

Д.С. Суханов¹, Е.Д. Бажанова², Д.Л. Теплый³

¹ Северо-Западный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация

³ Астраханский государственный университет, Российская Федерация

Участие некоторых гепатопротекторов и иммуномодуляторов в регуляции апоптоза гепатоцитов, индуцированного противотуберкулезными препаратами основного ряда

В настоящее время показано, что гепатопатия вследствие лекарственной интоксикации связана с повышением уровня апоптоза гепатоцитов. Следовательно, большое значение получают препараты, регулирующие клеточную гибель. **Цель:** изучить участие в регуляции апоптоза некоторых гепатопротекторов (адеметионин, Реамберин, Ремаксол) и иммуномодуляторов (Циклоферон) на модели экспериментального поражения печени противотуберкулезными препаратами первого ряда (изониазид, рифампицин, пирразинамид). **Материалы и методы:** определяли уровень апоптоза (TUNEL), экспрессию CD95 (рецептора фактора некроза опухоли — иммуногистохимически), экспрессию каспазы-8, -3, а также p53 (вестерн-блоттингом). **Результаты:** установлено, что введение противотуберкулезных препаратов первого ряда приводит к дистрофии клеток паренхимы печени с повышением уровня апоптоза гепатоцитов с активацией CD95, каспазы-8 (внешнерецепторный путь) и оверэкспрессией p53 и каспазы-3. Реамберин, Циклоферон и Ремаксол продемонстрировали гепатопротективное действие, улучшая гистологическую картину печени; адеметионин при внутривенном введении не показал положительных эффектов. Реамберин продемонстрировал апоптоз-ингибирующее действие в эксперименте, однако остальные препараты проявили себя как индукторы апоптоза гепатоцитов в условиях токсической гепатопатии. **Выводы:** регуляция апоптоза Циклофероном и Ремаксолом осуществляется по внешнерецепторному и p53-зависимому пути, о чем свидетельствует увеличение экспрессии белков CD95 и p53. Адеметионин, вероятно, индуцирует апоптоз посредством внутреннего пути.

Ключевые слова: гепатопротекторы, Циклоферон, апоптозпротективная активность, туберкулез, поражения печени, Реамберин, Ремаксол.

45

E.D. Bazhanova¹, D.S. Sukhanov², D.L. Teply³

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, Russian Federation

² Mechnikov Northwest Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

³ Astrakhan State University, Russian Federation

Role of Hepatoprotectors and Immunomodulators in Regulation of Hepatocyte Apoptosis Induced by Antituberculosis Treatment

It was currently shown that hepatopathy due to drug toxicity is associated with increased apoptosis of hepatocytes. Therefore, development of drugs which regulate cell death is of great importance. **Aim:** to involve some hepatoprotectors (ademethionine, reamberin, remaxol) and immunomodulators (cycloferon) into regulation of apoptosis in experimental models of liver first-line antituberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide). **Materials and methods:** levels of apoptosis (TUNEL), expression of CD95 (receptor of tumor necrosis factor — by immunohistochemistry), expression of caspase-8, caspase-3 and p53 (Western-blotting) were measured. **Results:** exposition of first-line antituberculosis drugs leads to dystrophy of liver parenchyma cells with increased apoptosis of hepatocytes and activation of CD95, caspase-8 (external way) and overexpression of p53 and caspase-3. It was found that reamberin, cycloferon and remaxol have hepatoprotective effect improving liver histology; ademethionine administered by intraperitoneal injection showed no positive effects. Reamberin demonstrated apoptosis-inhibiting effect in the experiment whereas other drugs were found to be apoptosis inducers for hepatocytes in toxic hepatopathy. **Conclusions:** regulation of apoptosis by cycloferon and remaxol mediated by external and p53-dependent pathway is confirmed by increased expression of CD95 and p53 protein. Ademethionine might induce apoptosis by the intrinsic pathway.

Key words: hepatoprotectors, cycloferon, apoptosis prevention, tuberculosis, liver damage, reamberin, remaxol.

