

УДК 577.171.55

Воздействие мелаксена на активность каспаз и глутатионовой антиоксидантной системы при токсическом поражении печени

С. С. Попов^{1*}, К. К. Шульгин², А. Н. Пашков¹, А. А. Агарков²¹Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения РФ, 394036, Воронеж, ул. Студенческая, 10²Воронежский государственный университет Минобрнауки РФ, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1

*E-mail: biomed-popova@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.06.2013

После доработки 10.02.2014

РЕФЕРАТ Проведено сравнительное изучение активности каспаз-1 и -3, глутатионовой антиоксидантной системы и NADPH-генерирующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы, а также степени фрагментации ДНК в крови пациентов с хроническим алкогольным гепатитом при применении базового лечения и комбинированной терапии, включающей мелаксен. Установлено, что содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови больных, снижающееся при патологии, при приеме мелаксена возрастало в большей степени, чем у больных, получающих стандартное лечение. При проведении комбинированной терапии происходило более значительное изменение активностей каспаз-1 и -3, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, а также глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы в сторону контрольных значений. Фрагментация ДНК, выделенной из лейкоцитов крови, после проведения лечения уменьшалась, причем в большей степени после приема мелаксена на фоне базисной терапии. Вместе с тем включение мелаксена в терапию способствовало более значительному восстановлению активности маркерных ферментов повреждения гепатоцитов: γ -глутамилтранспептидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы. По-видимому, коррекция уровня мелатонина под действием мелаксена оказывала позитивное воздействие на свободнорадикальный гомеостаз организма больных, что приводило к более выраженному изменению исследуемых параметров по сравнению с базисным лечением.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, каспазы, мелаксен, фрагментация ДНК, хронический алкогольный гепатит.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АОС – антиоксидантная система; АФК – активные формы кислорода; GSH – восстановленный глутатион; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СО – свободнорадикальное окисление; ТНФА – тионитрофенильный анион; ХАГ – хронический алкогольный гепатит; GR/GP-система – глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная система; GP – глутатионпероксидаза; GR – глутатионредуктаза; γ -GTP – γ -глутамилтранспептидаза; GST – глутатион-S-трансфераза; G6PDG – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; NADP-IDG – NADP-изоцитратдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Токсическое поражение печени обычно развивается после 5–10 лет злоупотребления алкоголем и характеризуется появлением некроза с воспалительной реакцией. Характерной чертой повреждения печени у больных является преобладание стеатоза и других нарушений в периваскулярной (центролобулярной) зоне ацинуса. Механизм этой зональной селективности связан с относительным дефицитом кислоро-

да. Низкое напряжение кислорода увеличивает сдвиг редокс-потенциала, вызванный этанолом. Этанол повышает соотношение лактат/пируват и снижает уровень пирувата в большей степени в венозной крови печени, чем во всем органе. Гипоксия обуславливает повышение уровня NADH, нарушение функционирования ряда ферментов, ведет к образованию кислородных радикалов и активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1]. Известно, что индуцируемая

алкоголем цитохром-Р450-монооксигеназа (СУР2Е1) катализирует окисление этанола, что способствует росту толерантности к алкоголю, а также превращению его в высокотоксичные метаболиты, к которым относятся активные формы кислорода (АФК). Происходящее при этом истощение уровня восстановленного глутатиона (GSH) приводит к индукции окислительного стресса и повреждению клеток печени. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза при токсическом поражении печени может быть причиной активации процессов запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, для которого характерна активация каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз, известных как каспазы [2]. Считается, что активация каспаз является ключевым этапом в промежуточных и терминальных стадиях данного процесса [3]. Так, каспаза-3, относящаяся к семейству *ced-3*, непосредственно участвует в апоптозе и способна активировать другие каспазы, после чего процесс запрограммированной клеточной гибели становится необратимым. Нельзя исключить участия в апоптотической гибели клеток и каспазы-1 из ICE-семейства, которая участвует в процессинге цитокинов [3]. Так при хроническом панкреатите экспрессия каспазы-1 обнаружена в атрофических ацинарных клетках поджелудочной железы. Этот факт говорит об их гибели. Кроме того, каспаза-1 способствует активации каспазы-3 [3].

Известно, что GSH и связанные с его превращениями ферменты выполняют важную роль в защите организма как от АФК, так и от токсических веществ. GSH относится к наиболее важным антиоксидантным агентам, он способен реагировать со свободными радикалами, в частности, обезвреживать синглетный кислород и гидроксил-радикалы, ингибировать процессы ПОЛ [4]. Глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная (GR [КФ 1.6.4.2.]; GP [КФ 1.11.1.9.]) система обеспечивает детоксикацию H_2O_2 и гидропероксидов с помощью GSH за счет действия глутатионпероксидазы. Скорость образования GSH в сопряженной реакции, катализируемой глутатионредуктазой, зависит в основном от уровня NADPH [5]. Одним из основных поставщиков NADPH для GR/GP-системы служит пентозофосфатный путь, ключевой фермент которого – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G6PDG [КФ 1.1.1.49.]), катализирует превращение глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон [6]. Альтернативным источником NADPH может быть реакция, катализируемая NADP-изоцитратдегидрогеназой (NADP-IDG [КФ 1.1.1.42.]), в ходе которой происходит окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата [7]. В состав глутатионовой антиоксидантной системы (АОС) входят также глутатион-S-трансферазы (GST) – мультифункциональные

белки, использующие GSH для метаболизма многих гидрофобных веществ и обеспечивающие детоксикацию ксенобиотиков [8]. GST предохраняет ДНК, митохондрии и другие жизненно важные компоненты клетки от токсических веществ и таким образом значительно повышает устойчивость клетки и организма в целом [9].

