

УДК: 615.281.9:616.36:577.151.6

© Анісімова С.І., Шаяхметова Г.М., Вороніна А.К., Бондаренко Л.Б., Коваленко В.М., 2012

ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ МЕТОВІТАН НА ЗАЛЕЖНІ ВІД ЦИТОХРОМУ Р-450 ПРОЦЕСИ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

Анісімова С.І., Шаяхметова Г.М., Вороніна А.К., Бондаренко Л.Б., Коваленко В.М.

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

Анісімова С.І., Шаяхметова Г.М., Вороніна А.К., Бондаренко Л.Б., Коваленко В.М. Вплив експериментальної композиції Метовітан на залежні від цитохрому Р-450 процеси біотрансформації протитуберкульозних засобів в печінці щурів // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 9-11.

Застосування експериментальної композиції Метовітан справляло коригуючий вплив на рівень експресії ізоформ цитохрому Р-450 (СYP2E1, СYP3A2, СYP2C23) в печінці щурів. Подібний ефект супроводжувався нормалізацією про- та антиоксидантної рівноваги в даному органі.

Ключові слова: гепатотоксичність, цитохром Р-450, протитуберкульозні лікарські засоби, антиоксидантний статус.

Анісімова С.І., Шаяхметова А.М., Вороніна А.К., Бондаренко Л.Б., Коваленко В.Н. Влияние экспериментальной композиции Метовитан на зависимые от цитохрома Р-450 процессы биотрансформации противотуберкулезных средств в печени крыс // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 9-11.

Применение экспериментальной композиции Метовитан оказывало корригирующее действие на уровень экспрессии изоформ цитохрома Р-450 (СYP2E1, СYP3A2, СYP2C23) в печени крыс. Подобный эффект сопровождался нормализацией про- и антиоксидантного равновесия в данном органе.

Ключевые слова: гепатотоксичность, цитохром Р-450, противотуберкулезные лекарственные средства, антиоксидантный статус.

Anisimova S.I., Shayakhmetova G.M., Voronina A.K., Bondarenko L.B., Kovalenko V.M. Effect of experimental composition Metovitan on cytochrome P-450-dependent biotransformation processes of antitubercular medicines in rats' liver // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 9-11.

Administration of experimental composition Metovitan caused corrective effect on the isoforms cytochrome P-450 (СYP2E1, СYP3A2, СYP2C23) expression level in rats' liver. Such effect was accompanied by pro- and antioxidant balance normalization in this organ.

Key words: hepatotoxicity, cytochrome P-450, antitubercular medicines, antioxidant status.

Вступ. Туберкульоз є серйозною медико-біологічною та соціальною проблемою багатьох країн світу. Головним та обов'язковим компонентом сучасного підходу до лікування цього захворювання є інтенсивна та тривала хіміотерапія. Однак, лікування супроводжується рядом серйозних побічних реакцій протитуберкульозних лікарських засобів (ПТЛЗ), зокрема, їх гепатотоксичністю [1]. Баланс процесів детоксикації та активації конкретного лікарського засобу в організмі людини залежить від каталітичної активності окремих ізоформ цитохрому Р-450, які приймають участь в даних процесах [2]. **Метою** роботи було дослідити вплив експериментальної композиції Метовітан на деякі біохімічні показники, що характеризують метаболічні процеси у печінці щурів за умов комбінованого введення етамбутолу, піразинаміду, ізоніазиду та рифампіцину – базових препаратів, що застосовуються для лікування туберкульозу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в межах науково-дослідних бюджетних тем АМН 14.07 «Роль індукції цитохрому Р-450 2E1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулостатиків у печінці та гонадах самців щурів» (№ держреєстрації 0107U000392) та АМН 01.10 «Механізми гепато- та гонадотоксичної дії

протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі (експериментальне дослідження) (№ держреєстрації 0110U001219) в ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Матеріали та методи дослідження. Етамбутол, піразинамід, ізоніазид та рифампіцин у вигляді активних фармацевтичних інгредієнтів було отримано від ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод». Експериментальний зразок композиції „Метовітан” був наданий Інститутом біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