Введение

Доказано, что апоптоз гепатоцитов играет важную роль в патогенезе многих заболеваний: вирусных гепатитов [1, 2], алкогольных поражений печени [3] и других патологических состояний [4, 5]. В настоящее время отмечено увеличение числа лекарственных поражений печени [6]. Значительную долю заболеваний печени составляет лекарственная интоксикация при лечении хронических болезней, в первую очередь туберкулеза. При этом на фоне применения препаратов основного ряда лекарственные поражения печени встречаются у 60% пациентов, а при использовании препаратов резервного ряда — в 42,4% случаев [7]. Большое значение имеет исследование механизмов гибели клеток в условиях патологии и поиск возможности фармакологического воздействия на те или иные точки апоптотического каскада. Как известно, реализация апоптоза осуществляется посредством внешнерцепторного пути (с участием рецепторов фактора некроза опухоли — tumor necrosis factor receptor, TNF), митохондриального пути и с помощью активации p53-зависимого каскада.

Цель исследования: изучить роль TNF-зависимой и p53-опосредуемой индукции апоптоза на модели экспериментальной интоксикации печени с помощью противотуберкулезных препаратов (ПТП) 1-го ряда, исследовать участие ряда гепатопротекторов (Реамберин, Ремаксол, адеметионин) и иммуномодуляторов (Циклоферон) в регуляции апоптоза гепатоцитов при токсическом поражении печени ПТП 1-го ряда в опытах на половозрелых крысах.

Материалы и методы

Участники исследования

Эксперимент проведен на 36 крысах-самцах линии Wistar с исходной массой тела 174–240 мг. Повреждение печени моделировали путем введения ПТП в течение 14 сут в следующие дозы: изониазид (50 мг/кг, подкожно) + рифампицин (250 мг/кг, внутривенно) + пиперазид (45 мг/кг, внутривенно) [8]. Гепатопротекторные препараты (адеметионин, Реамберин, Ремаксол) использовали ежедневно в течение 14 сут за 1,5 ч до введения ПТП. Были сформированы следующие группы: 1) интактные крысы — контроль; 2) крысы, получавшие ПТП; 3) крысы, получавшие ПТП + Ремаксол раствор внутривенно 25 мл/кг; 4) крысы, получавшие ПТП + раствор адеметионина внутривенно 0,09 мл/100 г; 5) крысы, получавшие ПТП + Циклоферон раствор подкожно 14 сут по 3,6 мг/кг; 6) крысы, получавшие ПТП + Реамберин раствор внутривенно 25 мл/кг. Животных выводили из опыта путем декапитации, при вскрытии извлекали печень для исследования.

Методы исследования

Для оценки уровня апоптоза в ткани печени применяли метод детекции апоптоза TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling — нерадиоактивное мечение биотином, выявление диаминобензидином) с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы для выявления разрывов ДНК (набор для TUNEL «Sileks», Россия). На срезах печени проводили иммуногистохимические реакции с использованием немеченных поликлональных антител к члену суперсемейства TNF CD95 («Abcam», USA). Для определения уровня экспрессии апоптоз-ассоци-

ированных молекул в печени проводили вестерн-блот с немечеными поликлональными антителами к проапоптотическим белкам каспаза-8 («Abcam», USA) и каспаза-3 («Cell Signaling», USA), а также с немечеными моноклональными антителами к онкосупрессору p53 («Abcam», USA). В качестве контроля количества белка был сделан вестерн-блот с немечеными моноклональными антителами к GAPDH («Abcam», USA).

Анализ изображений после выполнения иммуногистохимических реакций и TUNEL выполняли при помощи микроскопа «PFM» («WPI», США) и видеокамеры «DIC-E» («WPI», США), Leika DFC 300 FX (Германия), разрешение 1392x1040 пикселей с последующей денситометрией («VideoTest Software», Россия). Определяли оптическую плотность иммунореактивного вещества в CD95 клетках на 5–6 срезах печени для каждого животного, далее — для группы крыс. Число апоптотических клеток (TUNEL-позитивных гепатоцитов) подсчитывали на 5–6 срезах печени у каждой крысы с последующим определением среднего числа на группу. Уровень экспрессии каспаз-8 и -3, а также p53 и GAPDH в печени после вестерн-блоттинга определяли с помощью денситометрии («ImageJ», USA).

Для морфологического подтверждения развития моделируемых патологических процессов и в комплексной оценке эффективности препаратов было проведено гистологическое исследование и морфологическое описание изменений на срезах печени — фиксация в 4% формалине с последующей заморозкой, окраска гематоксилином и эозином («БИОЛАМ И», Россия).