К соединениям, обладающим антиоксидантными свойствами, относится мелатонин, гормон диффузной нейроэндокринной системы, играющий роль регулятора ряда физиологических функций. Мелатонин участвует в формировании суточных биоритмов, торможении некоторых функций гипофиза, регуляции иммунных реакций. По химической структуре мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) представляет собой производное серотонина – биогенного амина, который, в свою очередь, синтезируется из аминокислоты триптофана [10, 11]. Имеются данные, что мелатонин может выступать как перехватчик гидроксильного радикала, синглетного кислорода, оксида азота [12]. Кроме того, мелатонин усиливает экспрессию генов, ответственных за синтез Cu-Zn-зависимой супероксиддисмутазы [13]. Считают, что в первую очередь мелатонин защищает ДНК от действия свободных радикалов, хотя он способен оказывать значительное протективное действие и на другие макромолекулы. В связи с тем, что мелатонин обладает липофильными свойствами, он может беспрепятственно проникать во все органы и ткани, где и может проявляться его антиоксидантная активность [14]. Ранее нами были получены данные, что экзогенный мелатонин тормозит развитие оксидативного стресса у крыс с токсическим гепатитом [15], сахарным диабетом 2 типа [16], гипертиреозом [17]. В настоящей работе мы использовали при лечении пациентов с токсическим поражением печени, вызванным чрезмерным употреблением алкоголя, мелаксен – синтетическое лекарственное средство, имеющее в своем составе мелатонин.

Цель работы состояла в сравнительной оценке активностей каспаз-1 и -3, GR, GP, GST, NADPH-генерирующих ферментов: G6PDG и NADP-IDG, содержания GSH и степени фрагментации ДНК в крови пациентов с хроническим алкогольным гепатитом (ХАГ) в стадии обострения при проведении базисного лечения и комбинированной терапии, включающей мелаксен.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В клиническое исследование было включено 52 человека с токсическим поражением печени, вызванным хроническим употреблением алкоголя. Все пациенты были мужского пола, в возрасте 22–69 лет, средний возраст – 41.4 ± 7.2 года. Все были больны

синдромом алкогольной зависимости. Средняя продолжительность заболевания составляла 2.2 ± 0.5 месяца. Диагноз алкогольного гепатита был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. Из сопутствующих заболеваний чаще всего регистрировались следующие: хронический гастрит – у 32 больных (50%), гипертоническая болезнь – у 24 (30.5%).

Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц с нормальными показателями общего, биохимического анализов крови.

Критериями исключения из исследования были вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, сахарный диабет, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения.

Больные были разделены на две группы. Первая группа (28 человек) получала базисное лечение: полный отказ от приема алкоголя, стол № 5, раствор NaCl 0.9% и раствор витамина B1 (10 мл) внутривенно, раствор рибоксина (10 мл) внутривенно, раствор витамина B6 (4 мл) внутримышечно, раствор реланиума (4 мл) внутривенно. Гепатопротекторы: карсил (эквивалент силимарина 35 мг) по две таблетки 3 раза в день во время еды, эссливер форте (эссенциальные фосфолипиды 300 мг) по две таблетки 3 раза в день в течение 10 дней. Вторая группа (24 человека) дополнительно к базисной терапии получала мелаксен (Unifarm, Inc., США) по одной таблетке, содержащей 3 мг мелатонина, 1 раз в день за 30–40 мин перед сном в течение 10 дней.

Активность каспаз-1 и -3 определяли с помощью набора реактивов Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric фирмы Sigma. В среду измерения добавляли коктейль ингибиторов протеаз (0.08 мМ апротинин, 1.5 мМ пепстатин А, 2 мМ лейпептин) в соотношении 100 : 1 (все реактивы фирмы Sigma, США). Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил-Тур-Val-Ala-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-YVAD-pNA) (в случае каспазы-1) и ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-DEVD-pNA) (в случае каспазы-3) с образованием остатка *n*-нитроанилида, имеющего максимум поглощения при 405 нм (молярный коэффициент поглощения = $10.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Активность каспаз выражали в пмоль продукта, образующегося за 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

ДНК выделяли из лейкоцитов крови фенольно-хлороформным методом [18]. Фрагментацию ДНК выявляли с помощью электрофореза в агарозном геле в ТАЕ (Трис-ацетат-EDTA)-буфере, содержащем бромистый этидий [19]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор MassRuler, вклю-

чающий маркеры от 1500 до 10000 п.н., производства Fermentas, Литва.

Активность ферментов глутатионовой АОС и NADPH-генерирующих ферментов определяли спектрофотометрически при 340 нм на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония). За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C. Активность пересчитывали на 1 мл сыворотки крови. Активность GR определяли в среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.4), 1 мМ EDTA, 0.16 мМ NADPH и 0.8 мМ окисленного глутатиона. Активность GP определяли в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.4), содержащем 1 мМ EDTA, 0.12 мМ NADPH, 0.85 мМ GSH, 0.37 мМ H₂O₂, 1 ед./мл GR. Активность GST определяли с помощью метода, основанного на оценке скорости образования глутатион-S-2,4-динитробензола в реакции GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Активности GST измеряли в среде следующего состава: 0.1 М калий-фосфатный буфер (pH 7.4), 1 мМ EDTA, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH. Активность G6PDG определяли спектрофотометрически в среде следующего состава (мМ): 0.05 Трис-НСl-буфер (pH 7.8), 3.2 глюкозо-6-фосфат, 0.25 NADP. Активность NADP-IDG определяли в 50 мМ Трис-НСl-буфере (pH 7.8), содержащем 1.5 мМ изоцитрат, 0.25 мМ NADP, 1.5 мМ MnCl₂. Концентрацию GSH определяли с помощью реакции с 5,5-дигиобис(2-нитробензойной) кислотой, в результате которой образуется тионитрофенильный анион (ТНФА) с максимумом поглощения при 412 нм [20]. Общий белок определяли унифицированным биуретовым методом [21]. Активность γ -глутамилтранспептидазы (γ -GTP) оценивали по скорости реакции переноса глутамилового остатка с γ -L-(+)-глутамил-4-нитроанилида на глицилглицин (Биотест, PLIVA – Lachema Diagnostika). Активности маркерных ферментов поражения гепатоцитов (ALT, AST) определяли наряду со стандартными параметрами биохимического анализа крови на биохимическом анализаторе Klima 15MC (Испания).

