

УДК 616.441-00861  
©Коллектив авторов

## **ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ И NADPH-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ГЕПАТИТОМ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ С ЭПИФАМИНОМ**

***С.С. Попов<sup>1\*</sup>, К.К. Шульгин<sup>2</sup>, А.Н. Пашков<sup>1</sup>, В.И. Золотов<sup>1</sup>,  
Г.И. Шведов<sup>1</sup>, Т.И. Рахманова<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, 394000, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10; тел.: 8(4732)2909725; эл. почта: popov-endo@mail.ru

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1

Проведено исследование активности глутатионовой антиоксидантной системы у больных лекарственным гепатитом на фоне стандартного лечения и комбинированной терапии с эпифамином. Установлено, что в сыворотке крови пациентов до лечения наблюдается снижение уровня восстановленного глутатиона (GSH) и возрастание активностей глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) относительно контроля. При комбинированной терапии с эпифамином происходило более эффективное изменение уровня GSH в сторону нормальных значений, чем в группе больных, находящихся на базисном лечении гепатопротекторами. Лечение с эпифамином способствовало также повышению активностей ГП и ГР в большей степени, чем стандартная терапия. Активности NADPH-генерирующих ферментов – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы, снижающиеся при лекарственном гепатите, при комбинированной терапии с эпифамином возрастали более значительно, чем при базисном лечении. Результаты указывают на позитивное действие препарата на оксидативный статус организма при его применении на фоне стандартной терапии лекарственного гепатита, что, очевидно, сопряжено с антиоксидантным действием эпифамина.

**Ключевые слова:** лекарственный гепатит, глутатионовая антиоксидантная система, гепатопротекторы, эпифамин.

---

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Гепатотоксические эффекты противотуберкулёзной полихимиотерапии представляют собой актуальную проблему медицины. По данным различных авторов, частота побочных реакций на противотуберкулёзные препараты колеблется от 15 до 25%. Причем, число пациентов с туберкулезом лёгких, у которых проведение химиотерапии вызывает токсическое поражение печени с каждым годом увеличивается [1]. При лекарственном гепатите наблюдается повышенная активность ферментов системы цитохрома P450 в печени, что, в свою очередь, сопровождается резким увеличением выработки токсичных метаболитов, включая активные формы кислорода (АФК). Токсические эффекты свободных радикалов в значительной мере зависят от степени их генерации, наличия ионов металлов переменной валентности и активности антиоксидантной системы (АОС) организма. АФК, вырабатываемые в повышенных количествах при интенсификации свободнорадикального окисления (СО), вызывают повреждения субклеточных структур гепатоцитов.

В регуляции СО важнейшее место занимает глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная (ГР, КФ 1.6.4.2.; ГП, КФ 1.11.1.9.) ферментативная система, которая обеспечивает детоксикацию гидропероксидов с помощью восстановленного глутатиона (GSH) [2]. Образующийся в ходе глутатионредуктазной реакции GSH выполняет роль акцептора гидроксильного радикала, а также является ингибитором процессов пероксидного окисления липидов на стадии разветвления цепи. Скорость образования GSH в сопряженной реакции, катализируемой ГР, зависит в основном от уровня NADPH. Одним из основных поставщиков NADPH для системы ГР/ГП является пентозофосфатный путь (ПФП), ключевым ферментом которого является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ; КФ 1.1.1.49), катализирующая превращение глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон [3]. Имеются данные, что альтернативным источником NADPH может быть реакция, катализируемая NADP – изоцитратдегидрогеназой (NADP-ИЦДГ; КФ 1.1.1.42), в ходе которой происходит окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата [4].

Однако, не всегда собственных резервов достаточно для поддержания нормального антиоксидантного статуса организма. В связи с этим представляют интерес исследования, связанные с анализом эффектов веществ, обладающих антиоксидантным потенциалом. В литературе имеются данные об антиоксидантных свойствах гормона эпифиза и экстрапинеальных тканей – мелатонина, который может участвовать в адаптационных процессах, регулировать иммунные реакции организма [5]. В настоящей работе мы использовали на фоне проведения традиционной терапии у больных с лекарственным гепатитом эпифамин, который является пептидным биорегулятором, тропным к эпифизарной области. Эпифамин относится к классу цитомединов, которые имеют способность обеспечивать коррекцию содержания мелатонина в организме [6].