Статистическая обработка данных

В связи с однородностью содержания животных в исследуемых группах и невозможностью опровергнуть нулевую гипотезу о нормальности распределения ввиду небольшого числа единиц наблюдения, в статистической обработке были использованы методы, применяемые для нормального распределения данных. Результаты подвергались статистической обработке путем расчета среднего арифметического (M), стандартной ошибки среднего ($\pm m$). Обработка полученных результатов проведена с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа ANOVA для множественного сравнения выборочных средних. При опровержении нулевой гипотезы о равенстве средних исследуемых групп использовалось попарное сравнение с помощью теста Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В регуляции апоптоза гепатоцитов участвует множество факторов. В частности, показано участие цитокинов (TNF α , интерлейкинов) [1, 9], различных ростовых факторов и их рецепторов [9]. Важную роль в активации апоптоза отводят изменению баланса анти- и прооксидантов [10]. Однако данные о механизмах апоптоза при интоксикации печени ПТП немногочисленны и противоречивы.

Одной из целей эксперимента было выявить механизм развития запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов при токсической гепатопатии. В нашем эксперименте показано, что введение изониазида, рифампицина и пиперазида в течение 14 сут приводило к токсическому поражению печени. Повышалась интенсивность апоптоза гепатоцитов (рис. 1, 2), сочетающаяся с обна-

руженными при гистологическом анализе препаратов очагами некроза. Наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии CD95 и коррелирующее с ним увеличение активности инициаторной каспазы-8 (рис. 3). Таким образом, при введении ПТП апоптоз идет по внешне-рецепторному пути при участии поверхностно-клеточных рецепторов, членов суперсемейства рецепторов TNF CD95 (FAS/APO1), с последующей активацией каспазы-8 (превращением ее в активную форму) и разворачиванием дальнейшего каскада. Белок p53 является онкосупрессором, это один из основных проапоптотических белков, играющий важную роль в инициации апоптотического каскада. Показана индукция его синтеза (рис. 4, 5) и далее — эффекторной каспазы-3 (см. рис. 4), результирующая в фрагментации ДНК. В данном эксперименте отмечено усиление экспрессии каспазы-3 во всех случаях повышения уровня апоптоза гепатоцитов (введение ПТП, а также введение ПТП одновременно с Ремаксолом, адеметионином, Циклофероном). Невысокая экспрессия каспазы-3 в контрольной группе крыс соответствует низкому уровню апоптоза гепатоцитов в этой группе.

Препараты Ремаксол и Реамберин на данной модели патологии обладают выраженным гепатопротективным действием, уменьшая гистологические признаки дистрофии печени. Можно предположить, что янтарная кислота, входящая в их состав, нормализует клеточное дыхание, и этим обусловлен позитивный эффект данной терапии.

Известно, что янтарная кислота является мембрано-протектором и играет важную роль в регуляции свободнорадикального окисления, выступая как антиоксидант. Таким образом, можно было ожидать апоптозпротективного действия всех сукцинатсодержащих препаратов, но, по-видимому, здесь проявился дозозависимый эффект. Так, слишком маленькие дозы янтарной кислоты (Ремаксол) не оказывали влияния на апоптоз, тогда как Реамберин, содержащий больше данного ингредиента, ингибировал апоптоз, вызываемый ПТП.

Установлено, что из изученных препаратов в данных условиях только Реамберин обладает апоптозпротекторным действием. Применение его при введении ПТП не только улучшало морфологическое состояние

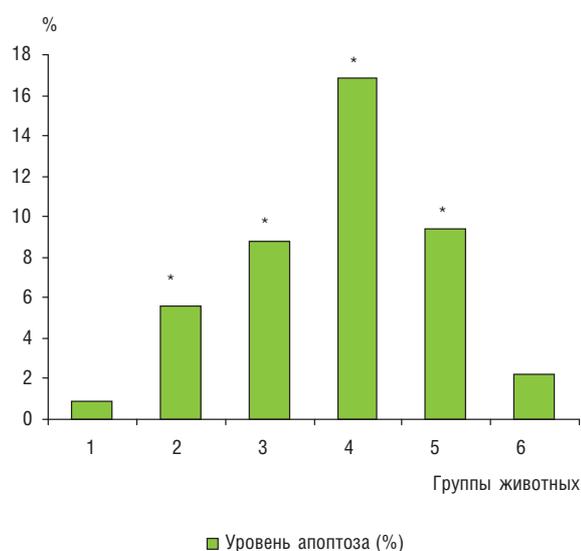
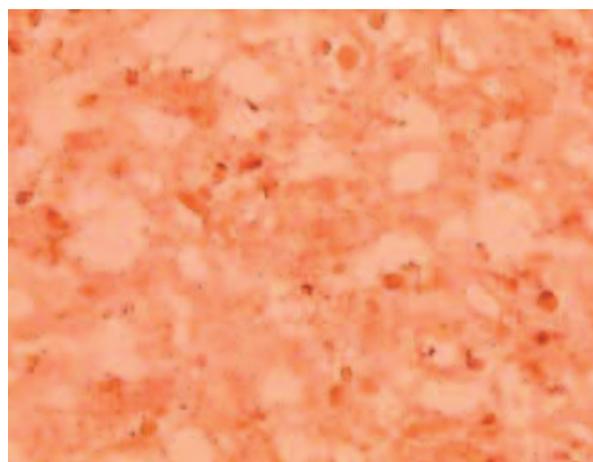


