

Д.С. Суханов¹, А.Ю. Петров², А.Л. Коваленко², М.Г. Романцов¹

¹ ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

² ООО «Научно-технологическая фармацевтическая фирма «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

Внутрипеченочная индукция эндогенного S-аденозил-L-метионина на фоне различных путей введения комплекса метионин+сукцинат и ее роль в коррекции лекарственного поражения печени

86

Проведено сравнительное экспериментальное изучение уровня эндогенного S-аденозил-L-метионина (SAM) с другими гепатопротекторными препаратами при фармакологической коррекции лекарственного поражения печени на 117 беспородных крысах-самцах. Установлено, что при воздействии противотуберкулезных препаратов только Ремаксол и Рунихол вызывали достоверный рост уровня эндогенного SAM. Учитывая улучшение лабораторных показателей и гистологической картины печени на фоне терапии Ремаксолом, а также положительное влияние Рунихола на проявления синдрома холестаза, можно сделать вывод о важности янтарной кислоты наряду с индукцией SAM в гепатопротекторном эффекте препаратов. Реамберин, содержащий янтарную кислоту без метионина, также обладает гепатопротекторным эффектом и не вызывает индукцию эндогенного SAM. Положительный терапевтический эффект экзогенного SAM при различных путях введения не коррелирует с индукцией эндогенного SAM, а связан с восстановлением клеточной мембраны гепатоцитов извне.

Ключевые слова: лекарственное поражение печени, SAM, гепатопротекторные препараты, ремаксол, рунихол.

Лекарственно индуцированные реакции, в частности поражения печени, заслуживают серьезного внимания фтизиатров в связи с неуклонным ростом заболеваемости туберкулезом с начала 90-х годов XX века, а также широким распространением лекарственно-устойчивых форм микобактерий туберкулеза (47,5–52,2%), вынуждающих к применению одновременно большого числа гепатотоксичных химиопрепаратов [1].

В основе патогенеза лекарственных поражений печени лежит прямое действие химического агента на гепатоциты и опосредованное воздействие на внутриклеточный метаболизм [2]. Метаболически опосредованное действие лекарственных препаратов приводит к дисфункции митохондрий, тканевой гипоксии с развитием дефицита аденозинтрифосфата (АТФ), активации свободнорадикального окисления и, как следствие, развитию мембрано- и цитотоксичности [3, 4].

D.S. Sukhanov¹, A.Y. Petrov², A.L. Kovalenko², M.G. Romantsov¹

¹ State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education Mechnikov North-Western state medical university

² JSC «Polysan», Saint-Petersburg

Intrahepatic induction of endogenous S-adenosyl-L-methionine against the background of various ways of administration of methionine-succinate complex and its role in drug-induced liver lesion correction

A comparative study of the level of endogenous S-adenosyl-L-methionine (SAM) with other hepatoprotectors in pharmacological correction of liver drug lesion. Among 117 male rats. It has been shown that among antituberculous drugs only Remaxol and Runihol were causing significant increase in endogenous SAM. Taking into account the amelioration of lab results as well as histological condition of the liver against the background of Remaxol treatment as well as positive effect of Runihol treatment upon cholestasis, one can draw a conclusion upon the importance of succinic acid together with SAM induction as a part of hepatoprotective effect of the drug. Reamberin, which contains succinic acid without methionine also shows hepatoprotective qualities and doesn't induce endogenous SAM production. Positive therapeutic effect of exogenous SAM regardless the way of administration doesn't correlate with endogenous SAM induction, and is associated with the external hepatocyte cell membrane restoration.

Key words: hepatic drug lesion, SAM, hepatoprotective drugs, remaxol, runihol.

Механизм действия гепатотропных средств, применяемых в клинической практике, базируется на поставке структурных компонентов мембран (эссенциальные фосфолипиды), субстратов и кофакторов энергетического обмена (сукцинатсодержащие препараты, препараты на основе липоевой кислоты), корригирующих тканевую гипоксию и восстановлении активности ферментов митохондриальных комплексов дыхательной цепи (препараты на основе растительных флавоноидов) [5].