В дослідженнях використані щури-самці лінії Вістар масою тіла 150-170 г. Три групи щурів (не менше 5 в кожній) формували за методом рандомізації з попередньою акліматизацією протягом 10 днів. Тваринам першої групи внутрішньошлунково зондом протягом 60 днів сумісно вводили ізоніазид, рифампіцин, піразинамід та етамбутол в 1%-му крохмальному гелі. ПТЛЗ вводили в дозах, що застосовують у клініці для короткотермінової комбінованої терапії туберкульозу з урахуванням коефіцієнта видової чутливості: етамбутол - 155 мг/кг, рифампіцин - 74,4 мг/кг, ізоніазид - 62 мг/кг, піразинамід - 217 мг/кг протягом 60 днів [3,4]. Щурам другої групи на тлі введення ПТЛЗ внутрішньошлунково курсово по 7 днів щомісяця вводили

Метовітан у дозі 50 мг/кг. Третя група – контроль – введення перорально 1%-го крохмального гелю в об'ємі 5мл/кг.

Через 24 години після останнього введення досліджуваних речовин тварин знеживлювали методом первікальної дислокації під легким ефірним наркозом.

Експресію мРНК цитохромів P-450 2E1 (CYP2E1), 2C23 (CYP2C23) (ортолог CYP2C19 та CYP2C9) та 3A2 (CYP3A2) (ортолог CYP3A4) у печінці визначали методом зворотньо-транскриптізної полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів, як це було описано раніше [5]. Ампліфікацію проводили на термоциклері MyCycler виробництва BioRad, США.

Електрофорез нуклеїнових кислот проводили в 2 %-вому агарозному гелі та фарбували розчином бромового етидію, візуалізували в УФ-світі, фотографували за допомогою системи GelDoc, виробництва BioRad, США та аналізували в системі Quantity One BioRad System (США).

Печінку відмивали через воротну вену охолодженням 0,15 М розчином KCl та виділяли фракцію мікросом згідно S.A. Kamath [6]. Усі процедури виконували з дотриманням холодого режиму (4 °C).

У мікросомах печінки визначали *n*-нітрофенолідроксилазну активність, як це було описано раніше [5]. Швидкість НАДФН-залежного утворення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою визначали за методом І.Д. Стальної та Т.Г. Гаришвілі [7]. Активність каталази в гомогенаті печінки визначали за методом М.А. Королюк та співавт. [8]. Білок визначали за методом О.Н. Lowry та співавт. [9]. Активність супероксиддисмугази в гомогенаті печінки визначали за методом Н.Р. Misa та I. Fridovich у модифікації Сироти Т.В. [10].

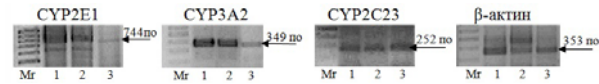
Статистичну обробку результатів проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Відмінності між групами вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати й обговорення. Нами було встановлено, що внутрішньоплузкове введення комбінації ПТЛЗ протягом 60 днів призводило до збільшення рівня експресії мРНК ізоформи цитохрому P-450 2E1 в 3,1 рази у печінці щурів порівняно з контролем (рисунок). Індукцію цитохрому P-450 2E1 при сумісному надходженні ПТЛЗ можна пояснити даними літератури, де показано, що ізоніазид є індуктором CYP2E1 [11], а рифампіцин здатний модулювати рівень експресії даної ізоформи [12, 13]. Крім того, в наших попередніх дослідженнях було встановлено, що піразинамід у високих дозах [14] та етамбутол [5] також справляють індукуючий вплив на CYP2E1.

Зростання експресії мРНК CYP2E1 за умов сумісного введення ПТЛЗ повністю узгоджується з даними щодо активності *n*-нітрофенолідроксилази - маркера CYP2E1, яка за умов застосування зазначеної комбінації зростала в 4,3 рази порівняно з контрольною групою тварин (таблиця).

