

Гепатопротективное действие экстракта бадана и силимарина при экспериментальном ингибировании β -окисления жирных кислот, вызванном 4-пентеновой кислотой

Шутов Д.В.

Heparprotective effect of *Bergenia crassifolia* extract and silymarin at experimental inhibition of β -oxidation of fatty acids caused by 4-pentenioic acid

Shutov D.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Шутов Д.В.

Целью данного исследования явилось изучение биоэнергетики печени крыс при патологии, обусловленной ингибированием β -окисления жирных кислот на фоне введения 4-пентеновой кислоты, и при терапии силимарином и экстрактом бадана толстолистного. Эксперимент проводили на 50 беспородных крысах-самцах. Функциональное состояние системы энергопродукции оценивали полярографическим методом по скорости потребления кислорода в различных метаболических состояниях по Чансу. При терапии силимарином регистрировалось увеличение сопряженности окислительного фосфорилирования в сочетании с небольшим снижением скорости дыхания во всех метаболических состояниях. Экстракт бадана эффективнее силимарина способствовал нормализации показателей энергопродукции в митохондриях печени крыс.

Ключевые слова: митохондрии печени, силимарин, экстракт бадана, 4-пентеновая кислота.

The object of this research was to study rat liver bioenergetics at pathology caused by inhibition of β -oxidation of fatty acids against the background of 4-pentenioic acid injection and at silymarin and *Bergenia crassifolia* extract therapy. The experiment was conducted with 50 non-pedigreed male rats. The functional state of the energy production system was estimated by the polarographic method from the rate of oxygen consumption in different Chans metabolic states. At silymarin therapy, increase was observed in the oxidative phosphorylation coupling in all metabolic states. The *Bergenia crassifolia* extract favored normalization of energy production parameters in rat liver mitochondria more efficiently than silymarin did.

Key words: liver mitochondria, silymarin, *Bergenia crassifolia* extract, 4-pentenioic acid.

УДК 615.24:615.322

Введение

Длинноцепочечные жирные кислоты являются ключевыми субстратами в энергетическом метаболизме печени, участвуют в синтезе фосфолипидов, посттрансляционной модификации белков, передаче клеточных сигналов, контроле транскрипции, регулируют проницаемость мембран. В гепатоциты средне- и длинноцепочечные жирные кислоты транспортируются при участии карнитина [9, 17, 18]. Ингибирование β -окисления средне- и длинноцепочечных жирных кислот приводит к их накоплению в ткани печени, образованию триглицеридов и формированию микровезикулярного стеатоза. Накопление в митохондриях эфиров ацетилкоэнзима А (ацетил-КоА) способствует разрушению свободного

коэнзима А и усиливает нарушения окислительных процессов [20, 22, 23].

В работе использовали модель экспериментального нарушения β -окисления жирных кислот, вызванного внутрибрюшинным введением крысам 4-пентеновой кислоты, связывающей карнитин в неактивный комплекс. Жирные кислоты, повреждая митохондрии гепатоцитов, нейронов и нейроглии, блокируют пируватдегидрогеназный комплекс (нарушается превращение пирувата в ацетил-КоА), ингибируют цитратсинтазу и глутаматдегидрогеназу с развитием энергетического дефицита и лактат-пируватного ацидоза, усиливают перекисное окисление липидов [15, 16, 20].

В современной фармакотерапии заболеваний печени используют гепатопротективные средства, обладающие ан-

тиоксидантной, противовоспалительной, дезинтоксикационной и желчегонной активностью. Среди гепатопротекторов заметную долю занимают препараты, содержащие естественные или полусинтетические флавоноиды расторопши пятнистой. Главным действующим компонентом расторопши является флаволигнан силимарин. Силимарин, встраиваясь в липидный бислой мембран, связывает ионы железа в хелатные комплексы и подавляет образование первичных и вторичных продуктов липопероксидации, препятствует нарушениям митохондриального окисления в печени [1, 8].

Экстракт бадана толстолистного упоминается в рецептуре тибетской медицины и медицины Забайкалья. В научной медицине корневища бадана используют как кровоостанавливающее, вяжущее, противовоспалительное и противомикробное средство. Корневища и листья бадана содержат седогептулозу, витамин С, каротин, гидрохинон, арбутин, рододендрин, эллаговую кислоту, бергенин, экдистерон, дубильные вещества, свободную галловую кислоту, катехины, флавоноиды (кверцитин и кемпферол), лейкоантоцианиды. Такой химический состав позволяет предположить наличие у препаратов бадана гепатопротективных свойств [11].