Одним из важнейших соединений внутриклеточного метаболизма гепатоцитов является активная форма незаменимой аминокислоты метионина — S-аденозил-L-метионин (SAM, адеметионин). Основные функции SAM в организме следующие: участие в реакциях трансметилирования (синтез фосфолипидов, нуклеиновых кислот и ряда других соединений, метилирование токсических соединений во второй фазе метаболизма ксенобиотиков), транссульфатирования (синтез цистеина, глутатиона и таурина) и аминопропилирования (синтез биогенных аминов из орнитина) [5, 6].

В этой связи представляет интерес изучение уровня индукции эндогенного SAM в гепатоцитах при введении гепатопротективных препаратов на основе метионина и сукцината при лекарственном поражении печени противотуберкулезными препаратами.

Целью исследования явилась оценка уровня внутриклеточного эндогенного SAM в печени при различных путях введения комплексных препаратов на основе метионина и янтарной кислоты на модели лекарственного поражения печени противотуберкулезными препаратами с оценкой гепатопротекторного действия изучаемых препаратов.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 117 белых нелинейных беспородных крысах-самцах весом 190–210 г.

В процессе исследования поставлено 3 эксперимента по определению уровня SAM в клетках печени, согласно которым животные были рандомизированы на следующие группы и подгруппы:

1. *Здоровые животные* (n=44):
 - 1.1 интактные (n=11),
 - 1.2 крысы, получавшие раствор Рингера (n=11),
 - 1.3 крысы, получавшие экзогенный SAM парентерально (n=11),
 - 1.4 крысы, получавшие Ремаксол (n=11).
2. *Животные с экспериментальным лекарственным поражением печени с парентеральным введением комплекса метионин-сукцинат* (n=29):
 - 2.1 интактные (n=6),
 - 2.2 контрольные крысы (n=6), получавшие только противотуберкулезные препараты,
 - 2.3 крысы, получавшие Реамберин на фоне противотуберкулезных препаратов (n=6),
 - 2.4 крысы, получавшие Ремаксол на фоне противотуберкулезных препаратов (n=6),
 - 2.5 крысы, получавшие экзогенный SAM на фоне противотуберкулезных препаратов (n=5).
3. *Животные с экспериментальным лекарственным поражением печени с пероральным введением комплекса метионин-сукцинат* (n=44):
 - 3.1 интактные (n=12),
 - 3.2 контрольная группа (n=12), животные которой получали противотуберкулезный препарат,

3.3 крысы, получавшие экзогенный SAM на фоне противотуберкулезных препаратов (n=9),

3.4 крысы, получавшие Рунихол на фоне противотуберкулезных препаратов (n=11).

Лекарственное поражение печени противотуберкулезными препаратами моделировали по методике Ю.И. Сливки (1989) путем введения противотуберкулезных препаратов (ПТП) в дозах: изониазид (Н) 50 мг/кг подкожно + рифампицин (R) 250 мг/кг внутрижелудочно + пиразинамид (Z) 45 мг/кг внутрижелудочно. Длительность применения ПТП — 14 дней.

В эксперименте №1 Ремаксол (меглумина натрия сукцинат, метионин, Рибоксин и никотинамид в комплексе с электролитами) и раствор Рингера вводили в дозе 25 мл/кг, экзогенный SAM — в дозе 0,09 мл/100 г массы, смешанный с раствором Рингера эквивалентно (25 мл/кг), внутрибрюшинно, один раз в сутки, ежедневно в течение 5 дней.

В эксперименте №2 Реамберин (меглумина натрия сукцинат в комплексе с электролитами) и Ремаксол вводили в дозе 25 мл/кг, SAM — в дозе 0,09 мл/100г массы, смешанный с раствором Рингера эквивалентно (25 мл/кг). Исследуемые препараты вводили внутрибрюшинно за 1,5 ч до введения противотуберкулезных препаратов. Интактные животные получали физиологический раствор в эквивалентных количествах. Все исследуемые вещества вводили один раз в сутки, ежедневно, на протяжении 14 дней.