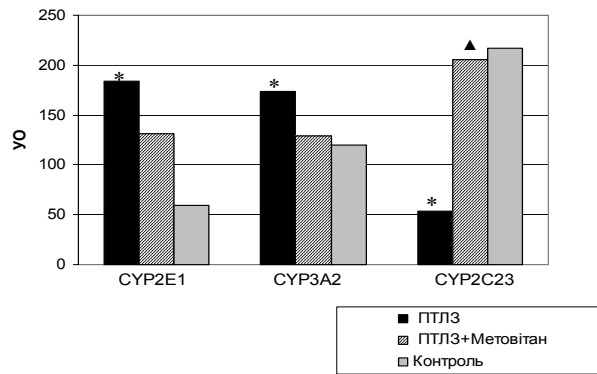
Також у печінці щурів було досліджено експресію ізоформ CYP3A2 (ортолог CYP3A4) та CYP2C23 (ортолог CYP2C19 та CYP2C9), що беруть участь в метаболізмі більшості лікарських засобів [15]. За умов введення комбінації ПТЛЗ рівень експресії мРНК ізоформи CYP3A2 збільшувався на 44% за одночасного інгібування експресії цитохрому CYP2C23 на 76%. В даному випадку необхідно зауважити, що інгібування ферменту, який метаболізує лікарський засіб, є важливим чинником фармакокінетичної взаємодії ліків. Інгібування метаболізму препарату може призводити до підвищення його концентрації в крові і, як наслідок, зростання токсичності [16].

Електрофореграми продуктів ПАР генів ізоформ цитохрому P-450; (Б) відносний рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому P-450. Інтенсивність піку β-актину взято за 100%.



А

Mr – маркер; 1 - ПТЛЗ; 2 - ПТЛЗ+Метовітан; 3 - контроль



Б

Рисунок. Рівень експресії генів ізоформ цитохрому P-450 (CYP2E1, CYP3A2, CYP2C23) в печінці щурів за умов внутрішньоплузкового введення ПТЛЗ та застосування композиції Метовітан. (А) Електрофореграми продуктів ПАР генів ізоформ цитохрому P-450; (Б) відносний рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому P-450. Інтенсивність піку β-актину взято за 100%.

Примітка: тут та в таблиці * – зміни достовірні порівняно з контрольною групою тварин; ▲ - зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили ПТЛЗ.

Виявлено коригуючу дію Метовітану на експресію цитохрому P-450 2E1, що була нижчою у 1,4 рази ніж у щурів, які отримували лише ПТЛЗ. Так само за умов введення Метовітану у 2,4 рази порівняно з нелікованими тваринами, знижувалась активність *n*-нітрофенолідроксилази. Згідно даних літератури, метаболіт метіоніну (амінокислоти, що входить до складу Метовітану) – S-аденозил-L-метіонін – здатний інгібувати активність CYP2E1 [17].

Введення Метовітану також сприяло збереженню експресії CYP3A2 та CYP2C23 на рівні контролю. Молекулярні механізми, за якими компоненти композиції Метовітан впливають на експресію ізоформ CYP3A2 та CYP2C23, потребують подальших досліджень.

Відомо, що у процесі біотрансформації лікар-

ських засобів за участі цитохрому Р-450, утворюються проміжні активні метаболіти, здатні хімічно модифікувати макромолекули та стимулювати реакції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [18]. Нами було показано активацію процесів ПОЛ за

введення комбінації ПТЛЗ у 1,6 разів, що може відбуватися як наслідок індукції системи монооксигеназ печінки (таблиця). При цьому в групі, де тварини одержували одночасно з ПТЛЗ Метовітан, даний показник був практично на рівні контролю.

Таблиця. Деякі біохімічні показники печінки щурів за умов внутрішньошлункового введення ПТЛЗ та застосування композиції Метовітан ($M \pm m$, $n \geq 5$)

Показник	Експериментальні групи		
	ПТЛЗ	ПТЛЗ+Метовітан	Контроль
Активність <i>p</i> -нітрофенолгідроксилази, нмоль/хв x мг білка	1,07±0,08*	0,45±0,02▲	0,25±0,01
НАДФН-залежне ПОЛ, нмоль/хв x мг білка	0,263±0,03*	0,178±0,02	0,164±0,01
Активність супероксиддисмутази, УО/ мг білка	105,8±3,25*	85,0±6,97	84,8±5,57
Активність каталази, нмоль/хв x мг білка	642,2±37,5*	326,0±38,4▲	352,8±21,9

Оскільки активація процесів ПОЛ залежить не лише від рівня накопичення вільних радикалів, але й від стану антиоксидантної системи, нами було вивчено вплив Метовітану на такі показники як активність супероксиддисмутази та каталази. За умов введення щурам комбінації ПТЛЗ відбувалося підвищення активності СОД та каталази відповідно на 20% та 80% порівняно з тваринами контрольної групи, яке, очевидно, носить компенсаторний характер (таблиця). За умов введення Метовітану активність антиоксидантних ферментів в печінці залишалась на тому ж рівні, що і у тварин контрольної групи.