Рис. 1. Влияние противотуберкулезных препаратов Ремаксол, адеметионина раствор Циклоферон и Реамберин на уровень апоптоза гепатоцитов у крыс исследуемых групп.

Примечание (здесь и далее). * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных, # — по сравнению с группой животных, получавших противотуберкулезные препараты 1-го ряда.

47

печени, но и возвращало уровень гибели гепатоцитов к контрольным значениям (см. рис. 1, 2). При его введении наблюдалась супрессия синтеза CD95, каспазы-8 (см. рис. 3), низкий уровень апоптоза гепатоцитов коррелировал с нормальной экспрессией онкогена p53 (см. рис. 4). Таким образом, можно предположить, что механизм действия реамберина связан с подавлением внешне-рецепторного и p53-зависимого пути. Повышение интенсивности синтеза каспазы-3 при введении Реамберина при нормальном уровне апоптоза может указывать на ее неапоптотическую функцию, что показано и другими авторами [11].



а



б

Рис. 2. Печень крысы, получавшей противотуберкулезные препараты.

Примечание. а — увеличение числа апоптотических клеток (темноокрашенные клетки на препарате) печени крысы, получавшей противотуберкулезные препараты с одновременным введением Реамберина; б — незначительное число апоптотических клеток (темноокрашенные клетки на препарате). TUNEL, об. $\times 40$, ок. $\times 10$.

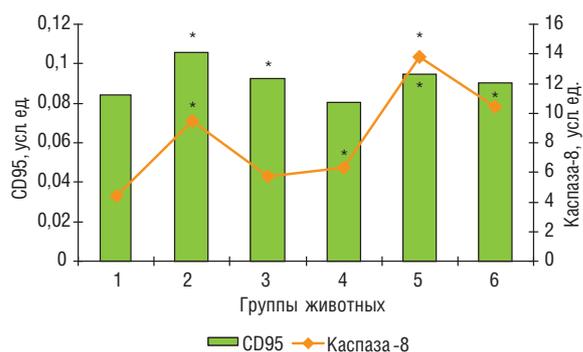


Рис. 3. Влияние противотуберкулезных препаратов Ремаксол, раствор адеметионина, Циклоферон и Реамберин на количество CD95 (FAS)- и каспаза-8-иммунореактивного материала в гепатоцитах крыс исследуемых групп.

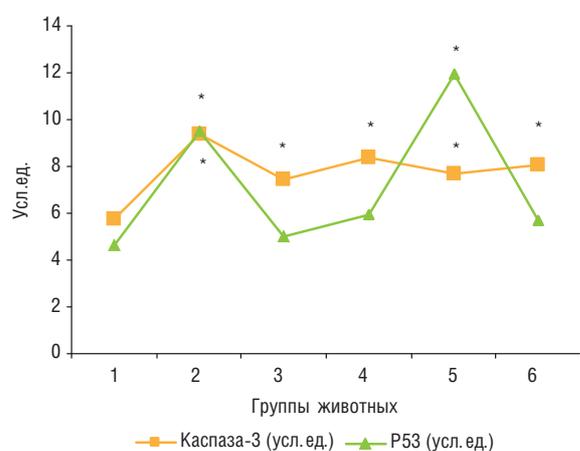


Рис. 4. Влияние противотуберкулезных препаратов Ремаксол, раствор адеметионина, Циклоферон и Реамберин на количество p53- и каспаза-3-иммунореактивного материала в гепатоцитах крыс исследуемых групп.

