

СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ИММУНОДЕПРЕССАНТА МИКОФЕНОЛАТА МОФЕТИЛ

М. Н. Курбат (vwmisha@mail.ru), И. Э. Гуляй, С. Я. Шалесная, А. Ю. Алещик

УО«Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Рост иммунодефицитных состояний, неясность отдельных звеньев патогенеза порождает необходимость воспроизведения экспериментальной иммуносупрессии на лабораторных животных.

Цель исследования. Изучить прооксидантно-антиоксидантное равновесие в печени крыс при введении иммунодепрессантами микофенолата мофетил (ММФ).

Материалы и методы. Активность свободно-радикальных процессов в ткани печени оценивали по содержанию продуктов ПОЛ: диеновые (ДК) и триеновые (ТК) конъюгаты, малоновый диальдегид (МДА). Содержание неферментативных и ферментативных компонентов АОС оценивали по содержанию α -токоферола, ретинола, восстановленного глутатиона (GSH), убихинона (CoQ), активности каталазы.

Результаты. Введение препарата ММФ в дозе 40 мг/кг/сутки на протяжении 7 суток не приводит к накоплению продуктов ПОЛ в ткани печени, что может быть связано с активным использованием липофильных антиоксидантных компонентов клетки. Через 7 суток после прекращения введения препарата животным наблюдается полное восстановление прооксидантно-антиоксидантного равновесия в печени крыс. Двухнедельное введение ММФ в дозе 40 мг/кг/сутки приводит к активации ПОЛ в ткани печени, которое может приводить к последующей гибели гепатоцита, лежащего в основе токсического гепатита.

Заключение. Внутрижелудочное введение препарата ММФ на протяжении 7 суток в суточной дозе 40 мг/кг может применяться для экспериментального моделирования иммунодефицитных состояний без развития признаков токсического поражения печени свободнорадикального генеза, имеющего место при назначении классических иммунодепрессантов.

Ключевые слова: иммунодефицит, моделирование, печень, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN LIVER OF RATS AFTER ADMINISTRATION OF IMMUNOSUPPRESSANT MYCOPHENOLATE MOFETIL

M. N. Kurbat, I. E. Gulyai, S. Ya. Shalesnaya, A. Yu. Aleshchik

Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

Background. The growth of immunodeficiency, unclearness of pathogenesis necessitates the reproduction of experimental immunosuppression in laboratory animals.

Objective. To study the prooxidant-antioxidant equilibrium in rat liver after the administration of immunosuppressant mycophenolate mofetil (MMF).

Materials and methods. The activity of free radical processes in liver tissue was assessed by the content of lipid peroxidation products: diene (DC) and triene (TC) conjugates, malonic dialdehyde (MDA). The content of non-enzymatic and enzymatic AOC components was assessed by the level of α -tocopherol, retinol, reduced glutathione (GSH), ubiquinone (CoQ) and catalase activity.

Results. The administration of the MMF at a dose of 40 mg/kg daily for 7 days does not result in the accumulation of products of lipid peroxidation in the sample of liver tissue, which may be due to the active use of the lipophilic antioxidant components of the cell. In 7 days after discontinuation of the administration of the drug, complete restoration of prooxidant-antioxidant balance in liver is observed in animals. A two-week injection of MMF at a dose of 40 mg/kg daily results in the activation of the peroxidation of lipids in liver tissue that can lead to subsequent death of the hepatocyte underlying the drug-induced liver injury (DILI).

Conclusion. Intra-gastric administration of the MMF for 7 days at a daily dose of 40 mg/kg can be used for experimental modeling of immunodeficiency without development of signs of toxic damage to the liver by free radical origin, which occurs in the case of classical immunosuppressants.

Keywords: immunodeficiency, modeling, liver, lipid peroxidation, antioxidant system

Введение

Отмечаемый в последние десятилетия неуклонный рост иммунодефицитных состояний (в том числе и ВИЧ-инфекции), неясность отдельных звеньев патогенеза порождает необходимость воспроизведения экспериментальной иммуносупрессии на лабораторных животных. Широкий фармакологический выбор современных иммунодепрессантов позволяет моделировать многие иммунодефициты. Класс иммуносупрессивных препаратов крайне неоднороден, содержит препараты с разными механизмами действия и разным профилем побочных эффектов. Различается и профиль иммуносупрессивного эффекта: некоторые препараты более или менее равномерно подавляют все виды иммунитета, другие имеют особую избирательность по отношению к аутоиммунитету, при сравнительно меньшем влиянии на антибактериальный, противовирусный и противоопухолевый иммунитет. По происхождению и строению иммуносупрессивные средства разделяют на глюкокортикоиды, антиметаболиты, алкилирующие соединения, антибиотики, алкалоиды и др. [21].

