

# ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ЗАСОБІВ І РЯДУ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ МОНООКСИГЕНАЗНОЇ СИСТЕМИ ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

*С.І. Анісімова, асп., Г.М. Шаяхметова, к.біол.н., А. К. Вороніна, к.біол.н., В.М. Коваленко, д.біол.н., проф.*

*ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", м. Київ*

**РЕЗЮМЕ.** Сумісне введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину щурам у терапевтичних дозах викликає холестаичне ураження печінки, обумовлене модуляцією експресії ізоформ цитохрому P-450 (CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23). Зазначені зміни супроводжуються активацією ферментативного ПОЛ та порушенням тіолового статусу печінки.

**Ключові слова:** протитуберкульозні засоби, цитохром P-450, перекисне окислення ліпідів, антиоксидантна система, гепатотоксичність.

**РЕЗЮМЕ.** Совместное введение этамбутола, изониазида, пиразинамида и рифампицина крысам в терапевтических дозах вызывает холестаическое поражение печени, обусловленное модуляцией экспрессии изоформ цитохрома P-450 (CYP2E1, CYP3A2 и CYP2C23). Указанные изменения сопровождаются активацией ферментативного ПОЛ и нарушением тиолового статуса печени.

**Ключевые слова:** противотуберкулезные средства, цитохром P-450, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, гепатотоксичность.

**SUMMARY.** The therapeutic doses of ethambutol, isoniazid, pyrazinamide and rifampicin co-administration in rats leads to cholestatic liver injuries, which caused by isoforms cytochrome P-450 (CYP2E1, CYP3A2 и CYP2C23) expression modulation. Such changes are accompanied with liver enzymatic LPO activation and thiol status damage.

**Key words:** antitubercular medicines, cytochrome P-450, lipid peroxidation, antioxidant system, hepatotoxicity.

Фармакотерапія і профілактика туберкульозу вимагають своєчасного та активного застосування найбільш ефективних і безпечних лікарських засобів [1]. Сучасна терапія даного захворювання включає використання протитуберкульозних лікарських засобів (ПТЛЗ) і ряду, які поєднують високу антимікробну активність щодо *Mycobacterium tuberculosis* та помірну токсичність. Однак, тривале застосування даних препаратів може викликати розвиток ряду побічних реакцій, механізми яких досліджені недостатньо [2, 3].

Метою даної роботи було дослідження ролі І фази біотрансформації та антиоксидантного статусу у формуванні гепатотоксичної дії комбінації ПТЛЗ у щурів.

## Матеріали та методи

Субстанції етамбутолу, піразинаміду, ізоніазиду та рифампіцину були надані ЗАТ НВЦ "Борщівський хіміко-фармацевтичний завод".

У дослідженнях використані щури-самці лінії Вістар масою тіла 150-170 г. Дві групи щурів (не менше 5 в кожній) формували за методом рандомізації з попередньою акліматизацією протягом 10 днів: 1-а група — внутрішньошлункове сумісне введення ПТЛЗ в 1% крохмальному гелі; 2-а — контроль (внутрішньошлункове введення 1% крохмального гелю). ПТЛЗ вводили в дозах, що застосовують у клініці для короткотермінової комбінованої терапії туберкульозу з урахуванням ко-

ефіцієнта видової чутливості: етамбутол — 155 мг/кг, рифампіцин — 74,4 мг/кг, ізоніазид — 62 мг/кг, піразинамід — 217 мг/кг протягом 60 днів [4, 5]. Через 24 години після останнього введення ПТЛЗ тварин знеживлювали методом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом.

У сироватці крові на біохімічному аналізаторі Prestige 24i (Японія) досліджували активність лужної фосфатази (ЛФ), а також вміст загального білірубину, використовуючи біотести виробництва фірми "P. Z. Sormay", Польща.

Експресію мРНК цитохромів P-450 2E1 (CYP2E1), 2C23 (CYP2C23) (ортолог CYP2C19 та CYP2C9) та 3A2 (CYP3A2) (ортолог CYP3A4) у печінці визначали методом зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів, як це було описано раніше [6]. Ампліфікацію проводили на термоциклері MyCycler виробництва BioRad, США.

