



УДК 615.9:616.36-099:576.2.24:577.161.3

С. І. Анісімова, Л. Б. Бондаренко, Г. М. Шаяхметова,
А. К. Вороніна, В. М. Коваленко

ВПЛИВ СРЕПТОМІЦИНУ Й ЕТАМБУТОЛУ НА ЦИТОХРОМ P-450 2E1-ЗАЛЕЖНІ МЕХАНІЗМИ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТІ

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ

Сучасна терапія туберкульозу передбачає комплексне використання низки протимікробних лікарських засобів [1]. Принцип комбінованої хіміотерапії дозволяє підвищити ефективність лікування в цілому. Проте необхідно враховувати той факт, що дія протитуберкульозних засобів (ПТЗ) нерідко супроводжується побічними ефектами, реалізація яких опосередкована індукцією цитохрому P-450 2E1 [2]. Ступінь виявлення токсичної дії може зростати за комбінованого застосування ПТЗ. Тому **мета** даної роботи — провести порівняльне дослідження впливу двох комбінацій ПТЗ першого ряду фармакотерапії на показники I та II фаз біотрансформації, про- й антиоксидантний статус і процеси фрагментації ДНК у клітинах печінки білих щурів-самців.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженнях використані щури-самці лінії Вістар масою тіла 150–170 г. Методом рандомізації тварини були розподілені на п'ять груп. Тварини першої та другої експериментальних груп отримували відповідно етамбутол і стреп-

томіцин у терапевтичних дозах, а щури третьої та четвертої — комбінації ПТЗ, що містили у терапевтичних дозах (з урахуванням коефіцієнта видової чутливості) ізоніазид, рифампіцин, піразинамід та етамбутол (комбінація 1) або стрептоміцин (комбінація 2). Усі препарати, крім стрептоміцину, вводили щурам внутрішньошлунково у вигляді завису в 1%-му крохмальному гелі.

Стрептоміцин вводили внутрішньом'язово у 0,5%-му розчині новокаїну. Тваринам контрольної групи вводили лише крохмальний гель. Термін введення ПТЗ становив 60 днів. Через 24 год після останнього введення тварин під легким ефірним наркозом умертвляли методом цервікальної дислокації. Печінку відмивали через ворітну вену охолодженням 0,15 М розчином KCl, гомогенізували та піддавали центрифугуванню у градієнті солей з метою виділення постмітохондріальної та мікосомальної фракцій [3]. Усі процедури виконували з дотриманням холодного режиму (4 °C). У фракції мікосом визначали загальний вміст цитохрому P-450 [4] та *p*-нітрофенолгідроксилазну активність [5]. У постмітохонд-

ріальній фракції печінки досліджували глутатіон-S-трансферазну активність [6]. Вміст відновленого глутатіону у гомогенаті печінки визначали за методом J. Sedlak і R. Lindsay [7]. Білок — за методом O. H. Lowry et al. [8]. Аналізували ступінь фрагментації ДНК у тканинах печінки [9]. Статистичний аналіз результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Дані представляли як середнє значення та похибку середнього значення ($M \pm m$). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично достовірною при значенні $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті дослідження встановлено, що етамбутол викликав збільшення загального вмісту цитохрому P-450 на 21 % порівняно з контрольними тваринами, можливо, за рахунок індукції ізоформи CYP2E1 (табл. 1). У мікосомах печінки тварин, що отримували комбінацію 1, даний показник змінювався аналогічно. Стрептоміцин спричиняв збільшення загального вмісту цитохрому P-450 на 32 %, а комбінація 2 — на 54 %, очевидно, також за



Показники стану монооксигеназної системи в мікосомальній фракції печінки щурів за умов уведення протитуберкульозних засобів, $M \pm m$, $n=6$

Експериментальна група	Активність <i>p</i> -нітрофенол-гідроксилази, нмоль/(хв·мг білка)	Цитохром Р-450, нмоль/мг білка	НАДФН-залежне ПОЛ, нмоль/(хв·мг білка)
Контроль (крохмальний гель)	0,25±0,02	0,63±0,02	0,157±0,022
Етамбутол	1,14±0,15*	0,76±0,02*	0,226±0,007*
Стрептоміцин	0,34±0,07	0,83±0,04*	0,151±0,010
Комбінація 1	1,02±0,12*	0,76±0,05*	0,224±0,070*
Комбінація 2	1,04±0,20*	0,97±0,03*	0,214±0,023*

Примітка. У табл. 1, 2: * — зміни достовірні порівняно з контролем.