В ходе работы использовали наборы реактивов Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric, изоцитрат, препарат GP, Трис-ацетат-EDTA, бромистый этидий (Sigma, США), NADP, NADPH, Трис-НСl-буфер, EDTA (Reanal, Венгрия), глутатион окисленный и восстановленный, глюкозо-6-фосфат (ICN, США), остальные реактивы отечественного производства марки «х.ч.» или «ч.д.а.».

Статистическая обработка материала включала использование стандартных методов вариационной статистики (расчет средних значений (*M*), ошибка средних значений (*m*), *t*-критерия Стьюдента) и не-

Влияние базисного лечения и комбинированной терапии с мелаксеном на показатели функций печени у больных хроническим алкогольным гепатитом в стадии обострения

Группа		Показатели функций печени		
		γ -GTP, мккат/л	ALT, нмоль/(с·л)	AST, нмоль/(с·л)
Контрольная группа, норма (n = 65)		0.88 ± 0.04	95.9 ± 13.7	52.5 ± 7.3
Группа 1, базисное лечение (n = 28)	до лечения	3.34 ± 0.14*	241.6 ± 19.3*	151.6 ± 10.8*
	после лечения	1.63 ± 0.06**	161.8 ± 16.2**	108.9 ± 11.1**
Группа 2, комбинированное лечение с мелаксеном (n = 24)	до лечения	3.33 ± 0.12*	256.1 ± 14.6*	152.2 ± 10.4*
	после лечения	1.19 ± 0.04**	145.1 ± 11.3**	96.3 ± 13.7**

Примечание. Отличие параметра от соответствующего контрольного значения (*) или от значения в группе больных после лечения (**) статистически значимо при $p < 0.05$. Референсные величины ферментативных активностей у мужчин: γ -GTP – (0.25–1.77) мккат/л; ALT – норма (28–189) нмоль/(с·л); AST – (28–127) нмоль/(с·л).

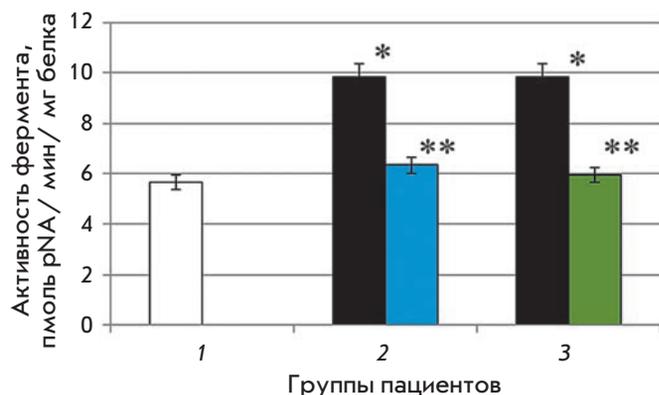


Рис. 1. Активность каспазы-1 в сыворотке крови в норме (1), у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

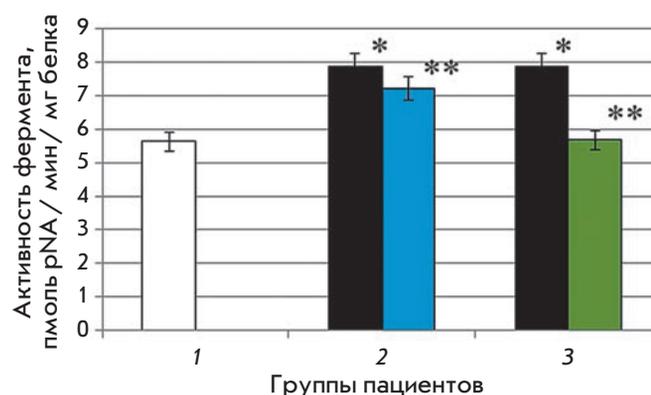


Рис. 2. Активность каспазы-3 в сыворотке крови в норме (1), у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

параметрического теста Вилкоксона с применением прикладных программ STATISTICA 6.0. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0.05$.

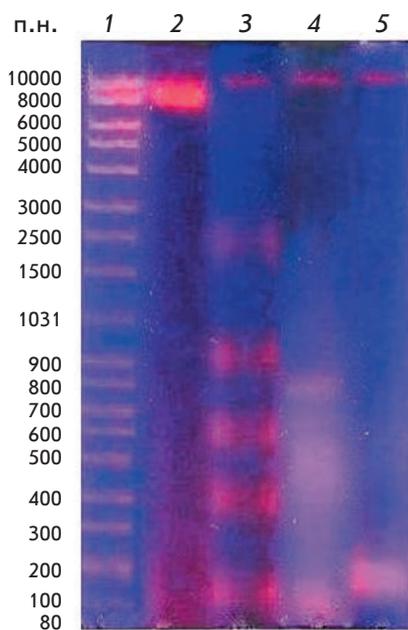
РЕЗУЛЬТАТЫ

У больных первой и второй групп до лечения активность γ -GTP была повышена в среднем в 3.8 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой (таблица). Активность ALT и AST в обеих группах также возрастала в среднем в 2.5 и 2.9 раза ($p < 0.05$) соответственно. После стандартного лечения происходило уменьшение активности γ -GTP в 2.1 раза

($p < 0.05$), активности ALT и AST снижались в 1.5 и 1.4 раза соответственно. Во второй группе пациентов, получавших комбинированную терапию с мелаксеном, активность ферментов, маркеров повреждения гепатоцитов изменялась более существенно. Так, активность γ -GTP снижалась в 2.8 ($p < 0.05$), ALT – в 1.8 ($p < 0.05$), AST – в 1.6 раза ($p < 0.05$).