Целью данной работы явилось изучение биоэнергетики печени крыс при ее патологии, обусловленной ингибированием β -окисления жирных кислот на фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой, и при терапии этой патологии силимарином и экстрактом бадана толстолистного.

Материал и методы

Эксперимент проводили на 50 белых крысах-самцах массой 180—200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Для ингибирования β -окисления жирных кислот животные в течение 7 дней получали ежедневные внутривентрально-брюшинные инъекции 0,5%-го раствора 4-пентеновой кислоты (ISN, США) в дозе 20 мг/кг массы тела. С 8-го дня эксперимента на протяжении 14 дней им вводили внутривентрально сухой экстракт бадана (50 мг/кг массы тела) или силимарин (70 мг/кг массы тела) в виде суспензии на 1%-й крахмальной слизи. Дозы гепатопротекторов являются эффективными терапевтическими [12]. Контрольные животные получали растворители гепатопротекторов в эквивалентных количествах. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом через 12 ч после последнего введения препаратов.

Функциональное состояние митохондрий гомогената печени исследовали полярографическим методом (полярограф

РА-2, Чехия) с помощью закрытого электрода Кларка лабораторного изготовления по скорости потребления кислорода в различных метаболических состояниях по Чансу [14]. Рассчитывали скорости потребления кислорода до (V_{4n}), во время (V_3) и после (V_{4o}) цикла фосфорилирования добавленной аденозиндифосфатазы (АДФ) (0,1 ммоль) при окислении эндогенных субстратов, флавиновзависимого субстрата сукцината (1 ммоль) и НАД-зависимых субстратов малата и глутамата (по 3 ммоль), измеряли также время фосфорилирования добавленной АДФ. Для оценки энергетического статуса митохондрий вычисляли коэффициенты сопряженности окислительного фосфорилирования (АДФ/О), стимуляции дыхания (СД, отношение скорости V_3 к скорости V_{4n}) и дыхательного контроля (ДК, отношение скорости V_3 к скорости V_{4o}). Вклад окисления эндогенного сукцината при окислении митохондриями НАД-зависимых субстратов вычленили внесением в среду инкубации ингибитора сукцинатдегидрогеназы (СДГ) — малоната (2 ммоль).

Результаты обрабатывали методом парных сравнений по критерию Манна—Уитни, вероятность ошибочного вывода не превышала 5% ($p < 0,05$) [5]. Анализ данных проводили на IBM-совместимом компьютере с использованием математического пакета Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

На следующий день после прекращения инъекций 4-пентеновой кислоты при окислении эндогенных субстратов в митохондриях печени уменьшались скорости дыхания V_3 и V_{4o} на 20% по отношению к скоростям, определенным у интактных животных (рис. 1). Время фосфорилирования добавленной АДФ удлилось на 10%. Основываясь на анализе абсолютных значений кинетических параметров системы энергопродукции, можно предположить наличие слабо выраженного торможения СДГ под влиянием оксалоацетата (ОА) на фоне развития низкоэнергетического сдвига. На это указывает более длительное относительно нормы время фосфорилирования добавленной АДФ, сопоставимое по характеру изменений со временем перехода митохондрий из состояния активного фосфорилирования в состояние отдыха.

Более выраженные изменения по сравнению с нормой развивались при окислении в митохондриях печени экзогенного сукцината (1 ммоль). В состояниях покоя, активного фосфорилирования добавленной АДФ и отдыха скорости

дыхания снижались на 32—38% (рис. 1). Время фосфорилирования АДФ возрастало на 35%.

При окислении митохондриями печени животных, получавших 4-пентеновую кислоту, НАД-зависимых субстратов (малата и глутамата) скорости дыхания уменьшались на 33—48%, при этом время фосфорилирования удлинялось на 41% относительно показателей, определенных у интактных крыс (рис. 1). Коэффициенты стимуляции дыхания и дыхательного контроля снижались соответственно на 22 и 27%. Торможение дыхания во всех метаболических состояниях и увеличение времени фосфорилирования позволяет сделать вывод об ингибировании НАД-Н-дегидрогеназы в митохондриях печени. Сравнение показателей дыхания митохондрий на фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой при окислении НАД-зависимых субстратов и в тесте с добавлением ингибитора СДГ малоната не выявило значительных изменений. Коэффициент сопряженности окислительного фосфорилирования повышался на 21% после добавления малоната, тогда как у интактных животных этот показатель не изменялся.