Таблиця 2

Показники, що характеризують тіоловий статус у печінці щурів за умов уведення протитуберкульозних засобів, $M \pm m$, $n=6$

Експериментальна група	Глутатіон-редуктаза, нмоль/(хв·мг білка)	Глутатіон-S-трансфераза, нмоль/(хв·мг білка)	Вміст глутатіону, нмоль/(хв·мг білка)
Контроль (крохмальний гель)	0,150±0,004	1,49±0,06	13,00±1,32
Етамбутол	0,190±0,012	1,78±0,08*	17,35±1,21*
Стрептоміцин	0,180±0,015	1,66±0,10	12,21±1,39
Комбінація 1	0,21±0,01*	1,99±0,23	18,04±2,01*
Комбінація 2	0,160±0,005	1,74±0,08*	14,86±6,28

рахунок ізоформи CYP2E1. Водночас нами зареєстровано збільшення *p*-нітрофенолгідроксилазної активності (маркера ізоформи CYP2E1) у мікосомальній фракції печінки щурів при застосуванні етамбутолу в 4,5 рази порівняно з контрольною групою тварин, тимчасом як при застосуванні стрептоміцину даний показник практично не змінювався. Зафіксовано також суттєве збільшення *p*-нітрофенолгідроксилазної активності (приблизно в 4 рази) у мікосомальній фракції печінки щурів за умов уведення комбінацій 1 та 2. Цей процес супроводжувався зростанням активності НАДФН-залежного перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за умов уведення етамбутолу й обох комбінацій ПТЗ. Застосування стрептоміцину не приводило до змін даного показника.

Дослідження показників II фази біотрансформації показало, що застосування етамбутолу приводило до збільшення глутатіонтрансферазної активності та вмісту відновленого глутатіону в печінці щурів приблизно на 20 % порівняно з контрольною групою (табл. 2), що може бути реакцією організму на збільшення кількості електрофільних продуктів I фази біотрансформації.

Уведення шурам стрептоміцину не вплинуло на вміст відновленого глутатіону, глутатіонтрансферазну та глутатіонредуктазну активність у печінці порівняно з контролем. Комбінація 1 викликала зростання глутатіонредуктазної активності на 39 % та вмісту відновленого глутатіону на 40 % порівняно з контролем. У групі тварин, яким вводили комбінацію 2, глутатіонтрансферазна активність підвищувалася на 17 %. Ці дані свідчать про порушення тіолового статусу в печінці щурів за дії ПТЗ.

Індукція цитохрому Р-450 2E1 за умов уведення ПТЗ, що супроводжувалася збільшенням кількості реактивних форм

кисню, приводила до інтенсифікації процесів фрагментації нуклеарної ДНК зі збільшенням кількості фрагментів різної довжини, що, як відомо, негативно позначається на стабільності нуклеїнових кислот і перебігу опосередкованих ними процесів, у тому числі — нормального апоптозу [10].

