологического раствора в течение 3-х недель после моделирования экспериментального цирроза печени как описано выше;

- 2-я (опыт): введение инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия по описанной ранее схеме в течение 3-х недель после моделирования цирроза печени.

Содержание IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в крови лабораторных животных оценивали до моделирования токсического цирроза печени (исходный уровень) и после окончания курса терапии (через 6 недель после начала эксперимента). Концентрацию цитокинов определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа ELISA фирмы «Endogen» (США) и рассчитывали по калибровочным кривым в пкг/мл.

Полученные в ходе экспериментальных исследований данные подвергали стандартной статистической обработке в программе «Statistica 5.0» с расчетом среднего значения ( $M$ ) и ошибки среднего ( $m_x$ ). Данные в таблицах представлены в виде  $M \pm m_x$ . Оценку статистической значимости различий средних значений проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента для несвязанных и связанных выборок. Вероятность  $p \leq 0,05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных в экспериментах данных.

**Результаты и обсуждение.** Проведенные исследования показали, что при комбинированном 3-недельном введении этанола в дозе 3 г/кг и ДМНА в дозе 5 мг/кг по схеме, описанной выше, у белых беспородных крыс формировался алкоголь-индуцированный цирроз печени, подтвержденный клинико-лабораторными и гистоморфологическими показателями (табл. 1–3).

В таблице 1 представлена динамика массы тела крыс в ходе исследований по фармакологической коррекции инозином глицил-цистеинил-глутамат динатрия токсического цирроза печени, вызванного комбинированным воздействием этанола и ДМНА в субтоксических дозах.

Гибели экспериментальных животных ни в одной из групп наблюдения не выявлено. Обращает на себя внимание увеличение массы тела животных, получавших комбинацию гепатоток-

сикантов – этанола и ДМНА, а также позитивный эффект инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия, выявленный на 2-ой неделе наблюдения (табл. 1).

Данные, полученные через 6 недель после начала моделирования алкоголь-индуцированного цирроза печени и представленные в таблице 2, подтверждают положительное влияние инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия на морфологические показатели печени крыс в условиях хронической алкогольной интоксикации и воздействия ДМНА.

При вскрытии у животных, получавших этанол и ДМНА, отмечали наличие развитого асцита с большим (до 6–8 мл) количеством серозной жидкости в брюшной полости (табл. 2). Крайне неравномерная окраска печени коричневой цветовой гаммы сопровождалась сглаженностью краев органа, рыхлостью и бугристостью поверхности, наличием белесоватого налета и множественными спайками между долями печени. Селезенка у животных этой группы была значительно увеличена в размерах, также отмечалось увеличение и гиперемия региональных лимфатических узлов.

При гистологическом исследовании на фоне развития соединительной ткани по системе печеночных и портальных вен, вокруг них и в синусоидах визуализировались множественные новообразованные кровоизлияния. В синусоидах отмечалось полнокровие, переходящее в кровоизлияния паренхимы органа в стороне от магистральных сосудов. Кровоизлияния в портальной системе сопровождалась пролиферацией холангиоцитов и гиперплазией системы желчных протоков, распространяющихся во все стороны от портальных трактов, вызывая разрастание соединительной ткани и замуровывание прилежащих гепатоцитов.

Из таблицы 2 следует, что инозин глицил-цистеинил-глутамат динатрия при курсовом введении на фоне токсического цирроза печени, индуци-

рованного ДМНА в комбинации с хроническим отравлением этанолом, обеспечивал регрессию (практически двукратную) образования соединительной ткани в печени животных, подвергнутых длительному воздействию гепатотоксикантов. При гистологическом исследовании было выявлено, что после курсового введения препарата значительно снижалась выраженность морфологических проявлений цирроза паренхимы печени, уменьшалось число гепатоцитов с дистрофическими изменениями. Структура подавляющего большинства гепатоцитов была не изменена, наблюдались признаки активации процессов регенерации с увеличением числа двуядерных клеток.