Таким образом, целью настоящей работы явилась оценка содержания GSH и активностей ГР, ГП, Г6ФДГ и NADP-ИЦДГ в сыворотке крови больных лекарственным поражением печени при стандартном лечении и комбинированной терапии с эпифамином.

**МЕТОДИКА.** В клиническое исследование было включено 74 человека с лекарственным гепатитом, развивающимся вследствие комплексного приёма 4-5 противотуберкулёзных препаратов (изониазид, стрептомицин, рифампицин, пиразинамид, этамбутол, микобутин). Среди них 45 мужчин (64%) и 29 женщин (36%). Все больные дали информированное согласие на участие в исследовании. Работа поддержана этической комиссией Воронежской государственной академии им. Н.Н. Бурденко. Возраст больных составлял от 21 до 75 лет: средний возраст – 44,1±6,1 года. Все пациенты были больны инфильтративным туберкулезом лёгких. Средняя продолжительность заболевания составляла 2,7±0,3 месяца. Диагноз лекарственного гепатита был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового

исследования печени. Из сопутствующих заболеваний регистрировались гипертоническая болезнь – у 27 больных, хронический гастрит в стадии ремиссии – у 16 больных. Критериями исключения из исследования являлись: вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, сахарный диабет, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения.

Больные были разделены на 2 группы. Первая группа пациентов (35 человек) находилась на стандартном лечении гепатопротекторами (карсил, эссенциале). Вторая группа пациентов (39 человек) дополнительно к гепатопротекторам получала эпифамин (ООО “Клиника Института биорегуляции и геронтологии”, Санкт-Петербург, Россия; удостоверение качества и безопасности №103, регистрационное удостоверение №004471.P.643.04.2003, биологически активная добавка) по 1 таблетке (10 мг) 3 раза в день за 10-15 минут до еды в течение 7 дней. Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц в возрасте от 21 до 52 лет с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови.

Активность исследуемых ферментов в сыворотке крови определяли спектрофотометрически при 340 нм. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение микромоля субстрата за 1 мин при 25°C. Активность ГР определяли в среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH и 0,8 мМ окисленного глутатиона (GSSG). Измерение активности ГП проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ед/мл ГР. Среда измерения активности Г6ФДГ содержала 0,05 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ NADP. Активность NADP-ИЦДГ определяли в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), 1,5 мМ изоцитрат, 0,25 мМ NADP, 2 мМ MnCl<sub>2</sub>. Концентрацию GSH определяли с помощью реакции с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой [7]. Содержание белка определяли биуретовым методом.

В ходе работы использовали изоцитрат (“Sigma”, США), NADP, NADPH, трис-HCl-буфер, ЭДТА (“Reanal”, Венгрия), GSSG, GSH, глюкозо-6-фосфат (“ICN”, США), остальные реактивы отечественного производства квалификации “хч” или “чда”.

Статистическая обработка материала включала использование стандартных методов вариационной статистики (расчёт средних значений, ошибки средних значений, t-критерия Стьюдента) и непараметрического теста Вилкоксона с использованием прикладных программ “STATISTICA 6.0”. Достоверными считались различия при  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В 1-ой группе больных с лекарственным поражением печени до назначения гепатопротекторов содержание GSH в сыворотке крови уменьшалось в среднем в 1,98 раза ( $p < 0,05$ ) относительно контрольного уровня. Вероятно, это было связано со значительным возрастанием расходования этого метаболита при интенсификации СО, так как известно, что данный тиол способен проявлять антиоксидантные свойства и связывать АФК [8]. GSH принадлежит ключевая роль в системе низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов, и он может инактивировать свободные радикалы как прямо, являясь акцептором гидроксильного радикала, синглетного кислорода, так и опосредованно за счёт участия в ферментативных процессах, обеспечивающих антиоксидантную защиту [9].

После проведения стандартного лечения наблюдалось увеличение концентрации GSH в среднем в 1,57 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным уровнем до назначения терапии: под действием карсила и/или эссенциале происходило изменение содержания GSH в сторону нормы. Очевидно, это было связано со снижением активности СО под действием данных препаратов и, как следствие, уменьшением расходования GSH в результате положительного эффекта проводимой терапии (рис. 1).