Таким образом, при исследовании дыхательной активности митохондрий печени крыс на следующий день после

прекращения инъекций 4-пентеновой кислоты были выявлены значительные нарушения энергетического обмена. Уменьшение скоростей дыхания во всех метаболических состояниях в сочетании с медленным фосфорилированием добавленной АДФ свидетельствует об ингибировании СДГ и НАД-Н-дегидрогеназы. Анализ изменений коэффициента АДФ/О указывает на ведущую роль НАД-Н-дегидрогеназы в процессах дыхания.

У животных через 2 нед после прекращения инъекций 4-пентеновой кислоты сохранялись нарушения дыхательной активности митохондрий печени (рис. 1). Так, при окислении эндогенных субстратов скорость V_3 снижалась на 13% при неизменных значениях скоростей $V_{4п}$ и $V_{4о}$. Это нашло отражение в уменьшении коэффициентов СД и ДК на 8—11%. Появилась тенденция к более быстрому фосфорилированию АДФ, добавленной к митохондриям, окисляющим эндогенные субстраты, по сравнению с интенсивностью этого процесса после прекращения введения 4-пентеновой кислоты. Полученные данные позволяют думать о включении компенсаторных механизмов регуляции метаболизма на фоне резкого подавления дыхательной активности.

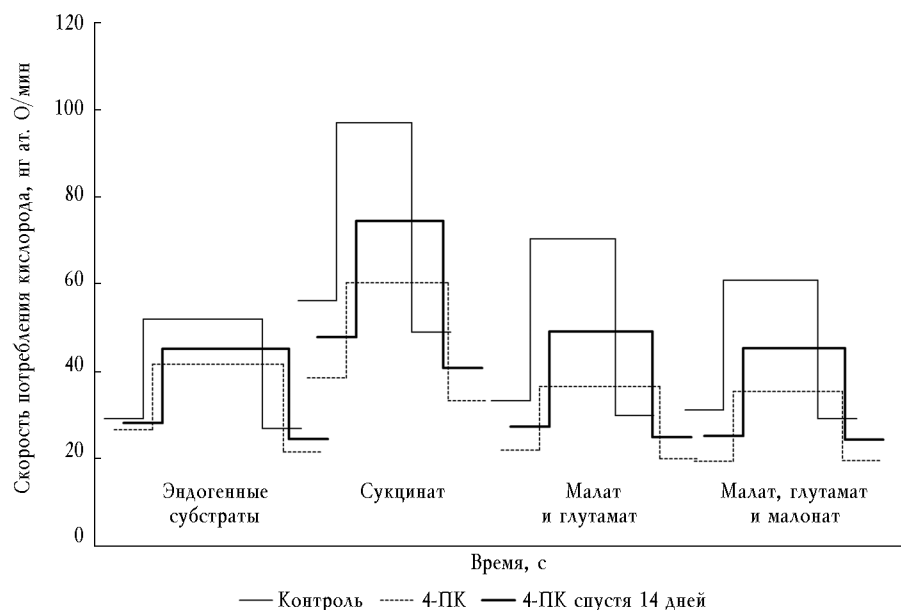


Рис. 1. Окислительное фосфорилирование в гомогенате печени крыс при интоксикации 4-пентеновой кислотой (4-ПК)

При окислении сукцината (1 ммоль) скорости дыхания в состояниях $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ становились ниже нормы на 15—23%. Время фосфорилирования добавленной АДФ увеличилось на 16%. Снижение скоростей дыхания в метаболических состояниях покоя и активного фосфорилирования при окислении НАД-зависимых субстратов на 18, 32 и 17% при-

водило к изменениям коэффициентов СД и ДК на 16 и 22% соответственно. Коэффициент АДФ/О повышался на 10%.

Ингибиторный анализ позволил выявить особенности функционального состояния митохондрий печени крыс в отдаленный период после интоксикации 4-пентеновой кислотой. Внесение малоната к митохондриям, окисляющим НАД-зави-

симые субстраты, способствовало увеличению коэффициента АДФ/О как в норме (на 8%), так и у крыс, исследованных через 14 дней после интоксикации 4-пентеновой кислотой (на 10%).

Если сравнить эти нарушения с изменениями, определенными сразу после окончания инъекций 4-пентеновой кислоты (рис. 1), то станет понятно, что, несмотря на продолжающееся ингибирование СДГ, показатели энергопродукции имели тенденцию к нормализации. В частности, усиливалась реакция системы энергопродукции на нагрузку. Это обусловлено уменьшением ингибирования СДГ накапливающегося в ходе окисления сукцината ОА. Как известно, ОА является одним из основных ингибиторов СДГ. Сродство ОА к СДГ значительно выше при низкой энергизации митохондрий и слабее — при высокой. Таким образом, в отдаленный срок после острой интоксикации 4-пентеновой кислотой повышается степень энергизации митохондрий.

