

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ У БОЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ГЕПАТИТОМ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ С МЕЛАКСЕНОМ ИЛИ ЭПИФАМИНОМ

Попов С.С.¹, Шульгин К.К.², Пашков А.Н.¹, Золоедов В.И.¹, Шведов Г.И.¹

¹ ГОУ ВПО Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко

² Воронежский государственный университет

Попов Сергей Сергеевич

394000, Воронеж, ул. Кирова, д. 10

Тел.: 8 (4732) 290 9725

E-mail: popov-endo@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Проведено исследование свободнорадикального гомеостаза у больных лекарственным гепатитом, находящихся на стандартном лечении, включающем гепатопротекторы, и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном. Параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови свидетельствуют об интенсификации свободнорадикальных процессов и подавлении антиоксидантной защиты в организме пациентов с лекарственным поражением печени. При этом активность супероксиддисмутазы в сыворотке крови увеличивалась. После проведения стандартной терапии наблюдалось снижение выраженности окислительного стресса. Включение в базисное лечение эпифамина и мелаксена сопровождалось коррекцией антиоксидантного статуса организма и приводило к более выраженному антиокислительному эффекту, что подтверждалось изменениями параметров биохемилюминесценции и показателями супероксиддисмутазы. Очевидно, это связано с антирадикальными свойствами мелатонина, уровень которого корректируется под действием данных препаратов.

Ключевые слова: лекарственный гепатит; свободнорадикальные процессы; антиоксидантная система; супероксиддисмутаза; эпифамин; мелаксен.

SUMMARY

Intensity of free radical oxidation processes and superoxide dismutase activity at patients with drug-induced hepatitis at the combined therapy with melaxen or epifamin

Free radical homeostasis state at patients with drug-induced hepatitis being on standard treatment, including hepatoprotectors, and the combined therapy with melaxen or epifamin has been investigated.

Biochemiluminescence parameters in blood serum point out to intensification of free radical processes and inhibition of antioxidant defense of organism, at this time superoxide dismutase activity in blood serum increased. After leading of standard therapy a decline of oxidative stress expression was observed. Incorporation to base treatment of melaxen or epifamin accompanied by correction of antioxidant status of organism and provided more expressed antioxidant effect, that confirmed by changing of biochemiluminescence parameters and superoxide dismutase activity. Obviously, it is related to antiradical properties of melatonin the level of which is corrected under the action of these preparations.

Keywords: drug-induced hepatitis; free radical processes; antioxidant system; superoxide dismutase; epifamin; melaxen.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные гепатиты у больных туберкулезом относят к категории преимущественно токсических побочных реакций полихимиотерапии. Известно, что примерно у 20% пациентов, получающих противотуберкулезные препараты, отмечается

лекарственное поражение печени [12]. При попадании в организм токсины нарушают функционирование ферментных систем и микроциркуляцию, что приводит к повреждению клеток. Важнейшим патогенетическим фактором в развитии токсического



гепатита является действие активных форм кислорода (АФК) на клеточный гомеостаз, что приводит к развитию окислительного стресса, в основе которого лежит дисбаланс между интенсивностью свободнорадикального окисления (СО) и активностью антиоксидантной системы (АОС) организма. Негативные эффекты АФК в значительной степени подавляются под действием АОС организма, к ферментативному звену которой относится супероксиддисмутаза (СОД; КФ1.15.1.1), катализирующая реакцию дисмутации супероксиданионрадикалов с образованием кислорода и пероксида водорода [15; 16].