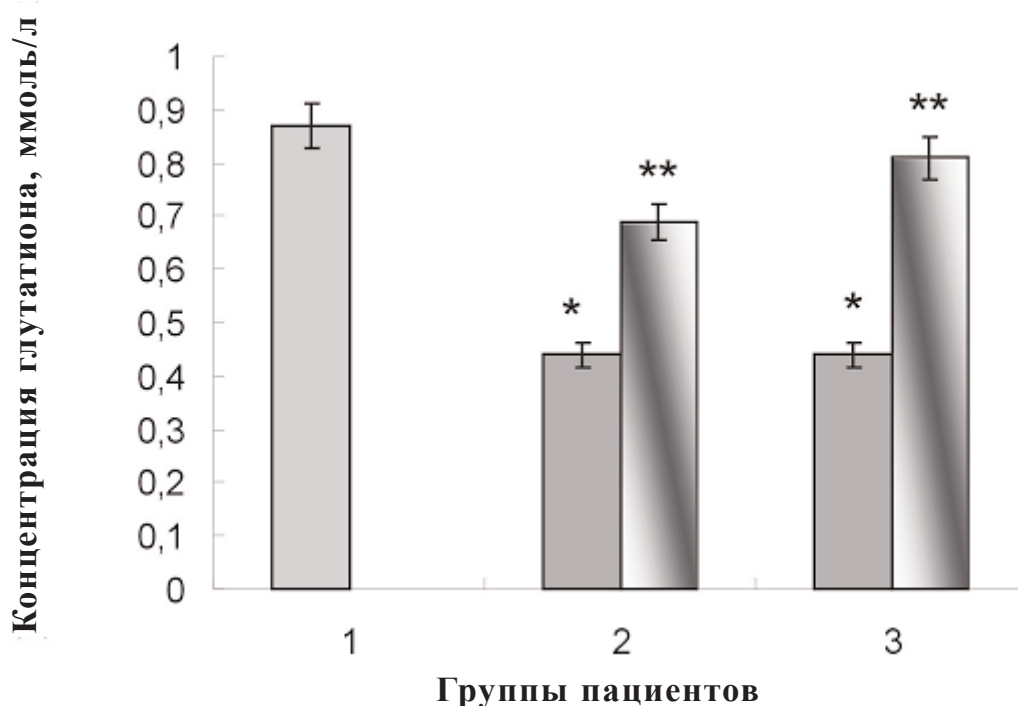


Рисунок 1.

Концентрация глутатиона в сыворотке крови в норме (1), у больных с лекарственным гепатитом после стандартного лечения (2) и при комбинированной терапии с эпифамином (3):

норма [□], до лечения [■], после лечения [▨].