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

З метою виділення постмітохондріальної та мікросомної фракції печінку відмивали через воротну вену охолодженим 0,15 М розчином

KCl, гомогенізували та піддавали центрифугуванню у градієнті солей [7]. Усі процедури виконували з дотриманням холодого режиму (4 °C).

У фракції мікосом печінки визначали загальний вміст цитохромів P-450, п-нітрофенілгідроксилазну активність, а також вміст відновленого глутатіону у печінці, як це було описано раніше [6]. Швидкість НАДФН-залежного утворення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти) визначали за методом І.Д. Стальної та Т.Г. Гаришвілі [8]. У постмітохондріальній фракції печінки досліджували глутатіон-S-трансферазну та глутатіонредуктазну активності [9]. Активність каталази в гомогенаті печінки визначали за методом М.А. Королюк та співавт. [10]. Білок визначали за методом О.Н. Lowry та співавт. [11].

Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Дані представляли як середнє арифметичне значення та похибку середнього арифметичного ( $M \pm m$ ). Різницю між

досліджуваними показниками вважали статистично достовірною при значенні  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Вивчення біохімічних показників сироватки крові щурів-самців за умов сумісного введення ПТЛЗ виявило зростання вмісту загального білірубину у 4,6 раза та активності лужної фосфатази у 1,6 раза у порівнянні з контролем (табл.1). Ці дані свідчать про здатність протитуберкульозних засобів спричинити лікарський гепатит за холестатичним типом, який, як відомо, характеризується затримкою жовчі в гепатоцитах та жовчних шляхах [12].

Одночасно було досліджено вплив комбінації ПТЛЗ на рівень експресії цитохромів CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23 в печінці щурів (рис. 2) та деякі показники функціонування системи цитохрому P-450 (табл. 2).

Показано, що введення комбінації туберкулостатиків призводило до зростання експресії мРНК цитохромів P-450 2E1 та 3A2 в печінці піддослідних щурів у 2,4 і 1,8 раза відповідно, тоді як рівень експресії цитохрому P-450 2C23 знижувався в 4 рази порівняно з контролем.

Таблиця 1

**Вміст загального білірубину та активності лужної фосфатази в сироватці крові самців щурів за умов сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину протягом 60 днів ( $M \pm m$ ,  $n \geq 5$ )**

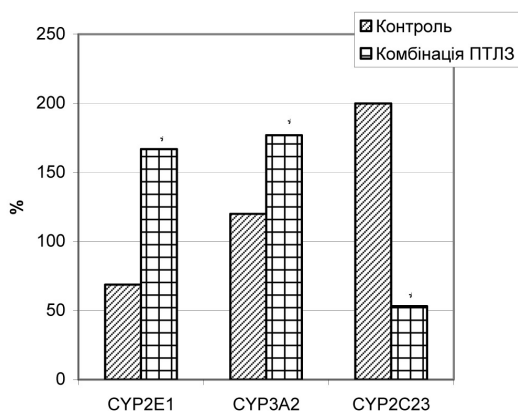
Показники	Експериментальні групи	
	Контроль (крохмальний гель)	Комбінація ПТЛЗ
Загальний білірубін, мг/дл	1,50±0,15	6,96±1,36*
ЛФ, МО/л	132,43±12,06	207,76±21,25*

Примітка: тут і далі \* — зміни достовірні порівняно з контролем



а

Примітка: Mr – маркер;  
1 – комбінація ПТЛЗ; 2 – контроль



б

Рис. 1. Відносний рівень експресії ізоформ CYP2E1, CYP3A2 та CYP2C23 у печінці щурів (б) та електрофореграми, що відображають рівень її експресії ізоформ (а) за умов сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину протягом 60 днів

Деякі показники функціонування системи цитохрому Р-450 в мікросомах печінки щурів за умов сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину протягом 60 днів ( $M \pm m$ ,  $n \geq 5$ )