В ходе работы было установлено, что развитие ХАГ у больных сопровождалось возрастанием активности каспазы-1 и каспазы-3 в 1.7 и 1.4 раза ($p < 0.05$) соответственно (рис. 1, 2), что свидетельствовало об интенсификации процессов, сопряженных с разви-

Рис. 3. Электрофореграмма ДНК из лейкоцитов крови пациентов: контрольная группа (2), больные ХАГ до лечения (3), после стандартного лечения (4), после комбинированной терапии с мелаксеном (5). На треке 1 – маркерная ДНК



тием апоптоза. Применение базисной терапии приводило к изменению активности каспаз в сторону нормы. Так, активность каспазы-1 снижалась в 1.6 раза, каспазы-3 – в 1.1 раза ($p < 0.05$) по сравнению с результатами, полученными до лечения (рис. 1, 2). В группе пациентов, кроме традиционного лечения, получавших мелаксен, отмечено более выраженное снижение активностей как каспазы-1 (в 1.7 раза), так и каспазы-3 (в 1.4 раза) ($p < 0.05$) (рис. 1, 2), что, по-видимому, было связано с коррекцией уровня мелатонина под действием данного препарата.

Данные об изменении активности каспаз при ХАГ согласуются с результатами оценки степени фрагментации ДНК лейкоцитов крови больных. Согласно данным электрофоретического анализа, в образцах крови доноров контрольной группы ДНК была представлена одним фрагментом в начале трека (рис. 3). ДНК, выделенная из лейкоцитов больных ХАГ, была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб. После проведения стандартного лечения степень фрагментации ДНК снижалась. В образцах крови больных, принимавших мелаксен на фоне базисной терапии, фрагментация ДНК в большинстве проб практически не визуализировалась.

В первой группе больных ХАГ до назначения гепатопротекторов содержание GSH в сыворотке крови уменьшалось в среднем в 2.1 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольным уровнем (рис. 4). Известно, что алкоголь индуцирует развитие окислительного стресса и повреждает клетки печени [22]. Очевидно, происходящая при этом активация процессов свободнорадикального окисления приводит к снижению

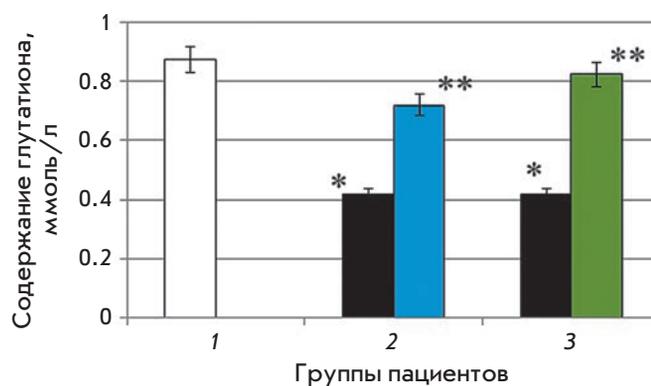


Рис. 4. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1), у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

уровня GSH. После проведения базисного лечения наблюдалось увеличение концентрации GSH в 1.7 раза ($p < 0.05$) по сравнению со значениями, полученными до назначения лечения.

Во второй группе больных уровень GSH также был в 2.1 раза ($p < 0.05$) ниже, чем в контрольной группе. После проведения комбинированной терапии с мелаксеном содержание данного метаболита увеличивалось и становилось таким же, как в контроле (в 2.1 раза) (рис. 4).

В ходе проведенных нами исследований установлено, что активности GP и GR в сыворотке крови больных ХАГ первой группы до назначения базисной терапии снижались в среднем в 1.6 ($p < 0.05$) и 1.2 ($p < 0.05$) раза соответственно по сравнению с контрольным уровнем (рис. 5, 6). По-видимому, снижение активности GR при ХАГ может вносить определенный вклад в уменьшение содержания GSH. После стандартного лечения активности GP и GR возрастали в среднем в 1.8 ($p < 0.05$) и 2.0 ($p < 0.05$) раза соответственно по сравнению со значениями, определенными до назначения базисной терапии.

Во второй группе больных ХАГ до проведения терапии активности GP и GR уменьшались в тех же пределах, что и в первой группе. После комбинированной терапии, включающей прием мелаксена, активности GP и GR повышались в 2.9 и 2.8 раза соответственно. Таким образом, повышение активности GP/GR-системы у больных данной группы было наибольшим (рис. 5, 6).

До назначения гепатопротекторов активность GST в первой группе больных ХАГ уменьшалась в 1.6 раза

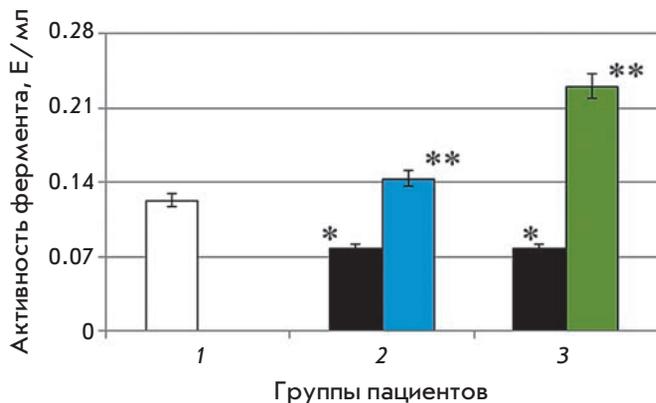


Рис. 5. Активность глутатионпероксидазы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