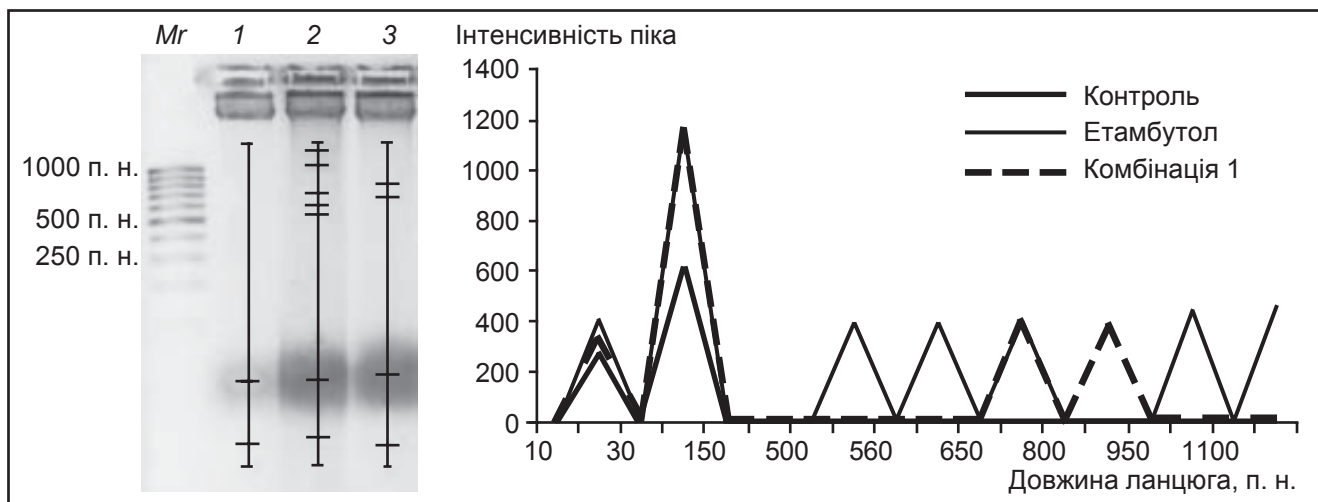
За умов введення етамбутолу у печінці значно інтенсифікувалася фрагментація ДНК з утворенням високомолекулярних (від 1200 до 550 п. н.) та коротких послідовностей нуклеотидів (у діапазоні 40–20 п. н.) порівняно з контролем, де спостерігалася лише незначна фрагментація ДНК до фрагментів у діапазоні 40–20 п. н. (рис. 1).

У випадку застосування стрептоміцину процес фрагментації ДНК ще більше поси-

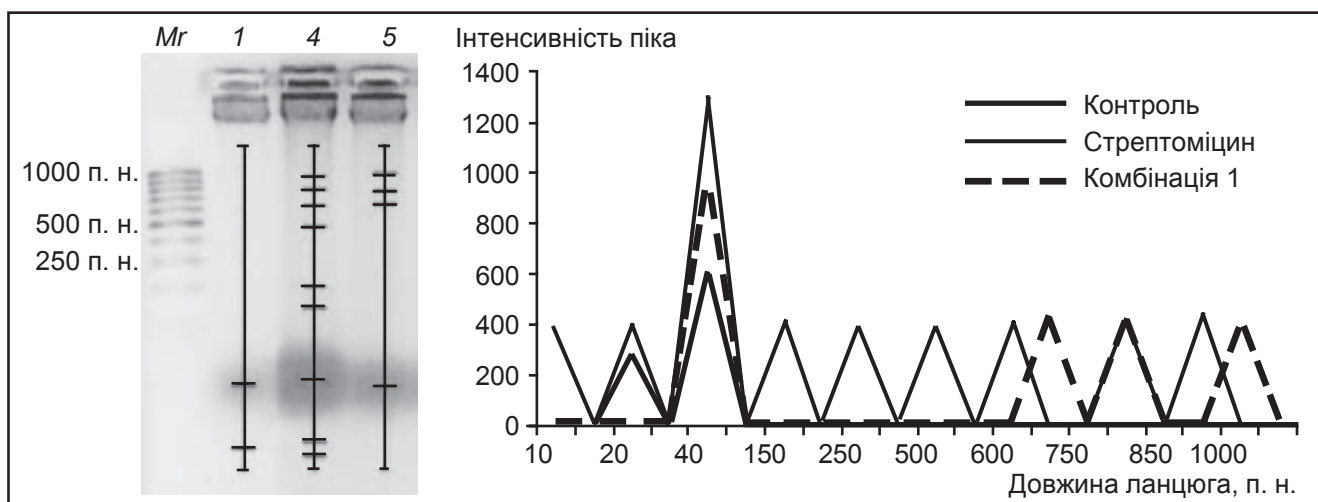
лювався і приводив до утворення 9 основних фракцій ланцюжків ДНК із довжинами 950, 800, 600, 500, 250, 150, 40, 20, 10 п. н. За інтенсивністю піка фракція 40 п. н. була утричі більшою, ніж інші, однак сумарно переважали більш високомолекулярні фрагменти (950–250 п. н.).