В эксперименте №3 Рунихол (янтарная кислота, метионин, Рибоксин и таурин) в дозе 160 мг/кг и SAM в дозе 105 мг/кг применяли внутрижелудочно за 1,5 ч до введения противотуберкулезных препаратов. Интактные животные получали физиологический раствор в эквивалентных количествах.

Все исследуемые препараты вводили один раз в сутки, ежедневно, на протяжении 14 дней.

Животных выводили из опыта путем декапитации, при вскрытии извлекали печень для последующего патоморфологического исследования.

Содержание SAM в печени крыс определяли по оригинальной методике, разработанной в Институте токсикологии, на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-20 Prominence» с диодно-матричным детектированием на колонке типа C18 (колонка хроматографическая «Phenomenex» C18, 250 × 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм, с предколонкой LC-C18). Содержание эндогенного SAM в печени рассчитывали по формуле:

$$X = (C \cdot V) / (m \cdot k),$$

где X — массовая доля SAM в печени крыс (мкг/г); C — массовая концентрация SAM, полученная из градуировочной характеристики (мкг/мл); V — объем экстрагента (мл); m — навеска печени (г); k — коэффициент извлечения SAM при экстракции. Погрешность метода 15%.

Проводили оценку биохимических показателей, среди которых выделяли функциональные (билирубин, холестерин, триглицериды крови) и ферментные (АлАТ, АсАТ, щелочная фосфатаза) тесты. Биохимическое исследование сыворотки крови выполняли на аппарате «Синхрон» (Бэкман, США).

С целью оценки гепатозащитного действия (по биохимическим показателям) использовали показатель *индекса эффективности гепатозащитного действия исследуемых препаратов (ИЭ %)* — долевую разницу показателей тяжести поражения печени в контрольной группе

Таблица 1. Влияние препаратов на содержание SAM в ткани печени здоровых животных при 5-дневном внутривенном введении (n=11 в каждой группе)

Экспериментальные группы/препараты	Содержание SAM, мкг/г	% к контрольной группе
Интактные	8,15±2,88	- (100)
Раствор Рингера	8,17±2,25	+2,4
SAM на растворе Рингера	15,34±1,75*/**	+88,2*
Ремаксол	14,53±0,82*/**	+78,3*

Примечание. * — отличия статистически значимы по сравнению с интактными, p≤0,05; ** — отличия статистически значимы по сравнению с группой, получавшей раствор Рингера, p≤0,05.

Таблица 2. Влияние парентерального комплекса метионин+сукцинат на содержание SAM в ткани печени экспериментальных животных

Группа	Содержание SAM (мкг/г)
Интактные (n=6)	16,71±1,8
HRZ (контроль) (n=6)	22,90±2,7 p1-2<0,01
Реамберин + HRZ (n=6)	12,66±1,5 p2-3<0,01
Ремаксол + HRZ (n=6)	28,56±4,1 p1-4<0,01 p3-4<0,01 p4-5<0,01
SAM+ HRZ (n=5)	15,38±1,8 p2-5<0,01

Таблица 3. Влияние перорального комплекса метионин+сукцинат на содержание SAM в ткани печени экспериментальных животных

Группа	Содержание SAM (мкг/г)
Интактные (n=12)	4,43 ±0,41
HRZ (n=12)	5,25±0,66
SAM+ HRZ (n=9)	2,49 ±0,39
Рунихол+ HRZ (n=11)	9,83±1,23 p1,4<0,001 p2,4<0,01 p3,4<0,001

и в группах животных, получавших исследуемые препараты. Индекс эффективности гепатопротекторного действия определяли по формуле:

$$\text{ИЭ \%} = \frac{n_k - n_o}{\text{пк}} \times 100,$$

где n_k и n_o — средние значения показателей, соответственно, в контрольной (группа животных, получавшая только противотуберкулезные препараты) и опытной группах.