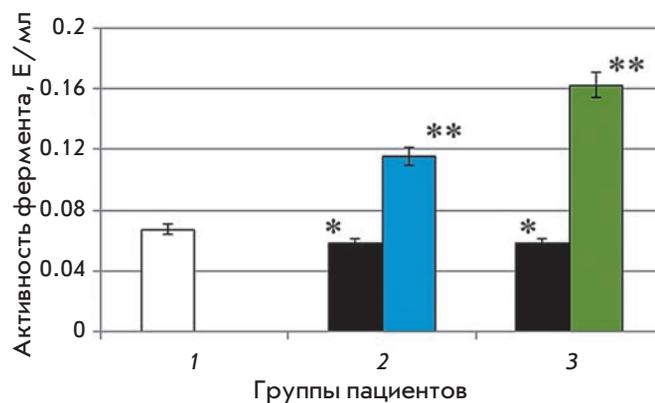


Рис. 6. Активность глутатионредуктазы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

($p < 0.05$) по сравнению с контрольным уровнем. Очевидно, что снижение активности GST определялось значительными затратами восстановленного глутатиона в ответ на избыточное образование АФК при развитии окислительного стресса, индуцированного ХАГ. Это предположение согласуется с данными о повышении активности GST на фоне возрастания уровня GSH после проведения лечения. Так, после базисной терапии, включающей прием гепатопротекторов, активность фермента увеличивалась в 1.5 раза ($p < 0.05$).

Во второй группе больных ХАГ до проведения терапии активность GST изменялась в тех же пределах, что и в первой группе. После комбинированного лечения, включающего прием гепатопротекторов и мелаксена, активность GST увеличивалась в 1.8 раза ($p < 0.05$) по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, прием мелаксена способствовал повышению активности GST в большей степени, чем у больных первой группы (рис. 7).

Выявлены также изменения активностей NADPH-генерирующих ферментов при ХАГ и после проведения лечения. Установлено, что в сыворотке крови всех групп больных ХАГ активность NADP-IDG уменьшилась в среднем в 1.7 раза по сравнению с контрольной группой. После базисной терапии активность NADP-IDG возрастала в среднем в 1.4 раза по сравнению с величинами, определенными до лечения. В случае комбинированной терапии с мелаксеном повышение ферментативной активности было более существенным и в 1.8 раза превысило активность до лечения (рис. 8).

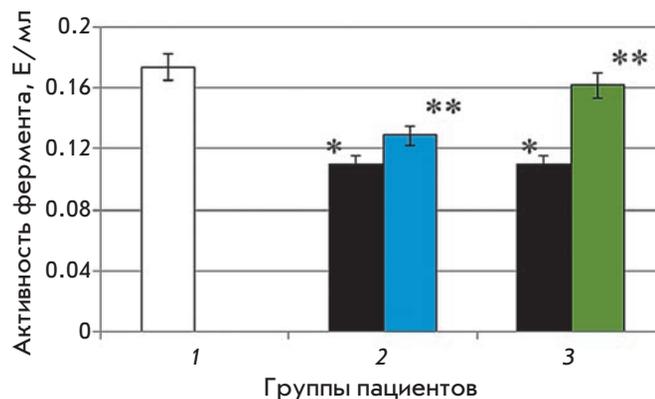


Рис. 7. Активность глутатионтрансферазы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

Активность G6PDG при ХАГ снижалась в среднем в 1.4 раза ($p < 0.05$). После проведения стандартной терапии активность возрастала в 1.4 раза по сравнению с данными до лечения (рис. 9). Во второй группе пациентов с ХАГ в стадии обострения проведение комбинированной терапии с мелаксеном привело к повышению активности G6PDG в среднем в 1.7 раза (рис. 9).

По-видимому, снижение активности NADPH-генерирующих ферментов могло быть одной из причин снижения активности GR при ХАГ.

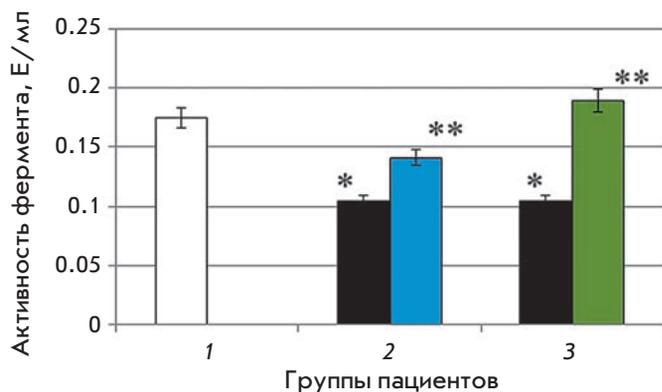


Рис. 8. Активность NADP-изоцитратдегидрогеназы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

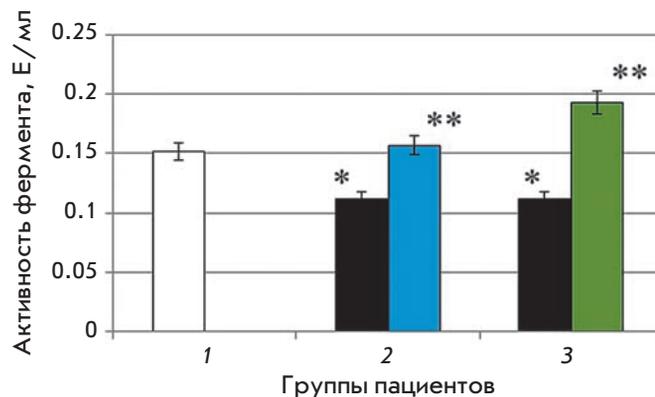


Рис. 9. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (*) и при патологии до лечения (**) статистически значимо при $p \leq 0.05$