В таблице 3 представлены результаты оценки биохимических показателей в плазме крови животных после окончания курса проведенной с помощью инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия экспериментальной терапии токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени.

Из таблицы 3 видно, что в процессе хронической интоксикации этанолом и ДМНА у животных появляются биохимические признаки холестатического и цитолитического синдромов, а также начальные признаки почечной недостаточности. В сыворотке крови выявлено повышение активности основных ферментов индикаторов цитолитического синдрома – АлАТ (в 2,8 раза) и АсАТ (в 2,3 раза), а также индикатора холестаза – ЩФ (в 2,5 раза). Кроме того, содержание общего билирубина в крови животных, отравленных этанолом и ДМНА, возросло по сравнению с биологическим контролем более чем в два раза (табл. 3).

На фоне курсового применения инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (с 4 по 6 неделю эксперимента, после формирования токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени) все вышеперечисленные показатели практически нормализовались или имели выраженную тенденцию к нормализации (табл. 3). Динамика биохимиче-

Таблица 1

**Влияние инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (моликсана) на массу тела белых беспородных крыс с токсическим циррозом печени, вызванным комбинированным воздействием этанола и диметилнитрозамина, г**

| Группа                       | Период эксперимента, нед |              |               |               |               |               |
|------------------------------|--------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                              | 1-я                      | 2-я          | 3-я           | 4-я           | 5-я           | 6-я           |
| Биологический контроль       | 148,3 ± 5,1              | 158,3 ± 7,9  | 155,0 ± 8,2   | 155,0 ± 6,4   | 162,5 ± 8,7   | 163,6 ± 7,5   |
| Этанол + ДМНА + физ. раствор | 162,5 ± 7,4              | 178,0 ± 7,3  | 183,0 ± 8,8 * | 180,0 ± 8,1 * | 192,0 ± 9,1 * | 194,0 ± 8,1 * |
| Этанол + ДМНА + моликсан     | 150,0 ± 6,6              | 152,5 ± 5,1# | 170,0 ± 6,7   | 175,0 ± 8,9   | 180,0 ± 9,7   | 176,0 ± 6,2   |

Примечания: \* – различия по сравнению с группой «Биологический контроль»,  $p \leq 0,05$ ;

# – различия по сравнению с группой «Этанол + ДМНА + физ. раствор»,  $p \leq 0,05$ .

Таблица 2

**Влияние инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (моликсана) на морфологические показатели белых беспородных крыс с токсическим циррозом печени, вызванным комбинированным воздействием этанола и диметилнитрозамина**

| Группа                       | Весовой индекс печени, ед. | Наличие асцита, % | Характер окраски печени | Относительная площадь соединительной ткани в печени, % |
|------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|--|
| Биологический контроль       | 4,17 ± 0,17                | 0                 | Равномерная             | 1,7 ± 0,2  |
| Этанол + ДМНА + физ. раствор | 3,30 ± 0,12 *              | 50                | Неравномерная           | 9,3 ± 0,9 *  |
| Этанол + ДМНА + моликсан     | 4,0 ± 0,08                 | 0                 | Неравномерная           | 4,2 ± 1,2 * #  |

Примечания: \* – различия по сравнению с группой «Биологический контроль»,  $p \leq 0,05$ ;  
# – различия по сравнению с группой «Этанол + ДМНА + физ. раствор»,  $p \leq 0,05$ .