Имеются данные об антиоксидантных свойствах гормона эпифиза и экстрапинеальных тканей мелатонина [5]. В связи с этим приобретает актуальность исследование антиоксидантной активности эпифамина и мелаксена. Препарат эпифамин — пептидный биорегулятор, тропный к эпителиально-эпифизарной области, он относится к классу цитомединов, способных обеспечивать коррекцию содержания мелатонина в организме. Эти пептиды не только участвуют в регуляции эндокринного баланса, увеличивают синтез и секрецию мелатонина, но и оказывают положительное действие на иммунную систему, нормализуют жировой и углеводный обмен [1]. Мелаксен является лекарственным препаратом, имеющим в своем составе мелатонин. Как, известно, мелатонин по структуре является производным аминокислот, принимает участие в синхронизации суточных и сезонных ритмов организма, участвует в нейроэндокринной регуляции функций желудочно-кишечного тракта, репродуктивной, иммунной систем. В некоторых работах указывается, что данный гормон обладает противоопухолевым, антистрессовым эффектами [5–7]. Однако в настоящее время мелатонин используется в медицине в основном как регулятор цикла «сон–бодрствование».

Целью данной работы стала сравнительная характеристика способности мелаксена и эпифамина влиять на интенсивность свободнорадикального окисления биосубстратов и активность СОД у больных с лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне приема противотуберкулезных препаратов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В клиническое исследование было включено 105 человек с лекарственным гепатитом, развивающимся вследствие комплексного приема 4–5 противотуберкулезных препаратов (изониазид, стрептомицин, рифампицин, пипразинамид, этамбутол, микобутин). Среди них 62 мужчины (61%) и 43 женщины (39%). Возраст больных составлял от 21 до 75 лет: средний возраст — $45,2 \pm 7,3$ года. Все пациенты были больны инфильтративным туберкулезом легких. Средняя продолжительность заболевания составляла $2,6 \pm 0,4$ месяца. Диагноз лекарственного гепатита был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. Из

сопутствующих заболеваний регистрировались гипертоническая болезнь — у 39 больных, хронический гастрит в стадии ремиссии — у 27 больных. Критериями исключения из исследования являлись: вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения.

Больные были поделены на три группы. Первая группа пациентов (35 человек) находилась на стандартном лечении гепатопротекторами (карсил, эссенциале). Вторая группа пациентов (39 человек) дополнительно к гепатопротекторам получала эпифамин (ООО «Клиника Института биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия; удостоверение качества и безопасности № 103, регистрационное удостоверение № 004471.P.643.04.2003, биологически активная добавка) по 1 таблетке (10 мг) 3 раза в день за 10–15 минут до еды в течение 7 дней. Третья группа пациентов (31 человек) дополнительно к гепатопротекторам получала мелаксен (*Unifarm, Inc.*, США) по 1 таблетке, содержащей 3 мг мелатонина, 1 раз в день за 30–40 минут перед сном в течение 10 дней. Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц в возрасте от 21 до 52 лет с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови.

Интенсивность СО определяли на биохемилюминометре БХЛ-07 с программным обеспечением. Кинетическую кривую биохемилюминесценции регистрировали в течение 30 секунд и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (Imax и величину тангенса угла наклона кинетической кривой tga2. Активность фермента определяли на спектрофотометре *Hitachi U-1900* (Япония). Активность фермента определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН при длине волны 540 нм [4]. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-го ингибирования восстановления НСТ. Активность фермента выражали в ферментативных единицах (Е) в расчете на мл сыворотки и в виде удельной активности. Общий белок определяли унифицированным методом по биуретовой реакции [3]. Активность аланинаминотрансферазы (АлАт) определяли с помощью набора реактивов «Витал Диагностик» (Санкт-Петербург).