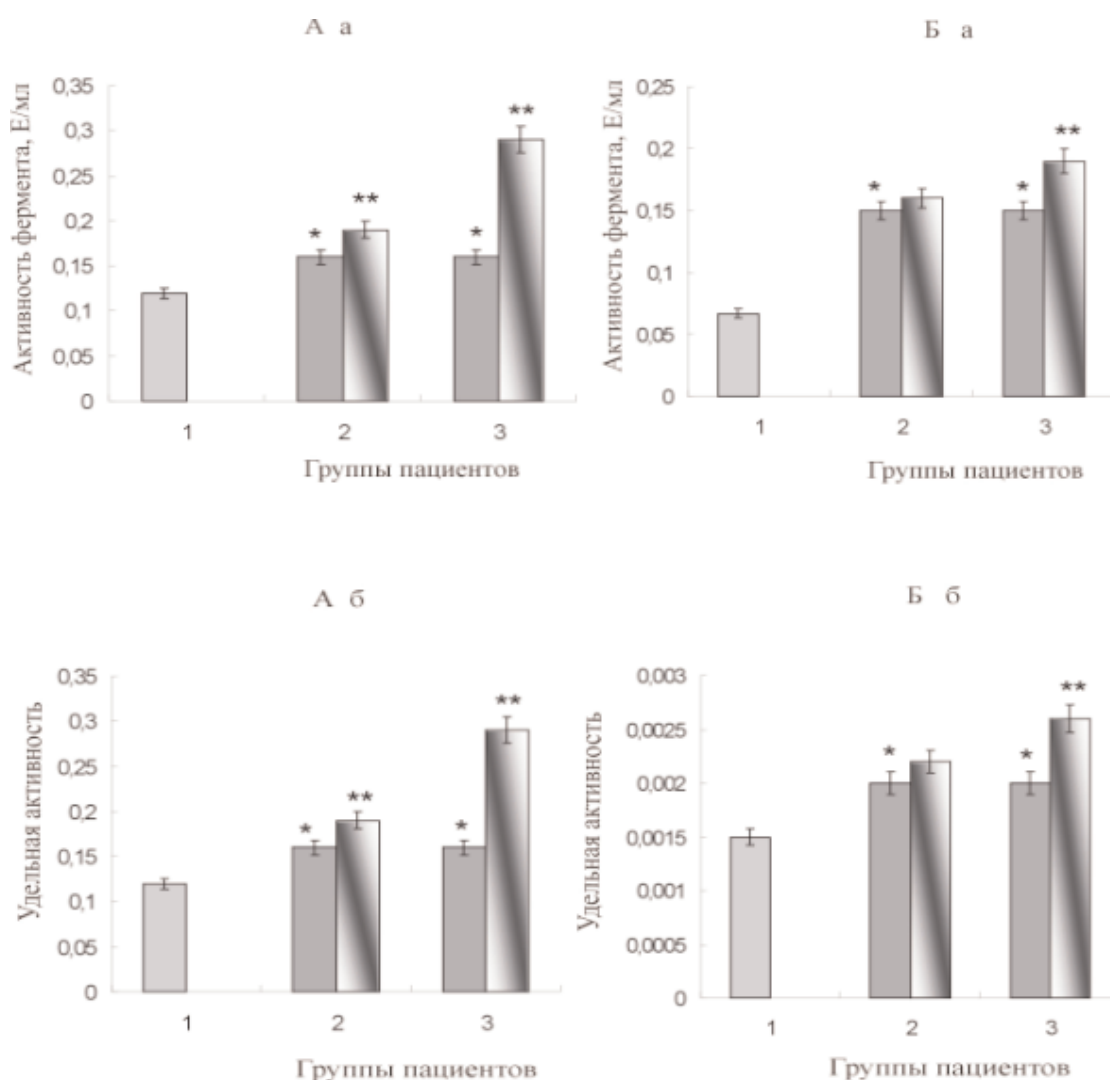
\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с результатами до лечения.

Во 2-ой группе больных при поступлении в стационар содержание GSH в сыворотке крови было в среднем в 2,11 раза ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с нормой. После комбинированной терапии гепатопротекторами и эпифамином наблюдалось увеличение концентрации GSH в сыворотке крови в среднем в 1,84 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с его уровнем перед лечением. Более значительное увеличение содержания GSH при приеме эпифамина, возможно объясняется синергичным действием мелатонина, секреция которого стимулируется под влиянием данного препарата. Имеются данные, указывающие на то, что данный гормон способствует восстановлению GSSG [10]. В связи с этим уместно отметить, что скорость NADPH-зависимого восстановления GSSG под действием ГР намного превосходит возможности синтеза GSH в тканях [11]. Существенное возрастание уровня GSH на фоне приема эпифамина, очевидно, могло оказывать позитивный эффект не только за счет протективного действия на гепатоциты [12], но и повышения антиоксидантного статуса организма больных туберкулёзом в целом.