Следует отметить, что в ряде работ, выполненных на животных моделях, уровень активности антиоксидантных ферментов, включая глутатионовую АОС, NADPH-генерирующие ферменты, а также параметры, отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов (показатели биохемилюминесценции, содержание ДК), коррелируют с этими показателями в печени, а также со статусом поражения печени, оцениваемым по активности маркерных ферментов (ALT, AST) [23–27].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биохимические показатели функций печени (таблица) подтверждают, что при ХАГ нарушается метаболизм гепатоцитов и возникают их повреждения, что сопровождается цитолизом клеток и выходом в кровь ALT, AST и γ -GTP. Снижение исследуемых параметров подтверждает гепатопротекторное действие базисного лечения. Более выраженные изменения показателей у пациентов второй группы свидетельствуют о том, что включение в базисную терапию мелаксена, корректирующего уровень мелатонина в организме, усиливало гепатопротекторное действие, по-видимому, за счет антиоксидантного и иммуностимулирующего эффекта данного гормона.

Повышение активности каспаз в сыворотке крови больных ХАГ (рис. 1, 2) было, по-видимому, сопряжено с чрезмерной генерацией АФК при данной патологии. Так, развитие апоптоза гепатоцитов наблюдали на экспериментальных моделях алко-

гическими заболеваниями печени [28]. Кроме того, при экспериментальном гепатите, индуцированном конканавалином-А, повышалась активность каспазы-3, что было связано, в частности, с инфильтрирующими печень лимфоцитами, которые подвергаются активационно-индуцированному апоптозу [29]. Снижение активности обеих каспаз после базисной терапии, по-видимому, было связано с тем, что проводимое лечение способствовало снижению скорости генерации АФК и торможению апоптотических процессов. Более значительное изменение активности каспаз-1 и -3 в группе пациентов, находившихся на комбинированной терапии с мелаксеном, было, вероятно, связано с коррекцией уровня мелатонина при применении данного препарата. Известно, что мелатонин снижает уровень окислительного повреждения липидов, ДНК и митохондрий [30], увеличивает экспрессию антиапоптотических генов группы Bcl-2, защищая липиды от перекисного окисления, а клетки от последующего апоптоза [31].

Результаты определения фрагментации ДНК лейкоцитов крови больных ХАГ соответствуют данным по изменению активности каспаз при ХАГ, проведении стандартного лечения и приеме мелаксена на фоне базисной терапии. ДНК, выделенная из образцов крови больных ХАГ, была значительно фрагментирована. По мнению ряда исследователей, подобные фрагменты возникают под действием апоптоспецифичных нуклеаз в терминальной фазе апоптоза [32]. В ходе деградации ДНК сначала обра-

зуются крупные фрагменты, длиной примерно 300 т.п.н., несколько позже – 30–50 т.п.н. На следующем этапе в ходе межнуклеосомной деградации ДНК под действием кальцийчувствительной эндонуклеазы CAD (caspase-activated DNase) формируются фрагменты длиной 180 п.н. или кратные им. Именно эти фрагменты электрофоретически выявляются в виде «апоптотной лестницы». Как известно, подобная фрагментация ДНК может быть связана с протеолитическим расщеплением под действием каспаз и ДНК-топоизомеразы II, участвующей в формировании супервитков ДНК. Кроме того, субстратом каспаз при апоптозе является гистон H1, защищающий ДНК от действия эндонуклеаз на межнуклеосомном уровне [33]. Электрофоретический анализ ДНК, выделенной из крови больных ХАГ, выявил полосу в области молекулярных масс, соответствующую деградированной ДНК, характерной для процесса некроза [34]. После проведения традиционной терапии наблюдалось снижение степени фрагментации ДНК, свидетельствующее о положительном эффекте лечения. Включение мелаксена в базисную терапию приводило к значительному уменьшению степени фрагментации ДНК, что может быть свидетельством антиапоптотического действия данного препарата.

Падение уровня GSH в сыворотке крови больных ХАГ более чем в 2 раза относительно контроля (рис. 4) обусловлено, по всей видимости, возникновением дисбаланса между скоростью свободнорадикальных процессов и активностью антиоксидантной системы. Как известно, восстановленному глутатиону принадлежит ключевая роль в системе низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов, он эффективно инактивирует АФК и является наиболее чувствительным компонентом в общей схеме неспецифической резистентности организма в условиях окислительного стресса [35]. Вместе с тем глутатион участвует в превращении таких антиоксидантов, как аскорбиновая кислота, α -токоферол, тиоктовая кислота, убихинон, в сохранении оптимального структурно-функционального состояния биомембран, регуляции синтеза белков теплового шока [36]. Как отмечено выше, микросомальные ферменты монооксигеназной системы, в частности СУР2Е1, не только окисляют алкоголь, но обладают способностью превращать ксенобиотики в высокотоксичные метаболиты. Происходящая при этом активация процессов свободнорадикального окисления приводит, по-видимому, к истощению уровня GSH, что свидетельствует о снижении способности печени обезвреживать токсические соединения.

После проведения базисной терапии концентрация GSH в 1.7 раза превысила концентрацию до лечения, что, по-видимому, связано со снижением интенсив-

ности процессов СО и, как следствие, с уменьшением расходования этого метаболита в результате положительного эффекта терапии. Комбинированное лечение с мелаксеном способствовало восстановлению концентрации глутатиона до нормального уровня, что, очевидно, сопряжено с мощным антиоксидантным эффектом мелатонина и его позитивным действием на глутатионовую систему (рис. 4).