Таблица 3

**Влияние инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (моликсана) на биохимические показатели плазмы крови белых беспородных крыс с токсическим циррозом печени, вызванным комбинированным воздействием этанола и диметилнитрозамина**

| Показатель                        | Группа                 |                              |                          |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------|
|                                   | Биологический контроль | Этанол + ДМНА + физ. раствор | Этанол + ДМНА + моликсан |
| Общий белок, г/л                  | 62,0 ± 1,0             | 57,0 ± 1,5 *                 | 61,0 ± 1,3 #             |
| Альбумин, г/л                     | 32,9 ± 0,9             | 24,9 ± 1,2 *                 | 30,5 ± 1,0               |
| Глобулин, г/л                     | 29,1 ± 0,8             | 30,2 ± 0,3                   | 30,5 ± 0,6               |
| Общий билирубин, мкмоль/л         | 1,9 ± 0,1              | 4,8 ± 0,9 *                  | 2,1 ± 0,6 #              |
| Мочевина, ммоль/л                 | 4,8 ± 0,3              | 13,2 ± 0,3 *                 | 6,5 ± 0,8 * #            |
| Креатинин, мкмоль/л               | 43,2 ± 0,6             | 52,1 ± 1,2 *                 | 45,8 ± 0,5 #             |
| Аспаратаминотрансфераза, ед.      | 220,8 ± 4,7            | 562,0 ± 15,7 *               | 239,0 ± 19,4 #           |
| Аланинаминотрансфераза, ед.       | 113,0 ± 15,0           | 419,4 ± 20,5 *               | 147,2 ± 19,3 #           |
| Гамма-глутамилтранспептидаза, ед. | 2,3 ± 0,3              | 6,8 ± 0,3 *                  | 3,5 ± 0,2 * #            |
| Щелочная фосфатаза, ед.           | 245,1 ± 15,5           | 541,0 ± 47,9 *               | 214,9 ± 36,7 #           |
| K, ммоль/л                        | 6,4 ± 0,2              | 5,7 ± 0,5                    | 5,8 ± 0,2                |
| Na, ммоль/л                       | 138,3 ± 0,8            | 137,7 ± 0,5                  | 139,7 ± 0,3              |
| Ca, ммоль/л                       | 2,4 ± 0,02             | 2,4 ± 0,03                   | 2,3 ± 0,03               |
| Cl, ммоль/л                       | 105,2 ± 0,7            | 102,1 ± 0,3                  | 102,3 ± 0,7              |

Примечания: \* – различия по сравнению с группой «Биологический контроль»,  $p \leq 0,05$ ;  
# – различия по сравнению с группой «Этанол + ДМНА + физ. раствор»,  $p \leq 0,05$ .

ских показателей леченых моликсаном животных совпадала с данными морфометрии объемного содержания соединительной ткани в печени, что свидетельствует о гепатопротективном эффекте этого препарата.

В ходе дальнейших исследований было проведено изучение возможных механизмов антицирротической активности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия, связанных с регулирующим влиянием на этот процесс цитокинов (табл. 4).

Как видно из таблицы 4, комбинированное воздействие на животных гепатотоксикантов сопровождалось значительным увеличением в крови содержания провоспалительных цитокинов. Так, через 6 недель после начала моделирования токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени в плазме крови крыс, получавших этанол, ДМНА и физиологический раствор, концентрация IL-1 $\beta$  по сравнению с исходным уровнем увеличилась в 2,9 раза, а концентрация TNF- $\alpha$  – в 3,2 раза. Применение инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия в качестве средства лечения экспериментального цирроза печени способствовало нормализации концентрации изучаемых провоспалительных цитокинов.

Таким образом, проведенное исследование позволило доказать антицирротическую эффективность инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия, а также разработать новый способ фармакологической коррекции токсического цирроза печени, развивающегося в условиях комбинированного воздействия этанола и ДМНА. Доказательством лечебной эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия является снижение выраженности морфологических изменений печени, уменьшение значений таких биохимических показателей гепатотоксичности, как активность АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ и концентрация общего билирубина, а также снижение концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ .

Согласно современным представлениям, в патогенезе алкогольного поражения печени основную роль играют связанные с метаболизмом этанола оксидативный стресс, истощение пула глутатиона, повышенная продукция эндотоксинов и провоспалительных цитокинов, нарушения специфических внутриклеточных сигнальных путей и транскрип-

ционных факторов в тканях печени [28–30]. В гепатоцитах оксидативный стресс непосредственно повреждает митохондрии, вследствие чего происходит сенсбилизация клеток к эффектам провоспалительных цитокинов и последующая их гибель. С другой стороны, реактивные метаболиты кислорода повышают чувствительность клеток Купфера к эндотоксинам липополисахаридной природы, что приводит к активации этих клеток и повышенной продукции ими TNF- $\alpha$  – главного медиатора алкоголь-индуцированной гибели гепатоцитов. Развивается порочный круг, ключевыми звеньями которого является алкоголь-индуцированный оксидативный стресс и связанная с ним гиперпродукция провоспалительных цитокинов. Таким образом, применение лекарственных средств, способствующих снижению выраженности оксидативного стресса в клетках и тканях этого органа, представляется патогенетически обоснованной стратегией лечения алкоголь-индуцированного цирроза печени [19, 28, 29].

Согласно регистрационного удостоверения, моликсан (инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия) – это комплексный препарат инозина и окисленного глутатиона, регулирующий тиол-дисульфидный обмен гепатоцитов и продукцию макрофагами печени цитокинов, ингибирующий цитолиз функционально активных гепатоцитов и индуцирующий апоптоз измененных вследствие различных воздействий (в т.ч. вирусных, токсических и др.) клеток печени. В ходе проведенных нами исследований показано, что механизмы действия этого препарата могут быть дополнены его способностью снижать выраженность воспалительной реакции за стимуляции синтеза интерферонов (в частности, IFN- $\gamma$ ) и уменьшения продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ),

Таблица 4

**Влияние инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (моликсана) на содержание цитокинов в плазме крови белых беспородных крыс с токсическим циррозом печени, вызванным комбинированным воздействием этанола и диметилнитрозамина, пг/мл**

| Сроки исследования  | Группы                       | Концентрация цитокинов, пг/мл |                  |                  |
|---|------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
|   |                              | IL-1 $\beta$                  | IFN- $\gamma$    | TNF- $\alpha$    |
| До моделирования экспериментального цирроза печени (исходный уровень)           | Этанол + ДМНА + физ. раствор | 29,5 $\pm$ 6,6                | 14,8 $\pm$ 2,9   | 20,9 $\pm$ 3,7   |
|   | Этанол + ДМНА + моликсан     | 35,4 $\pm$ 7,4                | 12,2 $\pm$ 2,5   | 19,3 $\pm$ 3,2   |
| После моделирования экспериментального цирроза печени и окончания курса терапии | Этанол + ДМНА + физ. раствор | 86,9 $\pm$ 12,1*              | 43,7 $\pm$ 9,3 * | 64,5 $\pm$ 7,4 * |
|   | Этанол + ДМНА + моликсан     | 32,1 $\pm$ 4,3 #              | 23,1 $\pm$ 3,7*# | 21,2 $\pm$ 4,1 # |

Примечания: \* – различия по сравнению с соответствующими показателями, оцененными до моделирования экспериментального цирроза печени (исходный уровень),  $p \leq 0,05$ ;

# – различия по сравнению с группой «Этанол + ДМНА + физ. раствор» после моделирования экспериментального цирроза печени и окончания курса терапии,  $p \leq 0,05$ .

а также уменьшать оксидативный стресс путем индукции антиокислительных ферментов первой и второй фаз детоксикации и активации печеночных макрофагов. Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия не только уменьшает оксидативный стресс и подавляет воспалительную реакцию, которую вызывает этанол и ДМНА, но и снижает выраженность функциональных нарушений гепатоцитов, что проявляется нормализацией основных биохимических показателей деятельности печени – общего билирубина, активности АлАТ, АсАТ, ГГТП и ЩФ. Выявленный при проведении морфологических и гистохимических исследований эффект снижения уровня циррозирование печени можно объяснить способностью инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия ингибировать экспрессию трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), реализуемую, в том числе, за счет уменьшения выхода провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  [23, 29].