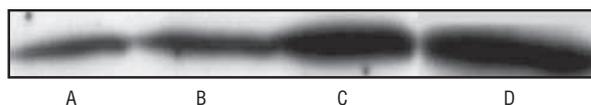


Рис. 5. Экспрессия p53 (вестерн-блоттинг).

Примечание. А, В — образцы печени контрольной крысы; С, D — образцы печени крысы, получавшей противотуберкулезные препараты.

Ремаксол, как и иммуномодулятор Циклоферон, оказывали гепатопротекторное действие, одновременно повышая уровень апоптоза (см. рис. 1). Сигнальный каскад апоптоза протекал в этом случае как по p53-зависимому пути, с обязательной активацией каспазы-3 (см. рис. 4), так и по внешнему пути (семейство TNFR, каспаза-8) (см. рис. 3). Ранее нами было показано апоптоз-ингибирующее действие Циклоферона на нейроны гипоталамуса в условиях стресса при старении [12]. Это свидетельствует о том, что роль Циклоферона в регуляции апоптоза зависит от определенных условий (физиологического состояния клеток, органов). Улучшение микроструктурного состояния печени в этом случае можно объяснить заменой очагов некроза, обнаруженных при действии ПТП, на более упорядоченный процесс апоптоза, протекающий без воспалительных явлений [13].

Один из изучаемых препаратов — адеметионин — не оказывал позитивного влияния на микроструктуру печени, что совпадает с нашими предыдущими данными [13], и при этом апоптоз был значительно повышен (см. рис. 1); также наблюдалась оверэкспрессия каспазы-8 и -3 (см. рис. 3, 4). Поскольку экспрессия CD95 не повышалась, можно предположить, что активация каспазы-8 происходила через других членов семейства TNFR; можно также предположить включение внутреннего пути активации апоптоза.

Заключение

Таким образом, апоптоз, индуцированный введением гепатотоксических препаратов (в данном случае ПТП), является каспазозависимым и активируется посредством внешнерецепторного (TNF-зависимого) и p53-зависимого пути. Адеметионин при парентеральном введении не оказывает позитивных эффектов на гепатоциты, что может быть связано с реакциями карбоксиметилирования белков с последующим образованием токсичных продуктов [14] и слишком резким поступлением в организм высоких доз метионина. Кроме того, инъекции раствора адеметионина усиливают апоптоз гепатоцитов, вызванный введением ПТП, вероятно, посредством внутреннего пути активации. Реамберин обладает выраженным гепатопротективным и апоптозпротективным действием на выбранной модели патологии, ингибируя именно задействованные пути клеточной гибели. Ремаксол и Циклоферон, напротив, показали некоторый апоптозстимулирующий эффект вместе с торможением некротических процессов, что добавляет новые характеристики в фармакодинамику данных препаратов.

REFERENCES

- Balasubramanian A., Munshi N., Koziel M.J., Hu Z., Liang T.J., Groopman J.E., Ganju R.K. Structural proteins of hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 3291–3301.
- Kuo C.Y., Chou T.Y., Chen C.M., Tsai Y.F., Hwang G.Y., Hwang T.L. Hepatitis B virus X protein disrupts stress fiber formation and triggers apoptosis. *Virus Res.* 2013; 175 (1): 20–29.
- Morio Y., Tsuji M., Inagaki M., Nakagawa M., Asaka Y., Oyamada H., Furuya K., Oguchi K. Ethanol-induced apoptosis in human liver adenocarcinoma cells (SK-Hep1): Fas- and mitochondria-mediated pathways and interaction with MAPK signaling system. *Toxicol. In Vitro.* 2013; 27 (6): 1820–1829.
- Miao H.L., Pan Z.J., Lei C.J., Wen J.Y., Li M.Y., Liu Z.K., Qiu Z.D., Lin M.Z., Chen N.P., Chen M. Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of YAP. *J. Cell Biochem.* 2013; 114 (3): 625–631.
- Ghavami S., Hashemi M., Kadkhoda K., Alavian S.M., Bay G.H., Los M. Apoptosis in liver diseases — detection and therapeutic applications. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11 (11): 3337–3345.
- An J., Mehrhof F., Harms C., Lattig-Tunnemann G., Lee S.L., Endres M., Li M., Sellge G., Mandic A.D., Trautwein C., Donath S. ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis. *J. Hepatol.* 2013; 58 (2) : 297–305.