Однако подавляющее большинство иммунодепрессантов обладает выраженным спектром побочных эффектов, в первую очередь негативным воздействием на печень и другие органы желудочно-кишечного тракта. В литературе подробно описывается гепатотоксичность циклофосфамида, циклоспорина, азатиоприна, метотрексата, такролимуса и других лекарственных средств, издавна применяемых в экспериментальной иммунологии [11, 18].

Все это затрудняет возможность моделировать иммунодефицитные состояния у животных в «чистом» виде без сопутствующей патологии со стороны печени и порождает необходимость поиска новых методов воспроизведения иммунодефицитов.

Проблема изучения молекулярных основ токсических гепатитов остается в настоящее время весьма актуальной в связи с тяжестью и распространенностью данных патологий. Одной из стартовых мишеней токсического воздействия препаратов в клетке являются митохондрии [1]. Именно эти органеллы способны при окислительном повреждении инициировать активацию сигнальных путей, ведущих к гибели клеток, а, следовательно, – к повреждению тканей и функциональным нарушениям органов и систем [6]. Активные формы кислорода (АФК), обладающие высоким окислительным потенциалом и способностью к быстрым превращениям, вызывают цепные свободнорадикальные процессы в клетках, ведущим из которых является пероксидное окисление липидов (ПОЛ). Субстратами ПОЛ являются липиды с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, играющие важную

роль в структурно-функциональной организации биомембран. В норме ПОЛ способствует обновлению мембран, однако усиленная генерация АФК и интенсификация свободнорадикальных процессов сопровождают развитие различных патологических состояний.

При всем многообразии воздействий, оказываемых продуктами пероксидного окисления на клетки, одним из основных эффектов ПОЛ является нарушение функционирования биомембран. В настоящее время считается, что ведущий патогенетический фактор при развитии поражения гепатоцитов вследствие канцерогенеза, воспаления, химического и лекарственного отравления – дисбаланс между гиперпродукцией АФК и активацией ПОЛ, с одной стороны, и недостаточностью антиоксидантных систем (АОС) организма, с другой.

Цель исследования – изучение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в печени крыс при введении иммунодепрессанта ММФ, успешно применяется, наряду с азатиоприном, для подавления реакции отторжения трансплантата и относится к иммунодепрессантам антимаболического типа.

ММФ является зарегистрированным лекарственным средством в Республике Беларусь и по анатомо-терапевтическо-химической классификации (АТС) входит в группу селективных иммунодепрессантов. ММФ представляет собой 2-морфолиноэтиловый эфир микофеноловой кислоты. ММФ – мощный селективный неконкурентный и обратимый ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы (ИМФДГ), подавляющий синтез гуанозиновых нуклеотидов *de novo* [16]. Согласно литературным данным, назначение ММФ в дозе 40 мг/кг в течение 7 суток оказывает негативное воздействие на заживление кожных ран у грызунов, вследствие снижения иммунитета [19]; в той же дозе ММФ значительно снижает лейкоцитарную инфильтрацию трансплантата после гетеротопической трансплантации сердца в модели крыс [15].

Механизм, путем которого ММФ ингибирует ферментную активность ИМФДГ, по-видимому, связан с тем, что ММФ структурно имитирует как кофактор никотинамиддинуклеотидфосфата, так и катализирующую молекулу воды. Это препятствует окислению инозин-5-монофосфата в ксантозо-5-монофосфат – важнейший этап биосинтеза гуанозиновых нуклеотидов *de novo*. ММФ оказывает более выраженное цитостатическое действие на лимфоциты, чем на другие клетки, поскольку пролиферация Т- и В-лимфоцитов очень сильно зависит от синтеза пуринов *de novo*, в то время как клетки других типов могут переходить на обходные пути метаболизма [5].

