

РЕМАКСОЛ — ПРЕПАРАТ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ЦИКЛОФОСФАНОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. Л. Коваленко¹, А. Ю. Петров¹, Д. С. Суханов³, Т. Н. Саватеева², М. Г. Романцов³

Установлено влияние ремаксола на основные показатели антиоксидантной системы клеток при экспериментальном лекарственном поражении печени. Ремаксол увеличивает уровень восстановленного глутатиона с сохранением концентрации белковых SH-групп в ткани печени на уровне, характерном для интактных животных. Ремаксол поддерживает энергетический метаболизм печеночных клеток за счет сохранения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, предотвращая окислительную модификацию глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы. Антиоксидантный эффект ремаксола подтверждается при изучении активности глутатионпероксидазы и каталазы, концентрация которых увеличивается выше уровня интактных животных, а также снижением концентрации продуктов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: лекарственное поражение печени, ремаксол, антиоксиданты, перекисное окисление липидов

ВВЕДЕНИЕ

В зависимости от характера, структуры и состава лекарственных веществ в патогенезе лекарственных поражений печени (ЛПП) имеют значение: избыточное образование свободных радикалов, активизация перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушение функции митохондрий с истощением запасов АТФ, образование гаптеннов, связывание с ядерными и цитоплазматическими молекулами, мембранными рецепторами, блокада транспортной РНК, разрушение клеточного цитоскелета [12].

Молекулярным механизмом, определяющим энергетические нарушения в условиях ограничения доставки кислорода к клетке, является митохондриальная дисфункция, которая сопровождается повышенным образованием свободных радикалов [1, 20]. В свою очередь свободные радикалы кислорода усугубляют повреждение митохондриального комплекса, формируя порочный круг [12, 23].

Из патогенетических средств лечения поражений печени широко используется группа гепатопротекторов [8]. Сукцинатсодержащие препараты относят к группе антигипоксантов/антиоксидантов, способных уменьшить тяжесть патологического воздействия [5]. К ним относят препараты прямого энергизирующего действия — субстраты и активаторы ферментов компенсаторных метаболических путей, связанных с циклом Кребса, а также “универсальные” антигипоксанты, действие которых проявляется на всех моделях гипоксии.

Активным компонентом является янтарная кислота (ЯК) — универсальный энергообеспечивающий интермедиат цикла Кребса. В физиологических условиях она диссоциирована, являясь продуктом пятой и субстратом

шестой реакций цикла трикарбоновых кислот Кребса, поэтому название ее аниона — сукцинат — часто используют как синоним термина ЯК. При этом мощность системы энергопродукции, использующей сукцинат в сотни раз превосходит все другие системы энергообразования организма [5, 7].

Комбинация сукцината с ключевыми коферментами и метаболитами жизнедеятельности клетки, усиливает возможность действия антигипоксанта на разных уровнях метаболической цепи [1, 7]. Комплексным сукцинатсодержащим антиоксидантом/антигипоксантом является ремаксол, повышающий скорость анаэробного гликолиза за счет действия рибоксина, входящего в его состав, при этом обеспечивается поставка готового НАД⁺, никотинамида. Метионин, являющийся составным компонентом ремаксола, препятствует отложению в печени молекул нейтральных липидов и является кофактором реакций трансметилирования, необходимых для протекания синтетических процессов в гепатоцитах и восстановления глутатионзависимых ферментов.

В связи с нарушением системы естественной цитопroteкции (глутатион) и утилизации кислорода при применении гепатотоксикантов изучена система глутатиона, интенсивность перекисного окисления липидов и процессы клеточного дыхания в ткани печени животных (при введении гепатотоксиканта циклофосфана) для установления возможности применения сукцинатсодержащих препаратов (ремаксол) при отравлении гепатотоксичными веществами.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценку эффективности ремаксола проводили на модели повреждения печени циклофосфаном в дозе 200 мг/кг внутрибрюшинно [7] на 21 особи нелинейных белых мышей (интактная группа — 7; опытная группа — 14). Опытная группа животных была разделена на 2 подгруппы (по 7 особей): мышам 1-й подгруппы вводили только циклофосфан; животные 2-й подгруппы через 30 мин по-

¹ ООО “Научно-технологическая фармацевтическая фирма “ПОЛИСАН”, 191119, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 112.