РЕАМБЕРИН®



- ВОСПОЛНЯЕТ СУБСТРАТЫ ЦИКЛА КРЕБСА
- ОКАЗЫВАЕТ ПРОТИВОГИПОКСИЧЕСКОЕ АНТИОКСИДАНТНОЕ И ДЕТОКСИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ
- ПОВЫШАЕТ ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕДИЦИНСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ^{1,2}

Форма выпуска

Раствор для инфузий 1,5% в бутылках по 200 или 400 мл или в контейнерах полимерных по 250 или 500 мл.

Показания к применению

Реамберин применяют у взрослых и детей с 1 года в качестве антигипоксического и дезинтоксикационного средства при острых эндогенных и экзогенных интоксикациях различной этиологии.

Противопоказания

Индивидуальная непереносимость, состояние после черепно-мозговой травмы, сопровождающееся отеком головного мозга, выраженные нарушения функции почек, беременность, период лактации.

Рег. № 001048/01

 ПОЛИСАН

ООО «НТФ «ПОЛИСАН»
Россия 192102, Санкт-Петербург
ул. Салова, д. 72, к. 2, лит. А
тел: +7(812) 710-82-25
факс: +7(812) 764-62-84
www.polysan.ru



www.reamberin.ru

ЗАПУСТИ ПО-НОВОМУ

Сбалансированный состав
электролитов и сукцината
для инфузии и детоксикации

мы создаём
УНИКАЛЬНОЕ

1. Фармакоэкономическое обоснование роли трансфузионного препарата янтарной кислоты в периоперационном обеспечении резекций печени. Н. К. Мазина с соавт. Вятский медицинский вестник, №1, 2010
2. Системный анализ клинко-фармакоэкономической эффективности Реамберина при ишемическом инсульте Н. К. Мазина, В. П. Сухорукова, Д. В. Попова, Л. В. Токарева, М. А. Шермана. Вестник СПбГМА им. И. И. Мечникова. - 2006. - №1. - С. 35-42

7. Bol'f S.B., Sukhanov D.S., Romantsov M.G. Vestn. S.Pb. Gos. med. akad. I.I. Mechnikova — Bulletin of I.I. Mechnikov St. Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education. 2009; 1: 172–176.
8. Slivka Yu.I. Farmakol. i toksikol. — Pharmacology and Toxicology. 1989; 4: 82–85.
9. Zeits G. Ross. zhurn. gastroent. gepatol. koloproktol — Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2001; 4: 62–65.
10. Garcia-Vaquero M., Benedito J.L., Lapez-Alonso M., Miranda M. Histochemistry evaluation of the oxidative stress and the antioxidant status in Cu-supplemented cattle. *Animal*. 2012; 6 (9): 1435–1443.
11. Lu Y., Chen G.Q. Effector caspases and leukemia. *Int. J. Cell Biol.* 2011; 738301. doi: 10.1155/2011/738301.
12. Bazhanova E.D. Zhurn. eksperim. i klinich. farmakol — Journal of Experimental and Clinical Pharmacology. 2012; 75(7): 40–44.
13. Shevyreva E.V., Ivanov A.K., Sukhanov D.S., Murzina A.A. Antibiotiki i khimioterapiya — Antibiotics and Chemotherapy. 2012; 7(8): 31–37.
14. Lee E.S., Chen H., Hardman C., Simm A., Charlton C. Excessive S-adenosyl-L-methionine-dependent methylation increases levels of methanol, formaldehyde and formic acid in rat brain striatal homogenates: possible role in S-adenosyl-L-methionine-induced Parkinson's disease-like disorders. *Life Sci.* 2008; 83 (25–26): 821–827.

FOR CORRESPONDENCE

Sukhanov Dmitrii Sergeevich, MD, associate professor of the Department of Phthisiopulmonology and Thoracic Surgery, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University.

Address: St. Petersburg, Kirochnaya Street, 41; **tel.:** (812) 303-50-00, **e-mail:** dmitriysukhanovl@mail.ru

Bazhanova Elena Davydovna, PhD, leading research scientist of the Laboratory of Comparative Somnology and Neuroendocrinology, I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS.

Address: 194223, St. Petersburg, Thorez avenue, 44; **tel.:** (812) 552-32-27, **e-mail:** bazhanovae@mail.ru

Tepliy David Lvovich, PhD, professor, member of RANS, Head of the Department of Animal and Human Morphology and Physiology of Astrakhan State University.

Address: 414040, Astrakhan, Tatishchev Street, 20a; **tel.:** (8512) 22-93-47, **e-mail:** dima.tepliy@yandex.ru