Материалы и методы

Для моделирования иммунодепрессии ММФ вводили белым беспородным крысам-самцам, средней массой 200–240 г, содержащихся на стандартном рационе вивария без ограничения доступа к воде. Проведение исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет». Крысы были взяты в эксперимент методом случайной выборки и разделены на 4 группы: контроль (1-я) и опытные (2–4). Животным опытных групп, на протяжении 7 суток внутрижелудочно через зонд вводили суспензию препарата в дозе 40 мг/кг/сутки: 2-я группа – ММФ 7 суток, 3-я группа – ММФ 7 суток и 7 суток наблюдения после отмены препарата и 4-я группа – ММФ 14 суток. Контрольные животные (1-я группа) получали внутрижелудочно эквивалентное количество 0,9% раствора натрия хлорида. За 12 часов до забоя животных лишали пищи с сохранением воды в качестве источника питья. Забой животных 2-й группы проводили на 8-е сутки, 3-е и 4-й групп – на 15-е сутки.

Активность свободно-радикальных процессов в ткани печени оценивали по содержанию первичных и вторичных продуктов ПОЛ: диеновые (ДК) и триеновые (ТК) конъюгаты, малоновый диальдегид (МДА) [10].

Содержание неферментативных и ферментативных компонентов АОС оценивали по содержанию α -токоферола, ретинола, восстановленного глутатиона (GSH), убихинона (CoQ), активности каталазы.

Для приготовления гомогенатов размороженные образцы тканей печени измельчали в десятикратном объеме 10 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащем 0,1 мМ ЭДТА в гомогенизаторе WPW-30 (Польша) с тефлоновым пестиком (2000 об/мин, 10 циклов).

ДК и ТК определяли с помощью метода, основанного на интенсивности поглощения диеновых структур гидроперекисей липидов в области 233 (ДК) и 278 (ТК) нм [7]. Содержание МДА оценивали по методу [4], основанному на образовании при нагревании в кислой среде триметинового комплекса розового цвета, интенсивность кото-

рого определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Концентрацию α -токоферола, ретинола и убихинона определяли по методу S. L. Taylor [19], основанному на определении интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 286 нм и испускания 330 нм (для α -токоферола), при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 470 нм (для ретинола) и при длине волны возбуждения 295 нм и испускания 415 нм на спектрофлуориметре CM 2203 «Солар». Активность каталазы в ткани печени оценивали по количеству израсходованной перекиси водорода, способной образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс, имеющий максимальное светопоглощение при длине волны 410 нм [6]. Содержание восстановленного глутатиона изучали по модифицированному методу J. Sedlak и R. Lindsay [17]. В основе метода лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ), способной поглощать свет при длине волны 412 нм.

Статистическую обработку данных проводили с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок при помощи пакета Statistica 10.0 (Серийный номер AXAR207F394425FA-Q). Нормальность выборок проверяли критериями Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллифорса и Шапиро-Уилка [2].

Результаты и обсуждение

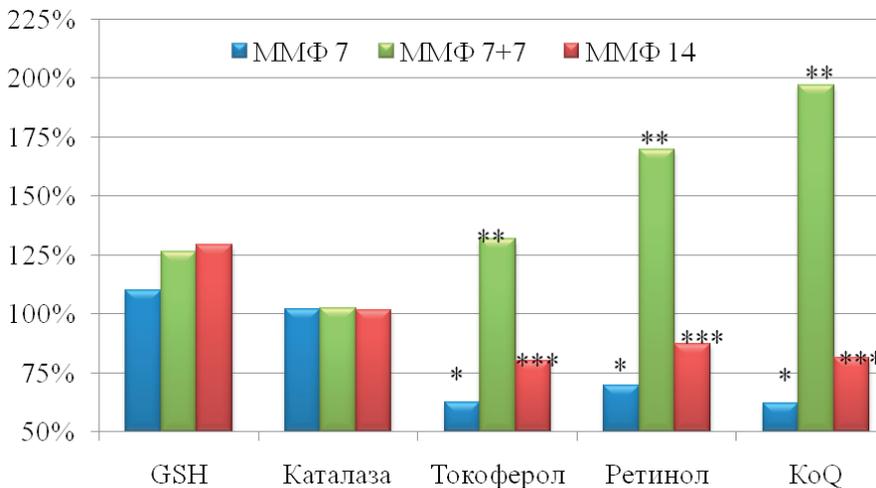
Известно, что токсическое поражение гепатоцита приводит к нарушению прооксидантно-антиоксидантного равновесия, являющегося стартовым механизмом целого каскада биохимических процессов, приводящих к его некрозу. Результаты наших исследований показали, что в группе животных, получающих ММФ на протяжении 7 суток, не наблюдается активации ПОЛ соответствующего накопления продуктов ПОЛ (таблица 1) в печени. Более того, в данной экспериментальной группе отмечается снижение (в 2 раза) ТК, которые являются промежуточными молекулярными продуктами ПОЛ и оказывают значимое токсическое действие, свидетельствуют о глубине и степени выраженности эндотоксикоза.