Одержані результати цілком узгоджуються з даними інших авторів щодо специфічного впливу стрептоміцину на процеси фрагментації ДНК [11]. Уведення комбінації 1 у печінці посилювало фрагментацію порівняно з контролем і приводило до утворення 4 основних фракцій ДНК: 850, 700, 40 та 20 п. н. За інтенсивністю піка третя фракція ДНК (40 п. н.) була у 3,5 рази більшою, ніж три інші. При введенні комбінації 2 зафіксовано по-





a



б

Рис. 1. Фрагментація ДНК у печінці щурів за умов введення протитуберкульозних засобів: а — етамбутолу; б — стрептоміцину; Mr — маркер; 1 — контроль (крохмальний гель); 2 — етамбутол; 3 — комбінація 1; 4 — стрептоміцин; 5 — комбінація 2

дібну картину. Практично аналогічний характер фрагментації ДНК при введенні обох комбінацій ПТЗ, очевидно, може свідчити про їх вплив на цей показник опосередковано, через індукцію цитохрому Р-450 2Е1. Таке припущення цілком узгоджується з даними інших авторів [10; 12] і нашими попередніми результатами [13].

Висновки

Таким чином, у результаті проведених досліджень впливу стрептоміцину й етамбутолу на цитохром Р-450 2Е1-залежні механізми гепатотоксичності нами виявлено значні відмінності між даними препаратами щодо здатності інду-

кувати цитохром Р-450 2Е1, стимулювати НАДФН-залежне ПОЛ, змінювати рівень показників II фази біотрансформації та фрагментації нуклеарної ДНК клітин печінки. При цьому дія комбінацій 1 та 2 на показники I та II фази біотрансформації, стан процесів ПОЛ і фрагментацію нуклеарної ДНК клітин печінки суттєво не відрізнялася.

ЛІТЕРАТУРА

1. An Official ATS Statement: Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy / J. J. Saukkonen, D. L. Cohn, R. M. Jamer [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. — 2006. — Vol. 174. — P. 935–952.
2. Lieber C. S. Cytochrome P-450 2E1: Its Physiological and Patho-

logical Role / C. S. Lieber // Physiol. Rev. — 1997. — Vol. 77. — P. 517–544.

3. 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. — Vol. 17, N 1. — P. 90–92.

4. Omura T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes / T. Omura, R. Sato // J. Biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370–2385.

5. Koop D. R. Inhibition of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 by 3-amino-1,2,4-triazole / D. R. Koop // Chem. Res. Toxicol. — 1990. — N 3. — P. 377–383.

6. Habig W. H. Glutathione-S-Transferases / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby // J. Biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, N 22. — P. 7130–7139.

7. Sedlak J. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent



/ J. Sedlak, R. Lindsay // *Anal. Biochem.* – 1968. – Vol. 25, N 1. – P. 192–205.

8. *Protein measurement with Folin phenol reagent* / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

9. *Current Protocols in Toxicology* / ed. by M. Maines. – John Wiley & Sons, Inc., 2005. – 2758 p.

10. *Acetaminophen metabolism and cytotoxicity in PC12 cells transfected*

with cytochrome P450 2E1 / A. Holownia, J. Mapoles, J. F. Menez [et al.] // *Journal of Molecular Medicine.* – 1997. – Vol. 75, N 7. – P. 522–527.