Положительное значение ИЭ (плюс-эффект) указывает на снижение показателя пораженности. Отрицательное значение ИЭ (минус-эффект) свидетельствует об увеличении показателя пораженности.

Для патоморфологических исследований кусочки печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, осуществляли стандартную проводку, заливали в целлоидин — парафин — масло, срезы (4–6 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином, PAS и PAS+амилаза.

При оценке полученных результатов использовали параметрический тест Стьюдента–Фишера и непараметрический тест Манна–Уитни — критерий U. Корреляционный анализ проводился путем подсчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты

Анализ полученных результатов показал, что 5-дневное введение Ремаксолола и SAM здоровым крысам увеличивает уровень эндогенного SAM в ткани печени, в том числе по сравнению с раствором Рингера, а различий в действии Ремаксолола и экзогенного SAM не наблюдалось (табл. 1).

В условиях лекарственного поражения печени Ремаксолол повышал уровень SAM как по сравнению с интактными (в 1,7 раза; p<0,01), так и с животными, получавшими Реамберин и экзогенный SAM на фоне противотуберкулезных препаратов (соответственно, в 2,3 и 1,9 раза; p<0,01) (табл. 2).

По влиянию на величину показателей, отражающих функциональное состояние печени, максимальный эффект достигнут при использовании Ремаксолола, где индекс эффективности составил +29,8%, несколько уступал ему Реамберин (+26,8%); менее значительные результаты получены на фоне SAM — +19,4%, что в 1,4–1,5 раз ниже Реамберина и Ремаксолола. По средней суммарной величине ИЭ (функциональные и ферментные тесты) более эффективным оказалось действие Ремаксолола (+33,1%), далее в порядке снижения — Реамберин (+32,0%) и SAM (+23,7%).

По данным морфологического анализа срезов ткани печени, только один из изученных препаратов, а именно Ремаксолол, оказал четко выраженный эффект снижения структурных нарушений печени, вызванных противотуберкулезными препаратами, что проявлялось в восстановлении архитектоники органа, сокращении распространенности углеводной, белковой и жировой дистрофии, активации процессов внутриклеточной регенерации. При этом у животных, получавших SAM совместно с ПТП, также отмечена нормализация структуры печени и снижение степени выраженности углеводной, белковой и жировой дистрофии, как и при применении Ремаксолола. Однако SAM слабо влиял на процессы некробиоза (мелкие фокусы некроза гепатоцитов зарегистрированы в 4 из 5 случаев); более того, в одном случае обнаружен крупный очаг некроза, что свидетельствовало о возможной стимуляции альтерации печеночной ткани экзогенным SAM.

При оценке корреляционных связей уровней эндогенного SAM на фоне терапии Реамберином, Ремаксолом и экзогенного SAM установлена умеренная обратная корреляция активности АсАТ и эндогенного SAM в гепатоцитах ($r=-0,69$), уровня холестерина крови и SAM ($r=-0,4$), а также высокая обратная корреляция концентрации триглицеридов сыворотки крови и внутриклеточного адеметионина ($r=-0,8$; $p<0,05$).

Как видно из табл. 3, в условиях применения Рунихола уровень адеметионина повысился в 3,9 раза ($p<0,001$) по сравнению с группой животных, получавших экзогенный SAM.

Препараты Рунихол и пероральный SAM обладали смешанным типом действия, уменьшая выраженность и синдрома цитолиза, и синдрома холестаза. При этом только SAM способствовал достоверному снижению активности маркеров цитолиза АЛАТ и АсАТ (аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы) до величин интактного контроля. На фоне приема Рунихола активность этих ферментов хотя и уменьшилась по сравнению с животными, получавшими только ПТП, но не достигла параметров интактного контроля. Суммарный индекс эффективности по этим показателям под воздействием экзогенного SAM составил +16,7%, что в 1,8 раз выше, чем при использовании Рунихола (ИЭ +9,1%). Применение же Рунихола более благоприятно сказалось на величинах показателей, характеризующих синдром холестаза. Так, под влиянием Рунихола наблюдали: ослабление билирубинемии по величинам показателей общего и прямого билирубина (ИЭ +32,9% против +21,6% на фоне SAM) и нормализацию содержания общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности (ИЭ по этим показателям составил +30,3 против +20,7% на фоне SAM).