**Заключение.** Резюмируя результаты проведенных исследований, следует подчеркнуть, что длительное воздействие этанола и ДМНА приводило к развитию цирроза печени, который проявлялся повышением массы тела крыс, морфологическими и гистологическими изменениями тканей

печени, функциональными нарушениями гепатоцитов в виде повышения активности основных печеночных ферментов и уровня общего билирубина, а также увеличением концентрации в крови провоспалительных цитокинов. Инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия при курсовом применении на фоне сформированного токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени предупреждал формирование и прогрессирование печеночно-клеточной недостаточности и электролитных нарушений, способствовал регрессу соединительной ткани в паренхиме печени, нормализации функционально-морфологического состояния гепатоцитов у получавших этанол и ДМНА животных. В частности, применение препарата способствовало уменьшению количества (объема) соединительной ткани в печени животных, снижению выраженности основных биохимических показателей воспаления (АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ, общего билирубина), а также уменьшению концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в плазме крови. Полученные в ходе проведенного исследования данные свидетельствуют об эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия при его курсовом применении в качестве средства лечения токсического алкоголь-индуцированного цирроза печени.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leon D.A., Shkolnikov V.M., McKee M. Alcohol and Russian mortality: a continuing crisis. *Addiction*. 2009; 104 (10): 1630-
2. Иноземцев Е.С. Панельный анализ влияния потребления алкоголя на смертность в РФ. *Казанская наука*. 2010; 7: 52-8.
3. Global Health Risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. World Health Organization. Geneva, 2009.
4. Status Report on Alcohol and Health in 35 European Countries. World Health Organization, Regional office for Europe. Geneva, 20
5. Global Status Report on Alcohol and Health. World Health Organization. Geneva, 2014.
6. Крюков В.Н., Харченко В.И., Найденова Н.Г., Буромский И.В., Корякин М.В., Вишин М.М., Ундрицов В.М. Острая интоксикация этиловым спиртом, а не его суррогатами – основная причина смертельных отравлений алкоголем в России. *Наркология*. 2005; 10: 50-9.
7. Остапенко Ю.Н., Литвинов Н.Н., Рожков П.Г., Гасимова З.М., Батурова И.В. Современное состояние эпидемиологии острых химических отравлений и токсикологической помощи населению. *Токсикологический вестник*. 2010; 3: 36-9.
8. Остапенко Ю.Н. Острые отравления в России: тенденции последних лет. *Эфферентная терапия*. 2015; 21 (5): 48.
9. Neufeld M., Rehm J. Alcohol consumption and mortality in Russia since 2000: are there any changes following the alcohol policy changes starting in 2006? *Alcohol Alcohol*. 2013; 48 (2): 222-30.
10. Немцов А.В., Терехин А.Т. Размеры и диагностический состав алкогольной смертности в России. *Наркология*. 2007; 12: 29-
11. Хазанов А.И., Плюснин С.В., Белякин С.А., Васильев А.П., Бобров А.Н., Павлов А.И., Пехташев С.Г. Хроническая интоксикация алкоголем и заболевания печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2009; 19 (1): 43-