Таблица 1. – Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в ткани печени крыс при введении ММФ

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 ММФ 7 суток	Группа 3 ММФ 7+7 суток	Группа 4 ММФ 14 суток
ДК, Ед/г ткани	4,13±0,785	4,28±0,487	5,47±0,714	4,59±0,777
ТК, Ед/г ткани	5,70±0,649	2,85±0,450*	6,60±0,902**	4,97±0,892**
МДА, мкмоль/г ткани	32,38±3,481	32,20±2,836	39,90±3,492	45,11±3,440***

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой; ** – $p < 0,05$ при сравнении со 2 группой

Заслуживает внимания на наш взгляд, значительное уменьшение концентрации в данной группе липофильных антиоксидантов в печени: витаминов ретинола и α -токоферола, а также КоQ (рисунок 1). Возможно, данный метаболический эффект является компенсаторным механизмом, сдерживающим деструктивное действие активных форм кислорода.



Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой; ** – $p < 0,05$ при сравнении со 2 группой (ММФ 7); *** – $p < 0,05$ при сравнении с 3 группой (ММФ 7+7)

Рисунок 1 – Содержание антиоксидантов в ткани печени (в процентах к контрольной группе)

При проведении корреляционного анализа у животных контрольной группы не обнаружено статистически достоверных корреляций между продуктами ПОЛ и компонентами АОС. У животных 2-й группы выявлены положительные корреляции между концентрациями ТК и КоQ ($r = 0,79$, $p = 0,019$, рисунок 2А) и ТК и ретинолом ($r = 0,75$, $p = 0,032$, рисунок 2Б), а также между ретинолом и КоQ ($r = 0,97$, $p = 0,0001$), что говорит о тесном антиоксидантном синергизме этих двух антиоксидантов [12, 14].

К концу первой недели после прекращения введения ММФ животным наблюдается нор-

мализация процессов ПОЛ (таблица 1, группа 3) в гомогенатах изучаемой ткани. Нами не обнаружено разницы в содержании первичных и вторичных продуктов ПОЛ и АОС в сравнении с группой контроля. Однако при сравнении концентрации липофильных антиоксидантов отмечается достоверная разница между животными 2 и 3 групп. При прекращении введения ММФ регистрируется компенсаторное повышенное содержание токоферола, ретинола и убихинона в печени, в сравнении с группой 2. В то время как активность каталазы и уровень восстановленного глутатиона не изменяется (рисунок 1).

Удлинение сроков воздействия ММФ на ткань печени до 14 суток приводит к накоплению вторичных продуктов ПОЛ. Наблюдается возрастание МДА на 40% при сравнении с контрольной группой (таблица 1, группа 4). Уровень антиоксидантов статистически значимо не изменяется. Накопление МДА в гепатоцитах приводит к развитию окислительного стресса, ведущего к повреждению клеточных структур, нарушению метаболизма и жизнедеятельности клеток, все большей утечки активных форм кислорода с повреждающихся мембран митохондрий, запуску апоптотической гибели клетки [3]. Установлено, что наиболее подвержены развитию патологических изменений в результате развития оксидативного стресса структуры клеток в тканях, функционирование которых требует больших энергетических затрат, с небольшими компенсаторными возможностями антиоксидантных систем. Нако-