Активности ГП и ГР, выраженные в Е на мл сыворотки, в 1-ой группе больных лекарственным гепатитом до назначения гепатопротекторов увеличивались в среднем в 1,33 ( $p < 0,05$ ) и 2,20 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с контрольным уровнем (рис. 2). Удельные активности ферментов повышались в 1,11 ( $p < 0,05$ ) и 1,31 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с нормой. После проведения стандартного лечения у больных с лекарственным поражением печени активности ГП и ГР, выраженные в Е на мл, увеличивались в среднем в 1,21 ( $p < 0,05$ ) и 1,11 раза соответственно по сравнению с результатами, полученными до назначения карсила и/или эссенциале. Удельные активности

ГП и ГР увеличивались на 18,5% ( $p<0,05$ ) и 5,3% соответственно. Очевидно, возрастание активности ГР/ГП системы было обусловлено положительным действием гепатопротекторов на антиоксидантный статус больных. Во 2-ой группе больных с лекарственным поражением печени до проведения терапии активности ГП и ГР, выраженные в Е на мл сыворотки, изменялись в тех же пределах, что и в 1-ой группе. После проведения терапии, включающей гепатопротекторы и эпифамин, активности ГП и ГР, выраженные в Е на мл, увеличивались в 1,74 ( $p<0,05$ ) и 1,31 ( $p<0,05$ ) раза соответственно, а удельные активности ферментов повышались в среднем в 1,31 ( $p<0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, лечение с эпифамином способствовало повышению активности ГР/ГП системы в большей степени, чем в 1-ой группе больных. Полученные данные согласуются с предположениями о том, что антиоксидантная активность мелатонина, уровень которого корректируется под влиянием эпифамина, может быть связана с его действием на антиоксидантные ферменты путем активации или стимуляции их синтеза [13].



**Рисунок 2.**

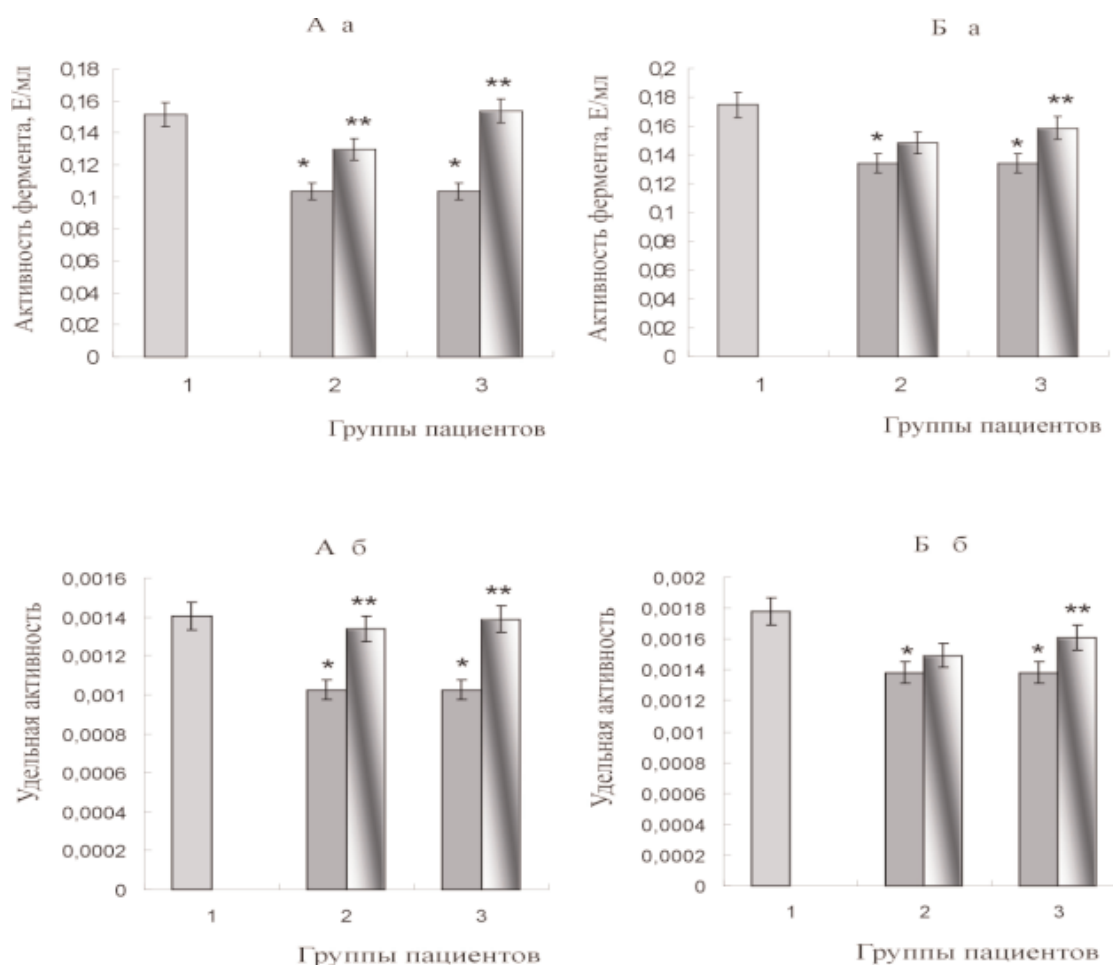
Активность глутатионпероксидазы (А) и глутатионредуктазы (Б), выраженная в виде Е на мл (а) и удельной активности (б) в сыворотке крови в норме (1), у больных с лекарственным гепатитом после стандартного лечения (2) и при комбинированной терапии с эпифамином (3):