В работе использовали НАДН (*Sigma*, США), трис, ЭДТА (*Reanal*, Венгрия), остальные реактивы отечественного производства марки хч или чда. Статистическая обработка материала включала использование стандартных методов вариационной статистики (расчет средних значений (M), ошибка средних значений (m), t -критерия Стьюдента) и непараметрического теста Вилкоксона с использованием прикладных программ *Statistica 6.0*. Достоверными считались различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние функции печени у больных первой, второй и третьей групп до лечения по сравнению с контрольной группой характеризовалось возрастанием уровня активности АлАт в 1,8, 2,1 и 1,7 ($p < 0,05$) раза соответственно по сравнению с верхней границей нормы (189 нмоль (с.л.)). Данный биохимический показатель подтверждает, что на фоне приема противотуберкулезных препаратов у больных происходило нарушение метаболизма и повреждение гепатоцитов. После стандартного лечения гепатопротекторами (карсил и/или эссенциале) происходило уменьшение активности АлАт в среднем в 2,2 раза. В сыворотке крови второй группы пациентов, принимавших помимо гепатопротекторов эпифамин, происходило снижение уровня АлАт в 2,3 раза ($p < 0,05$), а после комбинированной терапии с мелаксеном — в 3,1 раза ($p < 0,05$). Таким образом, включение в стандартную терапию эпифамина и мелаксена усиливало гепатопротекторное действие, по-видимому, за счет антиоксидантного эффекта.

В сыворотке крови больных 1–3-й групп перед применением гепатопротекторов — карсила и/или эссенциале такие параметры БХЛ, как S и I_{max}, характеризующие интенсивность СО, были выше в среднем в 2,5 ($p < 0,05$) и 1,9 ($p < 0,05$) раза соответственно по сравнению с нормой (рис. 1 А, Б). Это указывает на то, что развивающееся при приеме противотуберкулезных препаратов лекарственное поражение печени сопровождалось значительной интенсификацией СО. Такой показатель, как $\text{tg}\alpha_2$ (рис. 1 В), отражающий степень активности АОС организма, был ниже в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим значением в норме, что свидетельствовало о снижении антиоксидантного потенциала организма больных. После проведения лечения с применением гепатопротекторов наблюдалось уменьшение S в 1,5 раза и I_{max} в 1,3 раза ($p < 0,05$), при этом $\text{tg}\alpha_2$ возрастал в среднем на 15% ($p < 0,05$) по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, на фоне базисной терапии происходило снижение выраженности окислительного стресса, сопряженное с повышением активности АОС. Вероятно, это было связано с антиокислительным эффектом силимарина и эссенциальных фосфолипидов, входящих в состав гепатопротекторов [9; 13; 11].

После комплексного лечения гепатопротекторами и эпифамином в сыворотке крови больных 2-й группы происходило уменьшение как S, так и I_{max} в среднем в 1,6 раза ($p < 0,05$). Величина $\text{tg}\alpha_2$ увеличивалась на 21% ($p < 0,05$) по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, на фоне приема комбинированной терапии с эпифамином происходило более значительное снижение интенсивности СО и возрастание активности АОС организма, чем у больных, находившихся на базисном лечении. По-видимому, под действием эпифамина происходила коррекция содержания мелатонина,

что способствовало повышению антиоксидантного статуса пациентов.

В 3-й группе больных после комбинированной терапии с мелаксеном параметры S и I_{max} уменьшались в 1,6 и 1,7 ($p < 0,05$) раза соответственно по сравнению с результатами, полученными до лечения. Величина $\text{tg}\alpha_2$ увеличивалась на 36%, что выше показателей, полученных в первой и второй группах. Очевидно, мелатонин, входящий в состав препарата, оказывал положительное действие на свободнорадикальный гомеостаз, что и приводило к более выраженному повышению активности АОС и защите гепатоцитов от действия АФК.

При лекарственном гепатите активность СОД, выраженная в Е/мл сыворотки крови, во всех группах больных увеличивалась в среднем в 1,3 ($p < 0,05$) по сравнению с нормой (рис. 2 А). Удельная активность фермента повышалась в меньшей степени — в 1,2 раза ($p < 0,05$) (рис. 2 Б). В ходе окислительного стресса наряду с конформационными перестройками возможно отщепление ингибиторных фрагментов от молекулы СОД и повышение ее активности. Поскольку благодаря СОД-реакции происходит превращение высокореакционноспособного O_2^- в относительно менее активный H_2O_2 , то, по-видимому, возрастание активности данного фермента может иметь адаптивное значение в условиях повышенной выработки АФК [10]. После проведения стандартной терапии активность СОД, выраженная как в Е/мл сыворотки крови, так и в виде удельной активности, достоверно не изменялась.