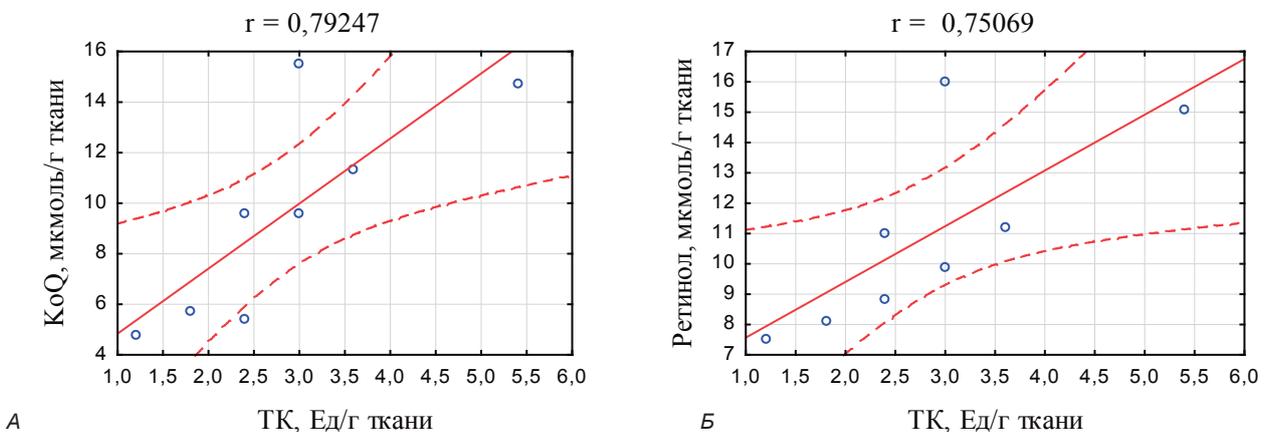


Рисунок 2 – Корреляционные матрицы концентраций ТК и КоQ (2А), К и витамина А (2Б) в ткани печени крыс при введении ММФ 7 суток

пление активных форм кислорода в чрезмерных количествах может сопровождаться нарушением жидкокристаллической структуры липопротеидов мембран, уменьшением прочности биологических мембран, набуханием и разрушением митохондрий, структурно-функциональными нарушениями ферментных систем дыхания, окислением сульфгидрильных групп ферментов, ослаблением биосинтеза АТФ, репликацией ДНК (в том числе и митохондриальной), дезорганизацией транспортных механизмов переноса ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), различных метаболитов между цитозолем, митохондриями и рибосомами, снижением биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, повреждением лизосом с выходом гидролитических ферментов, накоплением молочной кислоты, окси- и кетокислот и развитием ацидоза, инактивацией компонентов АОС [8, 13].

Выводы

1. Введение препарата ММФ в дозе 40 мг/кг/сутки на протяжении 7 суток не приводит к накоплению продуктов ПОЛ в ткани печени, что

может быть связано с активным использованием липофильных антиоксидантных компонентов клетки. Через 7 суток после прекращения введения препарата животным наблюдается полное восстановление прооксидантно-антиоксидантного равновесия в печени крыс.

2. Двухнедельное введение ММФ в дозе 40 мг/кг/сутки приводит к активации ПОЛ в ткани печени, что может приводить к последующей гибели гепатоцита, лежащего в основе токсического гепатита. Такой лавинообразный процесс формирует все новые и новые цепи окисления с участием первичных, промежуточных и конечных продуктов ПОЛ.

3. Внутривенное введение препарата ММФ на протяжении 7 суток в суточной дозе 40 мг/кг может применяться для экспериментального моделирования иммунодефицитных состояний без развития признаков токсического поражения печени свободнорадикального генеза, имеющего место при назначении классических иммуносупрессантов и цитостатиков.