При гистологическом исследовании оба препарата равноценно способствовали восстановлению структуры печени, снижению распространенности углеродной, белковой и жировой дистрофии органа.

Обсуждение

В условиях хронического воздействия гепатотоксических лекарственных препаратов прослеживается четкое преобладание уровня эндогенного SAM при введении метионина (в составе Ремаксолом и Рунихола) по сравнению с аналогичным при введении уже готового экзогенного SAM. Несмотря на предполагаемую возможность существования трансмембранного нуклеозидного транспортера, способствующего проникновению экзогенного SAM внутрь клетки [7], в эксперименте показано, что последний не проникает внутриклеточно, осуществляя свою гепато- и цитопротективную активность посредством метилирования фосфолипидов внешней поверхности бислоя гепатоцитов [8]. В условиях хронического воздействия гепатотоксических лекарственных препаратов катаболизм экзогенного SAM с его последующим внутриклеточным ресинтезом энергетически невыгоден вследствие тканевой гипоксии и дефицита АТФ [3], что и объясняет отсутствие его прироста в гепатоцитах при двухнедельном воздействии противотуберкулезными химиопрепаратами. В то же время отмечен прирост ИЭ и нормализация структуры паренхимы печени, несмотря на значительное увеличение у животных

группы контроля эндогенного SAM (свидетельство реализации мембранопротекторного эффекта экзогенного SAM в этих условиях). Прирост эндогенного SAM в группе контроля не сопровождался положительными сдвигами биохимических показателей и морфологической картины печени, что, вероятно, связано с его компенсаторным синтезом и блокадой дальнейших механизмов реализации метаболического действия данного субстрата. В группе животных, получавших Реамберин, несмотря на отсутствие прироста эндогенного SAM, суммарный ИЭ имеет положительные значения, превосходящие на 7,4% эффект экзогенного SAM, что говорит о первостепенном значении воздействия на митохондриальную дисфункцию с последующей коррекцией тканевой гипоксии [9].

Механизм действия Ремаксолом и Рунихола, основанный на оптимальном соотношении метаболической композиции субстратов и кофакторов пластического и энергетического обмена, способствует восстановлению внутриклеточной АТФ с последующей активацией заблокированной при патологических воздействиях на печень метионаденозилтрансферазной реакции [10], синтезу эндогенного SAM, внутриклеточной регенерации гепатоцитов и регенерации паренхимы печени, о чем сообщалось ранее [11]. Стимуляция печеночной регенерации отчасти связана и с янтарной кислотой в составе препаратов, оказывающей рецепторно-опосредованное воздействие на GPR91 (SUCNR1) купферовских клеток печени, обеспечивающих помимо фагоцитирующей функции микроокружения, метаболизма и регенерации клеток печеночной паренхимы [12].