² Лаборатория лекарственной токсикологии (зав. — Т. Н. Саватеева) Институт токсикологии ФМБА, Санкт-Петербург.

³ Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова.

сле введения циклофосфана получали ремаксол однократно внутривенно в дозе 5 ммоль/кг (по янтарной кислоте). Продолжительность наблюдения — 4 недели.

Проведена оценка показателей, характеризующих функциональную активность печени: активность АлАТ, АсАТ, концентрация билирубина, активность щелочной фосфатазы, тимоловая проба.

О влиянии циклофосфана на аэробную подсистему энергетического обмена гепатоцитов судили по потреблению кислорода тканевыми суспензиями *in vitro* манометрическим методом с последующим расчетом интенсивности потребления кислорода в результате внесения в пробы субстрата окисления — сукцината [15].

Концентрацию восстановленного глутатиона в гомогенатах исследуемых тканей и в гемолизате эритроцитов определяли с использованием 5,5'-ди-тио-бис(-2-нитробензойной) кислоты (ДТНБ) по методике G. L. Ellman [16] в модификации С. И. Глушкова [4] с применением раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения белка в пробах, что в отличие от использования метафосфорной или трихлоруксусной кислот исключало спонтанный переход восстановленной формы глутатиона в окисленную. Содержание сульфгидрильных групп белков в тканях печени, почек и в эритроцитах проводили по методу G. Bellomo [14] в модификации С. И. Глушкова [4]. Активность глутатионпероксидазы определяли по методу А. Р. Гавриловой [2] с использованием в качестве субстрата гидроперекиси трет-бутила (ГПТБ) в модификации С. И. Глушкова [4]. Активность глутатионредуктазы определяли методом I. Carlberg и В. Mannervik [17] в модификации С. И. Глушкова [4]. Определение активности глутатион-S-трансферазы проводили по методу W. H. Nabig и W. B. Jakoby [19] в модификации С. И. Глушкова [4]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли по методу А. Kornberg и соавт. [21] в модификации С. И. Глушкова [4]. Активность каталазы определяли методом М. А. Королюка [10] в модификации С. И. Глушкова [4]. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по методу М. Uchiyama [24] в модификации С. И. Глушкова [4]. Концентрацию диеновых конъюгатов определяли по методу И. Д. Стальной [2] в модификации С. И. Глушкова [4].

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При введении циклофосфана в дозе, равной LD₅₀ экспериментальным животным в ткани печени развиваются процессы, характерные для биоэнергетической гипоксии (выраженное снижение способности гепатоцитов утилизировать НАД-зависимо окисляемые субстраты) (табл. 1).

Изучение показателей клеточного дыхания после введения животным циклофосфана выявило снижение в 3,3 раза интенсивности утилизации НАД-зависимо окисляемых субстратов, составив $0,14 \pm 0,01$, против $0,46 \pm 0,01$ в группе интактных животных (табл. 1), что, по-видимому, связано с прямым действием токсиканта на ДНК гепатоцитов, приводящее к истощению пула НАД⁺ в клетках печени. Введение ремаксоло предотвращало нарушение интенсивности окисления НАД — зависимо окисляемых субстратов, составив $0,48 \pm 0,06$, при уровне в интактной группе $0,46 \pm 0,01$ мкл/мг ткани час ($p < 0,05$).

После внесения в среду инкубации субстрата быстрого НАД-независимого окисления (янтарнокислого натрия) отмечено значительное (в 2,6 раза) повышение скорости потребления кислорода суспензией гепатоцитов в группе животных, получавших ремаксол на фоне интоксикации циклофосфаном, что составило $2,20 \pm 0,03$, против $0,85 \pm 0,03$ мкл/мг ткани в час в группе животных, получивших циклофосфан, что, вероятно, связано со способностью сукцинатсодержащего раствора не только препятствовать деградации мембран митохондрий, но и восстанавливать тиол-дисульфидный статус клетки, обеспечивая цитопротекторное действие препарата (табл. 1).

Токсическое действие циклофосфана сопровождалось падением (в 1,4 раза) содержания сульфгидрильных групп (СГ), составив $10,62 \pm 0,7$, против $14,77 \pm 0,7$ мкмоль/г ткани ($p < 0,01$) у экспериментальной группы животных, которым не проводилась коррекция препаратами, в сравнении с интактными.