References

1. Andreev, A. Ju. Metabolizm aktivnyh form kisloroda v mitohondriyah [Metabolism of reactive oxygen species in mitochondria] / A. Ju. Andreev, Ju. E. Kushnareva, A. A. Starkov // *Biohimija*. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 246-264. (Russian)
2. Borovikov, V. P. Statistika. Iskustvo analiza dannyh na komp'yutere / V. P. Borovikov. – Sankt-Peterburg : Piter, 2003. – 688 с. (Russian)
3. Dubinina, E. E. Produkty metabolizma kisloroda v funkcional'noj aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie). Fiziologicheskie i kliniko-biohimicheskie aspekty / E. E. Dubinina. – Sankt-Peterburg : Izdatelstvo Medicinskaja Pressa, 2006. – 400 s. (Russian)
4. Kamyshnikov, V. S. Spravochnik po kliniko-biohimicheskoj laboratornoj diagnostike : v 2 t. / V. S. Kamyshnikov. – 2-e izd. – Minsk : Belarus, 2002. – Т. 1. – 465 s. (Russian)
5. Karbociklicheskie analogi inozin-5'-monofosfata: sintez i biologicheskaja aktivnost' / E. S. Matjugina [i dr.] // *Actanaturae*. – 2012. – Т. 15, № 4. – С. 75-79. (Russian)
6. Skulachev, V. P. Javlenija zaprogrammirovannoj smerti. Mitohondrii, kletki i organy: rol' aktivnyh form kisloroda [The phenomena of a programmed death. Mitochondria, cells and organs: the role of reactive oxygen species] / V. P. Skulachev // *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*. – 2001. – Т. 7, № 6. – С. 4-10. (Russian)
7. Sopostavlenie razlichnyh podhodov k opredeleniju produktov POL v heptan – izopropanol'nyh jekstraktah krovi [Comparison of different approaches to the determination of LPO products in heptane-isopropanol extracts of blood] / I. A. Volchegorskij [i dr.] // *Voprosy medicinskoj himii*. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127-131. (Russian)
8. Chirkin, A. A. Molekuljarnye mehanizmy povrezhdenija pečeni [Molecular mechanisms of liver damage] / A. A. Chirkin // *Immunopatologija, allergologija, infektologija*. – 2000. – № 1. – С. 26-33. (Russian)
9. Aruoma, O. I. Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts / O. I. Aruoma, S. L. Cuppett. – New-York, 1997. – 241 p.
10. Bartosz, G. *Drugatwarztleno* / G. Bartosz. – Warszawa : Wydawnictwo naukowe PWN, 2003. – 447 p.
11. Björnsson, E. S. Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents / E. S. Björnsson // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, № 2. – P. 1-7.
12. Chong-Han, K. Dietary lipophilic antioxidants: implications and significance in the aging process / K. Chong-Han // *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* – 2010. – Vol. 50, № 10. – P. 931-937.
13. Dey, A. Alcohol and oxidative liver injury / A. Dey, A. I. Cederbaum // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 43, № 2. – P. 63-74.
14. Effects of vitamin A deficiency on mitochondrial function in rat liver and heart / E. Estornell [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2000. – Vol. 84, № 6. – P. 927-934.
15. Mycophenolate mofetil significantly reduces leukocyte graft infiltration after heterotopic cardiac transplantation in a rat model: comparative study with cyclosporine and FK 506 / M. H. Richter [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* – 2003. – Vol. 22, № 10. – P. 1107-1116.
16. Olejarz, W. Mycophenolate mofetil – a new atheropreventive drug? / W. Olejarz, D. Bryk, D. Zapolska-Downar // *Acta Pol. Pharm.* – 2014. – Vol. 71, № 3. – P. 353-361.
17. Sedlak, J. Estimation of total, protein-bound, and protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent / J. Sedlak, R. N. Lindsay // *Anal. Biochem.* – 1968. – Vol. 25, № 1. – P. 192-205.
18. Stine, J. G. Chronic liver injury induced by drugs: a systematic review / J. G. Stine, N. Chalasani // *Liver Int.* – 2015. – Vol. 35, № 11. – P. 2343-2353.
19. Taylor, S. L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis / S. L. Taylor, M. P. Lamden, A. L. Tappel // *Lipids*. – 1976. – Vol. 11, № 7. – P. 530-538.
20. The Effect of Mycophenolate Mofetil on Early Wound Healing in a Rodent Model / M. C. Willems [et al.] // *Transplant. Direct.* – 2016 – Vol. 20, № 6. – P. e80.
21. Wiesner, R. H. Present state of immunosuppressive therapy in liver transplant recipients / R. H. Wiesner, J. J. Fung // *Liver Transpl.* – 2011. – Vol. 17, Suppl. 3. – P. S1-S9.

Поступила: 22.05.2017

Принята к печати: 25.05.2017