11. *Abbitt B. Effect of dihydrostreptomycin or oxytetracycline on reproductive capacity of dults* / B. Abbitt, W. E. Berndtson, G. E. Seidel // *Am. J. Vet. Res.* – 1984. – Vol. 45, N 11. – P. 2243–2246.

12. *Isoniazid-induced apoptosis in HepG2 cells: generation of oxidative stress and Bcl-2 down-regulation*

/ S. Bhadauria, R. Mishra, R. Kanchan [et al.] // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2010. – Vol. 20, N 5. – P. 242–251.

13. *Pyrazinamide-mediated alterations in male rats DNA fragmentation processes, bone collagen amino acid composition, reproductive capability and posterity antenatal and postnatal development* / L. Bondarenko, G. Shayakhmetova, T. Byshovets [et al.] // *Intern. Journal of Infectious Diseases.* – 2011. – Vol. 15, Suppl. – P. S99–S100.

УДК 616.314-003.84:612.089.67

Л. С. Кравченко, А. М. Пасечник, С. В. Щербаков, О. В. Пасечник

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ НОВОГО ГЕЛЮ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ПРОЦЕСІВ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ В ПОРОЖНИНІ РОТА ПРИ ДЕНТАЛЬНІЙ ІМПЛАНТАЦІЇ

Одеський національний медичний університет

Впровадження в практику стоматології методу дентальної імплантації виявило проблеми, які супроводжують його клінічне застосування. Хірургічне втручання на кісткових структурах у порожнині рота не може не призводити до запалення травмованих тканин. Як будь-яке хірургічне лікування, імплантація характеризується розвитком ранового процесу, перебіг і кінцевий результат якого залежать від багатьох факторів: локалізації рани, стану місцевого та загального імунітету, ступеня мікробного обмінення, вірулентності присутньої мікрофлори та застосування лікувальних заходів [1; 2].

Відповіддю на кожну ушкоджуючу дію є перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) — вільнорадикальний процес, який протікає на поліненасичених жирних кислотах, що входять до складу ліпідного бішару мембран і ліпопротеїнових комплексів. Фактором, який стимулює вироблення активних форм кисню, є контакт клітин з чужорідним матеріалом і патологічно зміненим білком. В орга-

нізмі існує антиоксидантна система (АОС) захисту від токсичних метаболітів кисню, яка, за необхідності, активізується. Від злагоджених дій усіх ланок цієї системи залежить можливість інгібування окиснювальних реакцій, зниження рівня первинних і кінцевих продуктів ПОЛ. Взаємодія складових ПОЛ передбачає перебіг ранового процесу, можливість і розвиток ускладнень [3; 4].

Мета дослідження — експериментальне вивчення впливу нового стоматологічного гелю на динаміку місцевого процесу ПОЛ на стадії посттравматичних реакцій при дентальній імплантації.

Матеріали та методи дослідження

Експеримент проведено на 32 білих щурах лінії Вістар віком 10–12 міс. та середньою масою (198±4) г, які були розподілені на 4 групи:

I група — інтактна (8 особин);

II група — умовно прооперовані тварини, яким не вводили імплантати (8 щурів);

III група — контрольна, тваринам якої внутрішньокістково

вводили титановий імплантат (8 особин);

IV група — тварини, яким після дентальної імплантації проводили аплікації новим стоматологічним гелем «Апідент».

Імплантати в альвеолярну кістку щурам III–IV дослідних груп вводили під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг). Проводили розтин у ділянці кута нижньої щелепи і шар за шаром відсепаровували тупим шляхом м'язи і надкісницю. Потім бором діаметром 1,5 мм перфорували кістку в ділянці тіла нижньої щелепи і вводили титановий імплантат завдовжки 3 мм та діаметром 1,5 мм (марка титану ВТ-01-1), після чого рану шар за шаром ушивали й обробляли антисептичним розчином.

Щурам II дослідної групи проводили аналогічну операцію без введення титанових імплантатів (умовно прооперовані).

Щурам IV групи, починаючи з 2-го дня після операції, на місце, травмоване операцією, накладали тампон з гелем двічі на день упродовж 3–5 хв.