Введение животным сукцинатсодержащего раствора стимулировало восстановление сульфгидрильных групп (содержание СГ составило $16,7 \pm 0,3$ мкмоль/г ткани, $p < 0,01$), способствуя восстановлению тиол-дисульфидного статуса гепатоцитов в условиях их лекарственного поражения.

В ткани печени животных, которым был введен циклофосфан, но которые не получали фармакологическую

Таблица 1. Показатели аэробного обмена в ткани печени экспериментальных животных при введении циклофосфана (200 мг/кг)

Группа	Интенсивность клеточного дыхания (мкл/мг ткани час)	
	Исходная	После стимуляции янтарнокислым натрием
Интактные животные ($n = 7$)	$0,46 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,05$
Животные, получившие циклофосфан ($n = 7$)	$0,14 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,03^{\wedge}$
Животные, получившие циклофосфан + ремаксол ($n = 7$)	$0,48 \pm 0,06$	$2,20 \pm 0,03^{*\wedge}$

* — различия значимы в группах с ремаксолом и без, $p < 0,001$.

[^] — различия значимы по сравнению с интактной группой, $p < 0,001$.

коррекцию, прослеживалось выраженное снижение (в 2,3 раза) уровня восстановленного глутатиона, в сравнении с показателем интактной группы, что составило $4,70 \pm 0,46$, против $10,8 \pm 0,7$ мкмоль/г ткани ($p < 0,001$).

Введение ремаксола повлияло на восстановление уровня глутатиона, уровень которого у животных в основной группе увеличился в 1,2 раза, достигнув $5,61 \pm 0,4$ мкмоль/г ткани. Следует отметить, что положительный эффект препарата сохранялся в течение 24-х часов. Эта столь длительная способность сукцинатсодержащего препарата поддерживать уровень восстановленного глутатиона связана с метионином, входящим в состав препарата. Установление степени влияния препарата на состояние обмена глутатиона и тиолдисульфидного равновесия невозможно без комплексного исследования активности ферментов, принимающих участие в восстановлении глутатиона — глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и глутатионредуктазы (табл. 2).

Активность Г-6-Ф-ДГ в ткани печени у животных, получивших циклофосфан (с отсутствием проводимой фармакологической коррекции) была в 1,3 раза ниже по сравнению с интактной группой животных (табл. 2), что указывает на истощение энергетических субстратов гепатоцита, необходимых для осуществления глутатионовой конъюгации и антирадикальной защиты. Поскольку данный фермент является основным источником НАДФН, являющимся коферментом для редуктазы цитохрома P450 и глутатионредуктазы, то снижение его активности является показателем крайнего истощения активности систем детоксикации в условиях токсического лекарственного повреждения клеток печени [13, 18]. Введение животным ремаксола сопровождалось индукцией фермента, при этом активность его превышала (на $15,4$ мкмоль/г ткани) активность в группе интактных животных и в 1,5 раза — активность у животных, которым вводили только гепатотоксикант. Повышая активность Г-6-Ф-ДГ, участвующего в восстановлении уровня глутатиона, ремаксол проявляет цитопротекторные и детоксицирующие свойства.

Более сложная динамика изменений отмечена в активности глутатионредуктазы (табл. 2). У животных, не подвергавшихся фармакологической коррекции, которым был введен гепатотоксикант, уровень фермента незначительно превышал ($+2,1$ мкмоль/г ткани) его уровень в интактной группе. Введение ремаксола привело к повы-

шенной выработке данного фермента, его уровень возрос на $+24$ мкмоль/г ткани, в сравнении с первичным уровнем, превышая уровень животных контрольной группы (на $26,6$ мкмоль/г ткани). Отсутствие тенденции к снижению активности глутатионредуктазы в ткани печени животных с токсическим ее повреждением является доказательством способности ремаксола предупреждать оксидативное повреждение как самой глутатионредуктазы, так и ее синергиста Г-6-Ф-ДГ, что было показано в работе [22].

Выявлено снижение активности глутатион-S-трансферазы (в 1,2 раза), у животных, не получавших фармакологической коррекции, в сравнении с группой интактных животных, а введение ремаксола животным оказало выраженное индуцирующее влияние на активность фермента. При этом последняя достигла уровня $572,5 \pm 45$, против $346,8 \pm 17,2$ мкмоль/г ткани, превысив в 1,4 раза уровень интактных животных ($418,2 \pm 16,4$ мкмоль/г ткани, $p < 0,001$).