12. Бойцов С.А., Самородская И.В., Семенов В.Ю. Влияние медицинских и немедицинских факторов на смертность населения: роль алкоголя. *Социальная и клиническая психиатрия*. 2016; 26 (2): 97-1
13. Jayasekara N., English D.R., Room R., MacInnis R.J. Alcohol consumption over time and risk of death: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 2014; 179 (9): 1049-59.
14. Белякин С.А., Бобров А.Н., Плюснин С.В., Хазанов А.И., Фисун А.Я., Акимкин В.Г. Алкоголь – ведущий этиологический фактор циррозов печени с неблагоприятным исходом. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2009; 2: 29-
15. Моисеев В.С. Алкогольная болезнь. Поражение внутренних органов. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
16. Белякин С.А., Бобров А.Н., Плюснин С.В. Уровень потребления алкоголя населением и смертность, обусловленная циррозами печени. Как они связаны?
- Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. 2009; 5: 3-
17. Бобров А.Н., Белякин С.А., Плюснин С.В. Этиологическая структура циррозов печени по результатам пятнадцатилетнего наблюдения. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2011; 1: 76-
18. Винницкая Е.В., Киселева А.В. Алкогольная болезнь печени в практике терапевта. *Эффективная фармакотерапия. Гастроэнтерология*. 2014; 7: 18-24.
19. Голованова Е.В. Патогенетические подходы к лечению хронических заболеваний печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; 5: 65-
20. Маевская М.В., Морозова М.А., Ивашкин В.Т. Алгоритм ведения пациентов с алкогольной болезнью печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2011; 21 (1): 4-10.
21. Гребенюк А.Н., Рейнюк В.Л., Антушевич А.Е., Халютин Д.А., Маркосян А.М. Эффективность нейропептида и гепатопротекторов пептидной и непептидной природы в терапии крайне тяжелых отравлений этиловым спиртом. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2014; 1: 136-
22. Гребенюк А.Н., Халютин Д.А., Рейнюк В.Л., Колобов А.А. Сравнительная оценка эффективности пептидных препаратов при острых тяжелых отравлениях этанолом. *Токсикологический вестник*. 2014; 6: 15-21.
23. Халютин Д.А., Соловьева Т.С., Чирский В.С., Рейнюк В.Л., Антушевич А.Е., Гребенюк А.Н. Морфологические особенности действия пептидных препаратов при остром отравлении этиловым спиртом в эксперименте. *Токсикологический вестник*. 2015; 4: 31-
24. Халютин Д.А., Тарумов Р.А., Ховпачев А.А., Рейнюк В.Л., Антушевич А.Е., Гребенюк А.Н. Влияние пептидных препаратов на биохимические показатели сыворотки крови, головного мозга и печени крыс при остром тяжелом отравлении этиловым спиртом. *Токсикологический вестник*. 2016; 4: 28-35.
25. Хельсинкская декларация. Всемирная медицинская ассоциация. М.; 2001.
26. Антушевич А.Е., Гребенюк А.Н., Халютин Д.А., Ярцева А.А. Экспериментальное моделирование алкоголь-индуцированного цирроза печени у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 9: 387-90.
27. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. М.: Гриф и К.; 2012.
28. Louvet A., Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015; 12 (4): 231-
29. Gao B., Battaller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011; 141 (5): 1572-85.
30. Nagy L.E., Ding W.X., Cresci G., Saikia P., Shah V.H. Linking pathogenic mechanisms of alcoholic liver disease with clinical phenotypes. *Gastroenterology*. 2016; 150 (8): 1756-68.