При комбинированной терапии с эпифамином у больных 2-й группы происходило возрастание активности СОД, выраженной в Е/мл сыворотки крови, на 20,0% ($p < 0,05$), удельной активности — на 16,5% ($p < 0,05$). По-видимому, мелатонин, уровень которого корректируется под влиянием эпифамина, способен оказывать действие на функционирование ферментов антиоксидантной защиты путем активации и/или стимуляции их синтеза [2].

Применение комбинированной терапии с мелаксеном сопровождалось также возрастанием активности СОД, выраженной в Е на мл, и удельной активности в сыворотке крови больных с лекарственным поражением печени на 22,1 и 18,0% соответственно по сравнению с результатами до лечения, что, очевидно, было сопряжено с воздействием на ферментативную активность мелатонина, содержащегося в исследуемом препарате. Вместе с тем следует отметить, что мелатонин обладает выраженной способностью связывать свободные радикалы, в том числе и O_2^- , который выступает по отношению к СОД в качестве индуцирующего и активирующего фактора [14].

Таким образом, включение препаратов, способных корректировать уровень мелатонина, в стандартную терапию лекарственного гепатита приводило к более выраженному антиокислительному эффекту и усилению гепатопротекторного действия по сравнению со стандартным лечением.

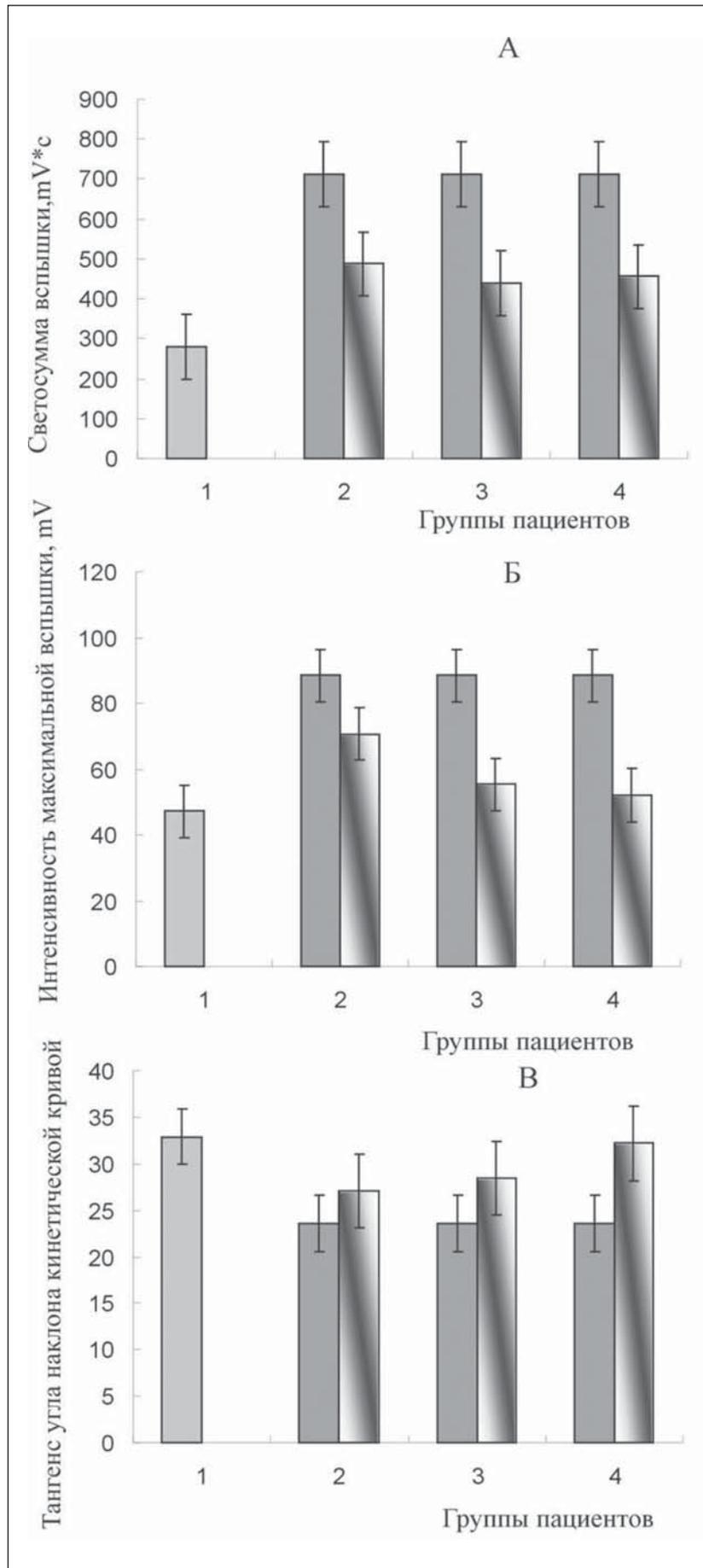


Рис. 1. Параметры биофлуоресценции S (А), I_{max} (Б), tgα (В) в сыворотке крови в норме (1), у больных с лекарственным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с эпифамином (3) и мелаксенон (4)