норма , до лечения , после лечения .

\* -  $p<0,05$  по сравнению с контрольной группой.

\*\* -  $p<0,05$  по сравнению с результатами до лечения.





**Рисунок 3.**

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (А) и NADP -изоцитратдегидрогеназы (Б), выраженная в виде Е на мл (а) и удельной активности (б) в сыворотке крови в норме (1), у больных с лекарственным гепатитом после стандартного лечения (2) и при комбинированной терапии с эпифамином (3):

норма [ ], до лечения [■], после лечения [▨].

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с результатами до лечения.

При лекарственном поражении печени во всех группах больных наблюдалось уменьшение активности Г6ФДГ, выраженной в Е на мл сыворотки, в 1,46 ( $p < 0,05$ ) раза, при этом удельная активность Г6ФДГ снижалась в 1,37 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). Согласно имеющимся данным, при гепатите может происходить торможение глюконеогенеза и усиление гликолиза в печени, чем и объясняется накопление лактата и пирувата в крови [14]. По-видимому, в этих условиях снижение активности ключевого фермента ПФП – Г6ФДГ, может быть сопряжено с торможением интенсивности этого метаболического пути. Очевидно, это связано с перераспределением глюкозо-6-фосфата между гликолизом и ПФП. В сыворотке крови пациентов с лекарственным поражением печени активность NADP-ИЦДГ, выраженная в Е на мл, снижалась в 1,31 раза ( $p < 0,05$ ), удельная активность фермента – в 1,29 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольной группой. В связи с этим следует отметить, что имеются сведения о подавлении активности ферментов окислительного метаболизма, происходящем при интоксикациях, гипо- и авитаминозах, гипоксических состояниях, обусловленных различными

нарушениями кровообращения и тканевого дыхания [15]. Снижение активности NADPH-генерирующих ферментов, по-видимому, могло негативно сказываться на функционировании глутатионовой АОС, нуждающейся в поставке NADPH. В условиях развития оксидативного стресса в организме больных и связанной с этим необходимости мобилизации ГР/ГП системы недостаток генерирования NADPH вследствие торможения активностей Г6ФДГ и NADP-ИЦДГ мог являться фактором, лимитирующим стимуляцию ГР-активности. Это могло служить одной из основных причин снижения уровня GSH при лекарственном гепатите. Уменьшение содержания данного тиола, очевидно, было связано с его значительным расходом в процессах детоксикации АФК, с одной стороны, и недостаточном образованием в ходе ГР-реакции из-за недостатка NADPH, - с другой. После проведения стандартной терапии, включающей прием карсила и/или эссенциале, активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, возрастала на 25,2%, ( $p < 0,05$ ) а NADP-ИЦДГ – на 10,6% по сравнению с данными до лечения. Удельная активность также увеличивалась: Г6ФДГ – в 1,31 раза ( $p < 0,05$ ), NADP-ИЦДГ – в 1,08 раза. Возрастание активности ферментов, очевидно, определялось положительным воздействием проводимой терапии на метаболизм гепатоцитов. Это, по-видимому, могло способствовать, в определенной степени, и повышению активности ГР/ГП системы, наблюдающемуся после приема карсила и/или эссенциале. При проведении комбинированной терапии с эпифамином активность Г6ФДГ, выраженная в Е/мл сыворотки, повышалась в 1,48 ( $p < 0,05$ ), активность NADP-ИЦДГ – в 1,18 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до проведения лечения. Удельная активность ферментов также увеличивалась: Г6ФДГ – на 36,1% ( $p < 0,05$ ), NADP-ИЦДГ – на 16,4% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, корригирующее действие эпифамина в организме больных лекарственным гепатитом, по-видимому, способствовало снижению степени развития оксидативного стресса в организме и, как следствие, улучшению состояния окислительного метаболизма. Более существенное возрастание активностей NADPH-генерирующих ферментов в сыворотке крови при проведении комбинированной терапии с эпифамином по сравнению со стандартным лечением могло способствовать более значительному повышению активностей ГР и ГП, происходящему в этом случае, и как следствие улучшению эффективности функционирования глутатионовой системы крови.