## REFERENCES:

1. Leon D.A., Shkolnikov V.M., McKee M. Alcohol and Russian mortality: a continuing crisis. *Addiction*. 2009; 104 (10): 1630-2.
2. Inozemtsev E.S. Panel analysis of the impact of alcohol consumption on mortality in the Russian Federation. *Kazanskaya nauka*. 2010; 7: 52-(in Russian).
3. Global Health Risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. World Health Organization. Geneva, 2009.
4. Status Report on Alcohol and Health in 35 European Countries. World Health Organization, Regional office for Europe. Geneva, 20
5. Global Status Report on Alcohol and Health. World Health Organization. Geneva, 2014.
6. Kryukov V.N., Kharchenko V.I., Naydenova N.G., Burumskiy I.V., Koryakin M.V., Virin M.M., Undritsov V.M. Acute intoxication with ethyl alcohol, and not with its surrogates – the main cause of fatal alcohol poisoning in Russia. *Narkologiya*. 2005; 10: 50-(in Russian).
7. Ostapenko Yu.N., Litvinov N.N., Rozhkov P.G., Gasimova Z.M., Baturova I.V. The current state of the epidemiology of acute chemical poisoning and toxicological assistance to the population. *Toxicological Review*. 2010; 3: 36-(in Russian).
8. Ostapenko Yu.N. Acute Poisoning in Russia: Recent Trends. *Efferentnaya terapiya*. 2015; 21 (5): (in Russian).
9. Neufeld M., Rehm J. Alcohol consumption and mortality in Russia since 2000: are there any changes following the alcohol policy changes starting in 2006? *Alcohol Alcohol*. 2013; 48 (2): 222-30.
10. Nemtsov A.V., Terekhin A.T. Size and diagnostic composition of alcohol-related deaths in Russia. *Narkologiya*. 2007; 12: 29-(in Russian).
11. Khazanov A.I., Plyusnin S.V., Belyakin S.A., Vasil'ev A.P., Bobrov A.N., Pavlov A.I., Pekhtashev S.G. Chronic intoxication with alcohol and liver disease. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2009; 19 (1): 43-(in Russian).
12. Boytsov S.A., Samorodskaya I.V., Semenov V.Yu. Influence of medical and non-medical factors on the mortality of the population: the role of alcohol. *Sotsial'naya i klinicheskaya psikiatriya*. 2016; 26 (2): 97-1(in Russian).
13. Jayasekara H., English D.R., Room R., MacLennan R.J. Alcohol consumption over time and risk of death: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol*. 2014; 179 (9): 1049-59.
14. Belyakin S.A., Bobrov A.N., Plyusnin S.V., Khazanov A.I., Fisun A.Ya., Akimkin V.G. Alcohol – the leading etiologic factor of liver cirrhosis with an unfavorable outcome. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii*. 2009; 2: 29-(in Russian).
15. Moiseev V.S. Alcoholic disease. Lesion of internal organs. Moscow: GEOTAR-Media; 20(in Russian).
16. Belyakin S.A., Bobrov A.N., Plyusnin S.V. The level of alcohol consumption by the population and the mortality caused by liver cirrhosis. How are they related? *Klinicheskiy perspektivy gastroenterologii, gepatologii*. 2009; 5: 3-(in Russian).
17. Bobrov A.N., Belyakin S.A., Plyusnin S.V. The etiologic structure of liver cirrhosis according to the results of a fifteen-year observation. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii*. 2011; 1: 76-(in Russian).
18. Vinnitskaya E.V., Kiseleva A.V. Alcoholic liver disease in the practice of the therapist. *Effektivnaya farmakoterapiya. Gastroenterologiya*. 2014; 7: 18-(in Russian).
19. Golovanova E.V. Pathogenetic approaches to the treatment of chronic liver diseases. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2016; 5: 65-(in Russian).
20. Maevskaya M.V., Morozova M.A., Ivashkin V.T. Algorithm for managing patients with alcoholic liver disease. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2011; 21 (1): 4-(in Russian).
21. Grebenyuk A.N., Reynyuk V.L., Antushevich A.E., Halyutin D.A., Markosyan A.M. Comparative study of efficacy of neuropeptide and hepatoprotectors of peptide and nonpeptide origin in therapy of extremely acute poisoning with ethanol. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii*. 2014; 1: 136-(in Russian).
22. Grebenyuk A.N., Halyutin D.A., Reynyuk V.L., Kolobov A.A. Comparative evaluation of the efficacy of peptide drugs in severe acute poisoning with ethanol. *Toksikologicheskiy vestnik*. 2014; 6: 15-(in Russian).
23. Halyutin D.A., Solovyeva T.S., Czarski V.S., Reynyuk V.L., Antushevich A.E., Grebenyuk A.N. Morphological peculiarities of the action of peptide drugs at acute poisoning with ethyl alcohol in the experiment. *Toksikologicheskiy vestnik*. 2015; 4: 31-(in Russian).
24. Halyutin D.A., Tarumov R.A., Hovpachev A.A., Reynyuk V.L., Antushevich A.E., Grebenyuk A.N. The influence of peptide preparations on biochemical indices of rat blood serum, brain and liver at acute ethanol poisoning. *Toksikologicheskiy vestnik*. 2016; 4: 28-(in Russian).
25. The Helsinki Declaration. World Medical Association. Moscow; 20(in Russian).
26. Antushevich A.E., Grebenyuk A.N., Halyutin D.A., Yarseva A.A. Experimental modeling of alcohol induced liver cirrhosis in rats. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2017; 9: 387-(in Russian).
27. Mironov A.N., ed. A guide to preclinical drug research. Part Moscow: Grif & K; 20(in Russian).
28. Louvet A., Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2015; 12 (4): 231-
29. Gao B., Batailler R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011; 141 (5): 1572-85.
30. Nagy L.E., Ding W.X., Cresci G., Saikia P., Shah V.H. Linking pathogenic mechanisms of alcoholic liver disease with clinical phenotypes. *Gastroenterology*. 2016; 150 (8): 1756-68.