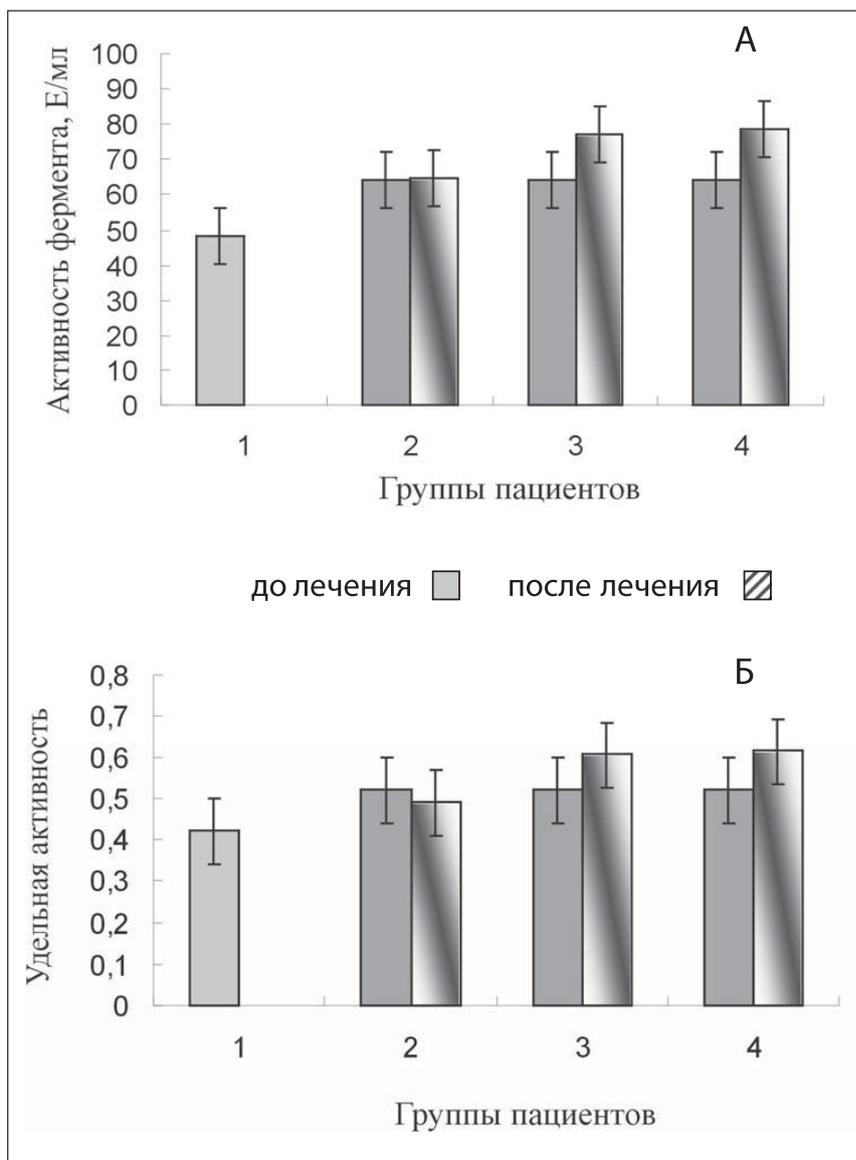


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е на мл (А), и удельная активность супероксиддисмутазы (Б), в сыворотке крови в норме (1), у больных с лекарственным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с эпифамином (3) и мелаксеном (4)

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н., Арутюнов А.В., Хависон В.Х. Антиоксидантная роль эпитамина и мелатонина. — СПб.: Наука, 1996.
2. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина // Укр. биохим. журн. — 2000. — Т. 73, № 3. — С. 5–11.
3. Матасова Л.В. Лабораторные работы и задачи по биохимии. — Воронеж: ВГУ, 2006.
4. Матюшин Б.Н. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении / Б.Н. Матюшин, А.С. Логинов, В.Д. Ткачев // Лаб. дело. — 1991. — № 7. — С. 16–19.
5. Anisimov V.N. The role of pineal gland in the breast cancer development // Crit. Rev. Oncol. Hematol. — 2003. — Vol. 46, № 3. — P.221–234.
6. Arendt J. Melatonin: Characteristics, concerns, and prospects // J. Biol. Rhythms. — 2005. — Vol. 20, № 4. — P. 291–303.
7. Castrillon P.O., Esquifino A.I., Varas A. Effect of melatonin treatment on 24-h variations in responses to mitogens and lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes // J. Neuroendocrinol. — 2000. — Vol. 12, № 8. — P. 758–765.
8. Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M. Oxidative damage to catalase induced by peroxyl radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants // Free Radic Res. — 2003. — Vol. 37, № 5. — P. 543–553.