Висновок: Застосування експериментальної композиції Метовітан запобігало порушенню залежних від цитохрому Р-450 процесів метаболізму, а також сприяло нормалізації про- та антиоксидантного статусу в печінці щурів за умов введення препаратів, що використовують за комбінованої терапії туберкульозу.

Перспективи подальшого розвитку. Отримані дані дозволяють на основі експериментальної композиції Метовітан розробляти засоби для лікування та профілактики гепатотоксичності ліків.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Мишин В.Ю. Побочное действие противотуберкулезных препаратов при стандартных и индивидуальных режимах химиотерапии / В.Ю. Мишин, В.И. Чуканов, Ю.Г. Григорьев. – М.: «Компьютербург», 2004. – 208 с.
2. Филимонова А.А. особенности метаболизма разных лекарственных средств с участием изоферментов цитохрома Р-450 / А.А. Филимонова, А.У. Зиганшин, А.Е. Зиганшина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Том 70, № 3. – С. 69-77.
3. Страчунский Л.С. Антимикробная терапия [Электронный ресурс]: руководство для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. – М.: Боргес, 2002. – 431с. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru>
4. Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
5. Анісімова С.І. Деякі механізми гепатотоксичності етамбутолу у щурів / С.І. Анісімова, В.М. Коваленко, А.Б. Бондаренко, А.В. Матвієнко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – №4. – С. 7-12.
6. Kamath S.A. A simple method for the isolation of rat

- liver microsomes / S.A. Kamath, F.A. Kummerow, K.A. Narayan // FEBS Letters. – 1971. – V.17, №1. – P. 90-92.
7. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили; под ред. В.Н. Ореховича // Современные методы в биологии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
8. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16-19.
9. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. – P. 265-275.
10. Пат. 2144674 Российская Федерация, G01N33/52, G01N33/68. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / Сирота Т.В.; заявитель и патентообладатель Сирота Т.В. – № 99103192/14; заявл. 24.02.99; опубл. 20.01.00 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ru-patent.info/21/40-44/2144674.html>
11. Yue J. Effects of rifampin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats / J. Yue, R. Peng, J. Chen, Y. Liu, G. Dong // Pharmacol. Res. – 2009. – № 59 (2). – P. 112-119.
12. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes / A. Madan, R.A. Graham, K.M. Carroll [et al.] // Drug metabol. Dispos. – 2003. – V. 31, №4. – P. 421-431.
13. Takeda K. Rifampicin suppresses hepatic CYP2E1 expression and minimizes DNA injury caused by carbon tetrachloride in perivenular hepatocytes of mice / K. Takeda, J. Watanabe, K. Inoue, S. Kanamura // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2000. – № 24 (4 Suppl). – P. 87S-92S.
14. Dose-dependent effects of pyrazinamide on liver cytochrome P-450 2E1 / V. Kovalenko, L. Bondarenko, A. Matvienko [et al.] // Acta Toxicologica. – 2007. – V. 15, №2. – P. 1-8.
15. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions / Z. Bibi // Nutr. Metab. – 2008. – V. 5. – P. 27-36.
16. Симон В.А. Цитохром Р450 и взаимодействие лекарственных веществ / В.А. Симон // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2002. – № 6 (12). – С. 25-30.
17. Cederbaum A.I. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury / A.I. Cederbaum // World J. Gastroenterol. – 2010. – № 16 (11). – P. 1366-1376.
18. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков [и др.] // БЮЛЛЕТЕНЬ СО РАМН. – 2005. – № 4 (118). – С. 7-12.

Надійшло 08.05.2012 р.
Рецензент: проф. Т.П.Тананакіна