A.E. Antushevich<sup>1</sup>, A.N. Grebenyuk<sup>1,2</sup>, D.A. Halyutin<sup>1</sup>, A.A. Yarseva<sup>1</sup>

## INFLUENCE OF INOSINE GLYCYL-CYSTEINYL-GLUTAMATE DISODIUM ON THE CLINICAL COURSE AND OUTCOME OF THE EXPERIMENTAL ALCOHOL-INDUCED LIVER CIRRHOSIS

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Military Educational Institution of High Education "S.M.Kirov Military Medical Academy", Ministry of Defense of the Russian Federation, 194044, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Federal Budget Science Institution «North-West Scientific Center of Hygiene and Public Health», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 191036, Saint-Petersburg, Russian Federation

An evaluation of the inosine glycil-cysteinyl-glutamate disodium efficacy as a means for therapy of toxic alcohol-induced liver cirrhosis was performed in experiments on outbred white rats. Experimental modeling of liver cirrhosis was carried out by administrating intragastrically to rats two hepatotoxicants – 40% ethanol at a dose of 3 g/kg, every other day for three weeks and 1% dimethylnitrosamine at a dose of 5 mg/kg, intraperitoneally the first 4 days per week. Inosine glycil-cysteinyl-glutamate disodium was administered subcutaneously at a dose of 30 mg/kg daily for three weeks; application of the drug was started after the administration of hepatotoxicants was ended and clinical and morphological indicators of toxic liver cirrhosis were proved. Evaluation of the efficiency of inosine glycil-cysteinyl-glutamate disodium as a therapeutic means for alcohol-induced liver cirrhosis was performed by morphological, histological and biochemical methods. It was found out that a combined action of ethanol and dimethylnitrosamine led to the development of toxic liver cirrhosis, which manifested by an increase in the rats body weight, characteristic morphological and histological changes in liver tissues, increased activity of alanine and aspartate aminotransferase, gamma-glutamyltranspeptidase, alkaline phosphatase and total bilirubin level, and an increase in the blood plasma of concentration of interleukin-1 $\beta$ , interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . A course administration of inosine glycil-cysteinyl-glutamate disodium contributed to a decrease in the volume of connective tissue in the liver of animals, decrease in the activity of hepatic enzymes, decrease in the level of total bilirubin and the concentration of pro-inflammatory cytokines in the blood plasma. Data obtained show the efficacy of inosine glycil-cysteinyl-glutamate disodium as a means for treating alcohol-induced liver cirrhosis.

**Keywords:** ethanol, dimethylnitrosamine, poisoning, liver cirrhosis, treatment, inosine, oxidized glutathione.

Переработанный материал поступил в редакцию 03.10.2017 г.