Исследование функционирования ферментов глутатионовой антиоксидантной системы показало, что при хронической алкогольной интоксикации снижается активность селеновой GP и GR в сыворотке крови, что также свидетельствует о снижении антиоксидантного статуса больных. Падение активности GP обусловлено, вероятно, снижением содержания селена при хронической алкогольной интоксикации. Как известно, активность селеносодержащей GP напрямую зависит от уровня селена в организме, при недостаточности которого происходит торможение ферментативной активности. Снижение активности фермента при дефиците селена связано с уменьшением количества мРНК GP [37]. Селен необходим для синтеза селеноцистеина, входящего в активный центр фермента и играющего важную роль в катализе [38]. Функционирование GP тесно сопряжено с работой GR. Поскольку при реакции, катализируемой GR, образуется быстро мобилизуемый источник GSH, то, вероятно, снижение активности GR может вносить существенный вклад в уменьшение содержания данного тиола при ХАГ.

По-видимому, возрастание активности GP/GR-системы после стандартного лечения больных ХАГ было сопряжено с положительным действием базисной терапии на антиоксидантный статус больных. После проведения комбинированной терапии, включающей прием мелаксена, активности GP и GR повышались более значительно (рис. 5, 6). По-видимому, антиоксидантная активность мелатонина может быть связана с активацией антиоксидантных ферментов и/или стимуляцией их синтеза [39].

Выявленное существенное снижение активности GST в сыворотке крови больных ХАГ по сравнению с нормой было, очевидно, связано со значительными затратами восстановленного глутатиона в ответ на избыточное образование АФК при развитии окислительного стресса, индуцированного патологическим состоянием. Как известно, GST использует восстановленный глутатион для конъюгации с гидрофобными веществами, их восстановления или изомеризации. GSH является необходимым компонентом реакций обезвреживания токсических продуктов перекисного окисления липидов, восстановления гидроперекисей липидов, биотрансформации ксенобиотиков, катализируемых мультифункциональной

GST [14]. В этой связи падение уровня GSH при ХАГ, по-видимому, могло приводить к снижению активности GST. Это предположение согласуется с данными о повышении активности GST на фоне роста уровня GSH после лечения. Вероятно, возрастание активности GST было сопряжено с положительным действием проводимого лечения на антиоксидантный статус больных и снижением расходования GSH, причем прием мелаксена способствовал повышению активности GST в большей степени, чем в первой группе больных (рис. 7).

Обнаружено, что при ХАГ изменяется также активность NADPH-генерирующих ферментов: NADP-IDG и G6PDG. Активность NADP-IDG снижалась в большей степени, чем G6PDG. Менее значительное уменьшение активности G6PDG связано, возможно, с ролью пентозофосфатного пути как поставщика восстановительных эквивалентов для биосинтеза жирных кислот, который активируется в клетках печени в условиях ее жирового перерождения при хронической алкогольной интоксикации. Известно, что именно G6PDG как ключевой фермент пентозофосфатного пути ответственна за основную долю NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот [40]. Снижение активности NADPH-генерирующих ферментов могло быть следствием негативного воздействия АФК, генерация которых чрезмерна в патологическом состоянии. Имеются данные об ингибировании активности некоторых ферментов гликолиза при хронической алкогольной интоксикации, что сопровождается увеличением в печени уровня глюкозы и лактата [41]. По-видимому, в этих условиях может происходить и снижение активности ферментов, функционирование которых сопряжено с превращениями трикарбоновых кислот, и, в частности NADP-IDG (рис. 8).

Более значительное возрастание активности NADP-IDG и G6PDG в крови больных при приеме препарата, способного осуществлять коррекцию уровня мелатонина, по сравнению с пациентами, получавшими стандартное лечение, может быть обусловлено индукцией синтеза ферментов под действием данного гормона. Известно, что мелатонин может повышать экспрессию некоторых ферментов антиоксидантной защиты организма [42].

Следует отметить, что снижение активности NADPH-генерирующих ферментов могло быть одной

из причин снижения активности GR при ХАГ. При этом существенное возрастание активности GR после базисного лечения и еще более значительный подъем активности фермента при приеме мелаксена были сопряжены с увеличением активностей G6PDG и NADP-IDG в данных условиях. Наблюдаемое при этом превышение контрольного уровня активностей GR и NADPH-генерирующих ферментов могло быть связано с мощным эффектом антиоксидантной терапии, способствующей мобилизации АОС в условиях окислительного стресса, приобретающего системный характер при хронической алкогольной интоксикации. Вероятно, мелатонин, коррекция содержания которого происходит под влиянием мелаксена, может выступать в роли адаптогена, регулирующего активность глутатионовой системы, а также ферментов, способных генерировать NADPH, в соответствии с воздействием патогенных факторов на организм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, включение мелаксена в терапию ХАГ усиливает гепатопротекторное, мембраностабилизирующее действие, что подтверждается результатами определения показателей, характеризующих функционирование печени, в частности аминотрансфераз и γ -ГТФ. По-видимому, это связано с антиоксидантными свойствами мелатонина, входящего в состав мелаксена. Комплексное лечение с использованием мелаксена приводило к более существенному снижению развития апоптотических процессов у больных ХАГ, что выражалось в более значительном снижении активности каспаз-1 и -3, а также степени фрагментации ДНК, чем у больных, получавших традиционную терапию. Коррекция уровня мелатонина в организме приводит к более существенному восстановлению содержания GSH, активности ферментов глутатионового звена АОС: GR, GP, GST, а также NADPH-генерирующих ферментов G6PDG и NADP-IDG по сравнению с этими показателями при проведении базисного лечения. Полученные результаты свидетельствуют об эффективном протективном действии мелаксена при токсическом поражении печени, благоприятно влияющем на состояние свободнорадикального гомеостаза организма и обеспечивающем значительное снижение степени выраженности цитолитического повреждения гепатоцитов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boyer J.L., Blum H.E., Maier K.P., Sauerbruch T., Stalder G.A. Liver cirrhosis and its development. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. and Falk Foundation, 2001. 357 p.
2. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. // Межвузовский сборник. Биохимия и биофизика микроорганизмов. Горький, 1983. С. 179–183.
3. Суханова Г.А., Акбашева О.Е. Апоптоз. Томск: Изд-во ТПУ, 2009. 172 с.
4. Зенков Н.К., Лапкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М.: Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.
5. Su F., Hu X., Jia W., Gong C., Song E., Hama P. // J. Surg. Res. 2003. V. 113. № 1. P. 102–108.