9. Mi L.J., Mak K.M., Lieber C.S. Attenuation of alcohol-induced apoptosis of hepatocytes in rat livers by polyenylphosphatidylcholine (PPC) // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 2000. — Vol. 24, № 2. — P. 207–212.
10. Minor Th., Chung C.W., Yamamoto Y. Evaluation of Antioxidant Treatment with Superoxide Dismutase in Rat Liver Transplantation after Warm Ischemia // Eur. Surg. Res. — 1992. — Vol. 24. — P. 333–338.
11. Mira L., Suva M., Manso C. Scavenging of reactive oxygen species by silybinin dihemisuccinate // Biochem. Pharmacol. — 1994. — Vol. 48. — P. 753–759.
12. Nagayama N., Ohmori M. Seasonality in various forms of tuberculosis // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. — 2006. — Vol. 10. — P. 1117–1122.
13. Ohbayashi H. Twelve-month chronic administration of polyenylphosphatidylcholine (EPL) for improving hepatic function of fatty liver patients // Progr. Med. — 2004. — Vol. 24. — P. 1751–1756.
14. Prakash P., Laloraya M., Kumar P. Influence of a melatonin implant on the free radical load in avian thyroid and its relation with thyroid hormonogenesis // Biochem Mol Biol Int. — 1998. — Vol. 46, № 6. — P. 1249–1258.
15. Stocker R., Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies H. ed. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. — London: Academic Press. 1991.
16. Higashi T., Takei H., Sando T. Cytosol catalase: comparison with peroxisomal catalase // Cell. Struct. Funct. — 1983. — Vol. 8, № 4. — P. 480.