Сходные тенденции установлены при изучении влияния ремаксола на уровень каталазной активности в ткани печени у животных, получавших гепатотоксикант.

У животных, не получавших фармакологической коррекции активность каталазы на фоне лекарственного повреждения гепатоцитов была в 1,4 раза ниже таковой животных интактной группы ($p < 0,01$). У животных, получавших ремаксол, отмечено нарастание (в 1,6 раза) активности каталазы в сравнении с таковой у животных, не получавших коррекцию ($p < 0,001$), превышая уровень фермента в 1,1 раза в группе интактных животных, что отчетливо указывает на наличие у ремаксола антиоксидантных свойств. Индуцирующее действие препарата на ферменты антиоксидантной защиты явилось решающим в предупреждении роста перекисидации липидов в тканях печени экспериментальных животных с лекарственным повреждением гепатоцитов. Повышая активность антиперекисидной защиты, ремаксол препятствовал реализации более глубокого повреждения ткани печени реакционноспособными продуктами метаболизма циклофосфана.

Отмечена выраженная активация процессов ПОЛ в ткани печени экспериментальных животных после введения циклофосфана.

Уровень малонового диальдегида и концентрация диеновых конъюгатов у животных без лечения превышали норму в 2,2 раза, составив соответственно, $380,6 \pm 15,9$, против $175,5 \pm 18,8$ нмоль/г ткани и $33,51 \pm 4,18$, при норме $14,77 \pm 0,68$ нмоль/г ткани ($p < 0,01$). Активация процессов ПОЛ у экспериментальных животных при введении им гепатотоксиканта связана с истощением восстановленного глутатиона, активацией микросомальных окислительных процессов, принимающих участие в метаболизме гепатотоксиканта, срывом процессов энергообеспечения антиоксидантной системы клетки в результате прямого повреждения молекул энергетического обмена метаболитами гепатотоксиканта и, как следствие, нарушений процессов их биосинтеза [6].

Ремаксол оказывал положительное воздействие на показатели конечных продуктов ПОЛ в ткани печени экспериментальных животных. Коррекция ремаксолом нару-

Таблица 2. Динамика активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ) и глутатионредуктазы (ГР) в ткани печени экспериментальных животных ($n = 7$)

Группа животных, препараты		Г-6-Ф-ДГ ГР (мкмоль/г ткани)
Интактные животные		$147,3 \pm 23,5$ $347,9 \pm 35,8$
Циклофосфан (200 мг/кг)	Без коррекции	$111,2 \pm 9,8$ $350,5 \pm 35,9$
	Коррекция ремаксолом	$162,7 \pm 12,4^*$ $374,5 \pm 20,7$

* различия значимы в группах с ремаксолом и без, $p < 0,001$.

шенных процессов ПОЛ снижала в 1,2 раза уровень малонового диальдегида, который превышал в 2,2 раза уровень животных интактной группы. Уровень диеновых конъюгатов под воздействием ремаксолола снизился в 1,9 раза ($p < 0,01$), составив $17,45 \pm 3,97$ при норме $14,77 \pm 0,68$ нмоль/г ткани.

Наблюдалось падение активности (в 1,3 раза) глутатионпероксидазы у животных, не получавших коррекцию сукцинатсодержащим препаратом, в сравнении с активностью фермента интактных животных, что составило $17,86 \pm 1,3$, против $23,62 \pm 2,3$ мкмоль/г ткани ($p < 0,05$) и восстановление ее после проведения коррекции ремаксололом до нормы.

Глутатионпероксидазе принадлежит ведущая роль в обезвреживании H_2O_2 и органических гидроперекисей в условиях перекисного стресса [11]. Повышением активности данного фермента при применении ремаксолола можно объяснить его антиоксидантное действие. Образующиеся в результате окислительного стресса активные формы кислорода способны повреждать не только липидные и белковые структуры, но и нуклеиновые кислоты. Здесь особое место отводится глутатион-S-трансферазе, обезвреживающей гидроперекиси ДНК, являющейся основным ферментом, определяющим уровень антиоксидантной защиты ядра [9].

ВЫВОДЫ

1. Введение ремаксолола животным с гепатотоксическим повреждением повышает уровень восстановленного глутатиона, сохраняет концентрацию сульфгидрильных групп белков в ткани печени на уровне интактных животных.