6. Gupte R.S., Ata H., Rawat D., Abe M., Taylor M.S., Ochi R., Gupte S.A. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 4. P. 543–558.
7. Ufer C., Wang C.C. // *Front. Mol. Neurosci.* 2011. V. 4. A. 12. Doi: 10.3389/fnmol.2011.00012.
8. Wang Z., Jin L., Węgrzyn G., Węgrzyn A. // *BMC Biochem.* 2009. V. 10. A. 6. Doi: 10.1186/1471-2091-10-6.
9. Sun H.-D., Ru Y.-W., Zhang D.-J., Yin S.-Y., Yin L., Xie Y.-Y., Guan Y.-F., Liu S.-Q. // *World J. Gastroenterol.* 2012. V. 18. № 26. P. 3435–3442.
10. Анисимов В.Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике. СПб.: Система, 2007. 40 с.
11. Reiter R.J., Tan D.X., Leon J., Kilic U., Kilic E. // *Exp. Biol. Med.* 2005. V. 230. P. 104–117.
12. Барбой В.А. // *Украинский биохим. журн.* 2000. Т. 73. № 3. С. 5–11.
13. Анисимов В.Н., Кветной И.М., Комаров Ф.И., Малиновская Н.К., Рапопорт С.И. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта. М.: Советский спорт, 2000. 184 с.
14. Попова Т.Н., Пашков А.Н., Семенихина А.В., Попов С.С., Рахманова Т.И. Свободнорадикальные процессы в биосистемах. М.: Кириллица, 2008. 192 с.
15. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. // *Эксп. клин. фармакол.* 2007. Т. 70. № 1. С. 48–51.
16. Агарков А.А., Попова Т.Н., Матасова Л.В. // *Биомед. химия.* 2013. Т. 59. № 4. С. 434–442.
17. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Рахманова Т.И. // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2007. Т. 144. № 8. С. 170–173.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 478 с.
19. Калинина Т.С., Баннова А.В., Дыгало Н.Н. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2002. Т. 134. С. 641–644.
20. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. Т. 2. 792 с.
21. Матасова Л.В., Рахманова Т.И., Сафонова О.А., Попова Т.Н. Лабораторные работы и задачи по биохимии. Воронеж: ВГУ, 2006. 79 с.
22. Ивашкин В.Т., Маевская М.В. Алкогольно-вирусные заболевания печени. М.: Литтерра, 2007. 160 с.
23. Агарков А.А., Попова Т.Н., Матасова Л.В. // *Химико-фармацевтический журн.* 2011. Т. 45. № 7. С. 7–10.
24. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Саиди Л. // *Биомед. химия.* 2010. Т. 56. № 4. С. 490–498.
25. Попова Т.Н., Панченко Л.Ф., Семенихина А.В., Рахманова Т.И., Аллекрад Х. // *Вопросы биол. мед. фарм. химии.* 2010. № 2. С. 66–69.
26. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. // *Биомед. химия.* 2008. Т. 54. № 1. С. 114–121.
27. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Рахманова Т.И., Семенихина А.В. // *Проблемы эндокринологии.* 2008. Т. 54. № 3. С. 47–50.
28. Natori S., Rust C., Stadheim L.M., Srinivasan A., Burgart L.J., Gores G.J. // *J. Hepatol.* 2001. V. 34. № 2. P. 248–253.
29. Biburger M., Tiegs G. // *J. Immun.* 2005. V. 175. P. 1540–1550.
30. Watanabe K., Wakatsuki A., Shinohara K., Ikenoue N., Yokota K., Fukaya T. // *J. Pineal Res.* 2004. V. 37. № 4. P. 276–280.
31. Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Etem E., Nedzvetsky V.S. // *J. Pineal Res.* 2007. V. 43. № 3. P. 225–231.
32. Muller K. // *Eur. J. Pharmacol.* 1992. V. 226. № 6. P. 209–214.
33. Earnshaw W.C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995. V. 7. № 3. P. 337–343.
34. Ярилин А.А. // *Патол. физиол. эксп. терап.* 1998. Т. 2. С. 38–48.
35. Exner R., Wessner B., Manhart N., Roth E. // *Wien Klin Wochenschr.* 2000. V. 112. № 14. P. 610–616.
36. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. // *Endocrine Rev.* 2002. V. 23. № 5. P. 599–622.
37. Sunde R.A., Evenson J.K., Thompson K.M., Sachdev S.W. // *J. Nutr.* 2005. V. 135. № 9. P. 2144–2150.
38. Зубкова Л.Л. // *Казанская наука.* 2010. № 3. С. 241–244.
39. Beni S.M., Kohen R., Reiter R.J., Tan D. X., Shohami E. // *FASEB J.* 2004. V. 18. P. 149–151.
40. Stover N.A., Dixon T.A., Cavalcanti A.R.O. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. e22269.
41. Лелевич С.В. // *Биомед. химия.* 2009. Т. 55. № 6. С. 727–733.
42. El-Abhar H.S., Shaalan M., Barakat M., El-Denshary E.S. // *J. Pineal Res.* 2002. V. 33. P. 87–94.