Работа поддержана Грантом Президента РФ для молодых учёных, №МК-3133.2011.7 и финансированием по Программе "Развитие научного потенциала высшей школы", код проекта 2.1.1/9462.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ерохин В.В. (1998) Пробл. Туберкулеза, **3**, 61-66.
2. Salemi G, Gueli M.C., D'Amelio M. (2009) Neurological Sciences, **30**(4), 361-364.
3. Северин Е.С. (2003) Биохимия для медицинских вузов, ГЭОТАР-МЕД, М.
4. Медведева Л.В., Попова Т.Н., Артюхов В.Г., Матасова Л.В., Пинейру де Карвалью М.А.А. (2002) Биохимия, **67**(6), 838-849.
5. Анисимов В.Н. (2003) Молекулярные и физиологические механизмы старения, Наука, СПб.
6. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. (2003) Пептидные биорегуляторы и старение, Наука, СПб.
7. Бузлама В.С. (1997) Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты организма у животных, Воронеж.
8. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. (1990) Успехи биологической химии, **31**(2), 180-208

9. *Пентюк А.А.* (1987) Биохимия, **6**, 1009.
10. *Беленичев И.Ф., Губский Ю.И., Левицкий Е.Л.* (2002) Современ. пробл. токсикол., **3**, 24-31.
11. *Кураласов А.К.* (1975) Бюлл. эксперим. биологии и медицины, **7**, 82-84.
12. *Барабой В.А.* (2000) Украинский биохим. журн., **73**(3), 5-11.
13. *Reiter R.J.* (1993) Braz. J. Med. Biol. Res., **6**, 1141-1155.
14. *Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.* (2008) Биологическая химия, Медицина, М.
15. *Попова Т.Н., Пашков А.Н.* (2008) Свободнорадикальные процессы в биосистемах, ИПК Кириллица, Ст. Оскол.

Поступила: 07. 03. 2011.

**PECULIAR PROPERTIES OF GLUTATHIONE SYSTEM AND NADPH-GENERATED ENZYMES FUNCTIONING IN BLOOD OF PATIENTS WITH DRUG-INDUCED HEPATITIS UNDER COMBINED TREATMENT WITH EPIFAMIN**

***S.S. Popov<sup>1</sup>, K.K. Shulgin<sup>2</sup>, A.N. Pashkov<sup>1</sup>, V.I. Zoloyedov<sup>1</sup>, G.I. Shvedov<sup>1</sup>, T.I. Rakhmanova<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Burdenko Voronezh State Medical Academy, ul. Studentcheskaya, 10, Voronezh, 394000 Russia;  
tel.: 8(4732)2909725; e-mail popov-endo@mail.ru

<sup>2</sup>Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006 Russia

Activity of the glutathione antioxidant system has been studied in patients with drug-induced hepatitis treated with standart base therapy and combined with epifamin therapy. In blood serum of patients before treatment the decrease of reduced glutathione (GSH) level and the increase of glutathione peroxidase (GP) and glutathione reductase (GR) activities versus control were observed. Combined treatment with epifamin changed GSH level to the normal values. Treatment with epifamin was accompanied by pronounced increase in GP and GR activities compared with standart therapy. Activities of the NADPH-generated enzymes, glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP-isocitrate dehydrogenase, which decreased at this pathology, also demonstrated a more significant increase than standart treatment.

**Key words:** drug-induced hepatitis, glutathione antioxidant system, hepatoprotectors, epifamin.