Показники	Експериментальні групи	
	Контроль (крохмальний гель)	Комбінація ПТЛЗ
Загальний вміст цитохрому Р-450, нмоль/мг білка	0,63±0,02	0,76±0,05*
Активність п-нітрофенол-гідроксилази, нмоль/хв х мг білка	0,25±0,02	1,02±0,12*
НАДФН-залежне ПОЛ, нмоль/хв х мг білка	0,157±0,022	0,224±0,07*

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, які свідчать, що такі складові комбінації ПТЛЗ як рифампіцин є індуктором ізоформ СYP2E1, СYP3A та СYP2C [13]; ізоніазид здатен індукувати СYP2E1 [14] та інгібувати ізоформи СYP3A та СYP2C [15], а піразинамід у високих дозах — індуктор СYP2E1 [16]. Отже, в даному випадку можна припустити наявність індукуючої дії ізоніазиду та піразинаміду на ізоформу СYP2E1, рифампіцину — на ізоформи СYP2E1, СYP3A2 та СYP2C23, а також інгібування активності ізоформ СYP3A2 та СYP2C23 ізоніазидом. Слід зазначити, що зростання експресії мРНК СYP2E1 у печінці було прямопропорційним активності п-нітрофенолгідроксилази, як маркера СYP2E1, яка в групі піддослідних тварин була вищою у 4 рази порівняно з контролем. Отримані дані щодо індукції СYP2E1 є важливими з огляду на визначну роль даної ізоформи в механізмах розвитку гепатотоксичності ксенобіотиків [17].

Одночасно у мікросомах печінки дослідних тварин за умов сумісного введення ПТЛЗ на 20% збільшувався загальний вміст цитохрому Р-450, що можна віднести на рахунок індукції СYP2E1 та СYP3A2.

Відомо, що в результаті активації ферментів монооксигеназної системи в ході біотрансфор-

мації лікарських засобів за участі системи цитохрому Р-450, можуть утворюватись токсичні метаболіти та активні форми кисню [18]. Дійсно, нами було показано, що за умов сумісного введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу швидкість НАДФН-залежного утворення ТБК реактантів у мікросомах печінки щурів зростала на 40% у порівнянні з контролем (табл. 2.), що свідчить про активацію ліпопереокислення [19].

У випадку дії на організм ксенобіотиків, найбільш надійними критеріями стану системи детоксикації можуть слугувати активність глутатіонзалежних ферментів та рівень відновленого глутатіону [20]. Нами було зареєстровано модуляцію тіолового статусу печінки, а саме — введення шурам комбінації ПТЛЗ викликало тенденцію зростання глутатіон-S-трансферазної активності, збільшення вмісту відновленого глутатіону та глутатіонредуктазної активності в печінці на 39% та 40% відповідно (табл. 3), що можна розглядати як компенсаторний ефект, спрямований на знешкодження активних форм кисню та продуктів вільнорадикального окиснення [21].

За даних умов експерименту каталазна активність у печінці щурів дослідної групи зростала вдвічі порівняно з контрольною групою (табл. 3).

Показники, що характеризують каталазну активність та тіоловий статус печінки щурів за умов сумісного введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину протягом 60 днів ( $M \pm m$ ,  $n \geq 5$ )

Показники	Експериментальні групи	
	Контроль (крохмальний гель)	Комбінація ПТЛЗ
Вміст глутатіону, нмоль/мг білка	13,0 ± 1,32	18,04±2,01*
Активність глутатіон-редуктази, нмоль/хв х мг білка	0,15±0,004	0,21±0,010*
Активність глутатіон-трансферази, нмоль/хв х мг білка	359,49±55,32	1,99±0,23*
Активність каталази, нмоль/хв х мг білка	359,49 ± 55,32	637,52 ± 96,13*

Це цілком узгоджується з даними інших авторів, які на клітинах HepG2 показали, що за умов надмірної експресії цитохрому P-450 2E1 у 2 рази збільшується активність каталази та відбувається індукція альфа- та глутатіон-S-трансфераз мікосом, що, на думку авторів, є адаптивною відповіддю на ініційований CYP2E1 оксидативний стрес [22]. Активація ПОЛ одночасно стимулює антиоксидантну систему, спрямовану на підтримку про- та антиоксидантного гомеостазу в клітині [23].