Заключение

Таким образом, механизм гепатозащитного действия Реамберина, Ремаксолом, Рунихола и экзогенного адеметионина представляет из себя комплекс биохимических процессов, затрагивающих цикл трикарбоновых кислот и сукцинатоксидазное окисление с последующим активным синтезом АТФ (Реамберин, Ремаксолом, Рунихол), а также индукцию эндогенного SAM (прежде всего, Рунихол и Ремаксолом) с активацией процессов трансметилирования и транссульфатирования, способствуя нивелированию токсического повреждения гепатоцитов. Механизм фармакологического действия Ремаксолом и Рунихола не сводится к изолированной индукции эндогенного SAM, а включает и значительное метаболическое действие сукцинат-аниона, что доказано гепатопротекторным эффектом Реамберина, превосходящим эффект экзогенного SAM. Значительный прирост эндогенного SAM на фоне хронического гепатотоксического воздействия подтверждает, что прирост эндогенного SAM не является единственным фактором гепатопротекторного действия метаболических препаратов; важную роль в фармакологической активности гепатопротекторов играет нормализация энергетики клетки и коррекция тканевой гипоксии, что позволяет отнести Ремаксолом и Рунихол к группе метионин- и сукцинатосодержащих гепатотропных средств. Положительный терапевтический эффект экзогенного SAM при различных путях введения не коррелирует с индукцией эндогенного SAM, а связан с восстановлением клеточной мембраны гепатоцитов извне посредством метилирования наружной части липидного бислоя.

REFERENCES

1. Rei'zis A.R., Borzakova S.N., Aksenova V.A. Gepatit, indutcirovanny'ì tuberkulostaticheskimi preparatami. *Rossii'skie medicinskie vesti*. 2011; XVI (1): 32–38.
2. Nechaev V.V., Ivanov A.K., Pantelev A.M. Sotsial'no-znachimy'e infekcii. Chast' II. *Sankt-Peterburg: OOO «Beresta»*. 2011. 440 s.
3. Radchenko V.G., Shabrov A.V., Zinov'eva E.N. Osnovy' klinicheskoi' gepatologii. *SPb.: Nevskii' dialekt*. 2005. 528 s.
4. Kozhoka T.G. Lekarstvenny'e sredstva v farmakoterapii patologii cletki. *Mosqva*. 2007. 136.
5. Okovity'i' S.V., Bezborodkina N.N., Ulei'chik S.G., Shulenin S.N. Gepatoprotektory'. *M.: GEOTAR-Media*. 2010. 112.
6. Gubergrit N.B. Ademetionin: ot farmakologii k klinicheskoi' e'ffektivnosti. *Suchasna gastroenterologiya*. 2004; 18 (4): 74–82.
7. Chishty M., Reichel A., Abbott N.J. et al. S-adenosylmethionine is substrate for carrier mediated transport at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Research*. 2002; 942 (6): 46–50.
8. Bontemps F., van Den Berghe G. Metabolism of exogenous S-adenosylmethionine in isolated rat hepatocyte suspensions: methylation of plasma-membrane phospholipids without intracellular uptake. *Biochem. J*. 1997; 327: 383–389.
9. Hazanov V.A. Farmakologicheskaja reguliatsiia e'nergeticheskogo obmena. *Eksperimental'naja i klinicheskaja farmakologiya*. 2009; 72(4): 61–64.
10. Mato J.M., Martinez-Chantar M.L., Lu S.C. Methionine metabolism and liver disease 2008. *Annu Rev. Nutr*. 2008; 28 (5): 273–293.
11. Winogradova T.I., Suhanov D.S., Zabolotny'kh N.V. i soavt. Sravnitel'naia ocenka vliianiia Remaksola i ademetionina na reparativno-regeneratory'e protsessy' pecheni v usloviakh hirurgicheskogo vmeshatel'stva v e'ksperimente. *Eksperimental'naja i klinicheskaja farmakologiya*. 2011; 74 (2): 34–39.
12. Correa P.R., Kruglov E.A., Thompson M. et al. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *Journal of Hepatology*. 2007; 47 (2): 262–269.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Суханов Дмитрий Сергеевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры физиопульмонологии и торакальной хирургии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова

Адрес: 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

Тел.: (953) 353-84-39, (812) 710-82-25 доб. 461

E-mail: dmitriysukhanovl@mail.ru

Петров Андрей Юрьевич, кандидат фармацевтических наук, начальник производственной лаборатории ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»

Адрес: 191119, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 112

Коваленко Алексей Леонидович, доктор биологических наук, директор по науке ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»

Адрес: 191119, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 112

Романцов Михаил Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова

Адрес: 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41