2. Ремаксол способствует поддержанию энергетических субстратов гепатоцитов за счет сохранения активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, предупреждая оксидативное повреждение глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы.

3. Антиоксидантный эффект ремаксолола отмечен при изучении активности каталазы и глутатионпероксидазы, которая под его влиянием превышала норму, а также выражался снижением концентрации конечных продуктов перекисного окисления липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Афанасьев, *Цитофлавин в интенсивной терапии. Посobie для врачей*, СПб (2005).
2. В. Б. Гаврилов, *Лаб. дело*, № 2, 60 – 64 (1988).
3. С. И. Глушков, *Автореф. дисс. к.м.н.*, СПб (1998).
4. С. И. Глушков, Дис. ... д-ра. мед. наук: 14.00.20, 03.00.04 / С. И. Глушков; ВМА, СПб (2006).
5. И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов, *Молекулярная фармакология антигипоксантов*, Н-Л, Москва (2004).
6. В. А. Кашуро, А. И. Карпищенко, С. А. Куценко, С. И. Глушков, *Клиническая лабораторная диагностика*, № 10, 43 – 46 (2002).
7. А. Л. Коваленко, *Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук*, СПб (2005).
8. Т. Г. Кожока, *Лекарственные средства в фармакотерапии патологии клетки*, Москва (2007).
9. Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский, *Усп. совр. биол.*, **107**(2), 179 – 194 (1989).
10. М. А. Корольюк, *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
11. В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, *Усп. совр. биол.*, **113**, вып. 1, 107 – 122 (1993).
12. С. В. Оковитый, *Фарминдекс-практик*, № 6, 30 – 39 (2005).
13. Л. А. Тиунов, *Вестн. РАМН*, № 3, 9 – 13 (1995).
14. Л. А. Тиунов, В. А. Тванова, *Вестн. АМН СССР*, № 1, 9 – 13 (1988).
15. В. В. Умбрейт, Р. Х. Буррис, Д. Ф. Штауффер, *Манометрические методы изучения тканевого обмена*, пер. с англ. В. А. Энгельгардта (ред.), Москва (1951).
16. G. Bellomo, H. Thor, S. Orrenius, *Meth. Enzymol.*, **186**, 627 – 635 (1990).
17. I. Carlberg, B. Mannervik, *Meth. Enzymol.*, **113**, 484 – 490 (1985).
18. G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**(1), 70 – 77 (1959).
19. W. H. Habig, *Meth. Enzymol.*, **77**, 398 – 405 (1981).
20. T. Hirata, T. Fukuse, S. Hanaoka, et al., *J. Surg Res (United States)*, **96**(2), 268 – 276 (2001).
21. A. Kornberg, *Meth. Enzymol.*, **1**, 323 – 327 (1955).
22. H. Liu and J. P. Kechrer, *Free Radic. Biol. Med.*, **3**, 433 – 442 (1996).
23. W. C. Stanley, M. P. Chandler, *Cardiovasc. Res.*, **7**, 115 – 130 (2002).
24. M. Uchiyama, *Anal. Biochem.*, **86**(1), 271 – 278 (1978).

Поступила 25.08.10

REMAXOL RESTORES ANTIOXIDANT PROTECTION SYSTEM OF LIVER UNDER EXPERIMENTAL CYCLOPHOSPHAN-INDUCED DAMAGE CONDITIONS

A. L. Kovalenko, A. Yu. Petrov, D. S. Sukhanov, T. N. Savateeva, and M. G. Romantsov

Polisan Research and Technology Company, Ligovskii prosp. 112, St. Petersburg, 192019, Russia

It is established that remaxol influences the main links of cells antioxidant system in case of experimental drug-induced liver damage. The injection of remaxol to animals with hepatotoxic damage increases the level of restored glutathione and maintains the concentration of SH groups of proteins in liver tissues on the level typical of intact animals. Remaxol helps to keep intact the energetic substrates of hepatocytes by saving the activity of glucose-6-phosphatedehydrogenase (which increases restored NADPH and glutathione enzymes), thus preventing the oxidative destruction of glutathione reductase and glutathione S-transferase. The antioxidant effect has been also confirmed by the study of catalase and glutathione peroxidase activity, the concentration of which under the action of remaxol increased above the normal level. Additional evidence is a remaxol-induced decrease in concentration of the final products of lipid peroxidation.

Key words: Drug-induced damage of liver, remaxol, antioxidants, lipid peroxidation