#### Висновок

Сумісне введення етамбутолу, ізоніазиду, піразинаміду та рифампіцину у терапевтичних дозах призводить до збільшення вмісту загального білірубину та активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів, що свідчить про пошкодження печінки за холестатичним ти-

пом. Виявлена модуляція експресії ізоформ цитохрому P-450, а саме — індукція ізоформ CYP2E1 та CYP3A2 при одночасному інгібуванні ізоформи CYP2C23 у печінці. Збільшення каталазної активності паралельно з активацією ферментативного ПОЛ та порушенням глутатіонової системи може свідчити про активацію антиоксидантної системи, спрямованої на підтримку рівноваги прооксидантно-антиоксидантного статусу печінки.

Отримані дані сприяють розумінню механізмів токсичного впливу ПТЛЗ на печінку за умов їх сумісного застосування та є обґрунтуванням розробки гепатопротекторних засобів, здатних впливати на метаболічні процеси, пов'язані з функціонуванням системи цитохрому P-450.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении туберкулеза / Ю. И. Фещенко, С. А. Черенько, В. И. Мальцев [и др.] // Укр. Мед. Часопис. — 2008. — Том 65, № 3. — С.117 — 125.
2. 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. — 208с.
3. Машковский, М. Д. Лекарственные средства: В 2 т. Т.2. — 14-е изд., перераб., испр. и доп. [Текст] / М. Д. Машковский. — М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2000. — 608 с.
4. 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>
5. 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>
6. Деякі механізми гепатотоксичності етамбутолу у щурів / С.І. Анісімова, В.М. Коваленко, Л.Б. Бондаренко [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2011. — №4. — С. 7 — 12.
7. 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.
8. 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.
9. Current Protocols in Toxicology / Ed. by M. Maines, John Wiley & Sons, Inc. — 2005. — P. 2758.
10. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лабораторное дело. — 1988. — №1. — С. 16 — 19.
11. 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.
12. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников- М.: МЕД пресс-информ, 2004. — 911 с.
13. 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.
14. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions / Z. Bibi // Nutr. Metab. — 2008. — V. 5. — P. 27 — 36.
15. Desta Z. Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A4 / Z. Desta, N.V. Soukhova, D.A. Flockhart // Antimicrob. Agents Chemother. — 2001. — V. 45, №2. — P. 382 — 392.
16. 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.
17. Charles S. Lieber. Cytochrome P-4502E1: Its Physiological and Pathological Role / Charles S. Lieber. // Physiological Reviews. — 1997. — V. 77, № 2. — P. 517 — 544.
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.
19. Cytochrome P450 2E1 expression induces hepatocyte resistance to cell death from oxidative stress / B.E. Jones, H. Liu, C.R. Lo [et al.] // Antioxid. Redox. Signal. — 2002. — V.4, №5. — P. 701 — 709.
20. Jung K.A. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants / K.A. Jung, M.K. Kwak // Molecules. — 2010. — V.15, №10. — P. 7266 — 7291.
21. Caro A.A. Oxidative stress, Toxicology, and Pharmacology of CYP2E1 / A.A. Caro, A.I. Cederbaum // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. — 2004. — V.44. — P.27 — 42.
22. Mari M. Induction of catalase, alpha, and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress / M. Mari, A.I. Cederbaum // Hepatology. — 2001. — V.33, №3. — P. 652 — 661.
23. Calabrese E.J. Catalase: its role in xenobiotic detoxification / E.J. Calabrese, A.T. Canada // Pharmacol. Ther. — 1989. — V. 44, №2. — P. 297 — 307.

Надійшла до редакції 6.01.2012 р.