При введении силимарина на фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой скорости окисления эндогенных субстратов в митохондриях печени, коэффициенты сопряженности СД и ДК достоверно не изменялись по сравнению с показателями, определенными в группе животных, оставленных без лечения (рис. 2). Коэффициент АДФ/О увеличивался на 10%. Полученные данные свидетельствуют о небольшой стабилизации метаболического контроля митохондрий с ростом сопряженности окислительного фосфорилирования в результате действия силимарина.

Добавление в среду инкубации сукцината в концентрации 1 ммоль нормализовало скорость дыхания митохондрий. В состояниях покоя, активного фосфорилирования и отдыха скорость дыхания возрастала на 22—29% по сравнению с показателями, определенными у животных, оставленных без лечения. Время фосфорилирования добавленной АДФ удлилось на 26% (рис. 2).

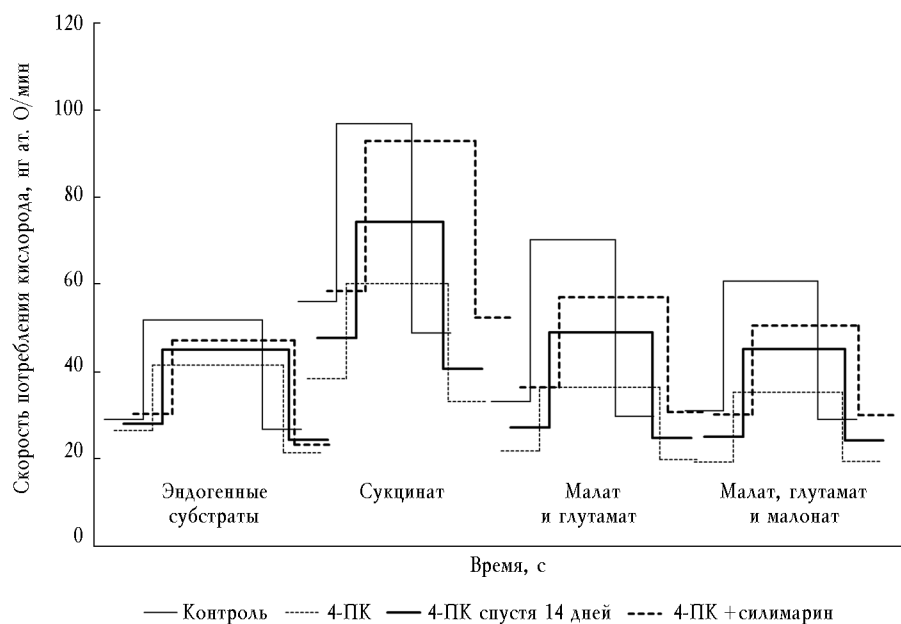


Рис. 2. Влияние силимарина на окислительное фосфорилирование в гомогенате печени крыс при интоксикации 4-пентеновой кислотой (4-ПК)

Необходимо отметить, что при сравнении скорости дыхания и коэффициента сопряженности в эксперименте с использованием в качестве субстрата окисления сукцината с аналогичными показателями при окислении эндогенных субстратов отмечался адекватный ответ митохондрий на усиление субстратной нагрузки. Коэффициент АДФ/О снижался с 2,61

при окислении эндогенных субстратов до 1,50 после внесения сукцината, скорости дыхания $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ увеличивались соответственно на 92, 97 и 125%. Подобные изменения были сопоставимы с нормой.

При использовании в качестве субстратов окисления малата и глутамата скорости дыхания $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ увеличи-

вались на 34, 16 и 24% соответственно по сравнению с показателями, определенными в группе животных, получавших только 4-пентеновую кислоту. После внесения малоната в среду инкубации митохондрий печени скорость дыхания в состояниях $V_{4п}$ и V_3 снижалась на 11—17%, скорость дыхания в состоянии $V_{4о}$ оставалась такой же, как в эксперименте без добавления ингибитора. Коэффициент сопряженности АДФ/О повышался на 16%.

Таким образом, силимарин изменял в сторону нормы энергопродукцию в митохондриях печени при интоксикации 4-пентеновой кислотой. Скорость дыхания в состоянии активного фосфорилирования оставалась уменьшенной как при окислении добавленного сукцината, так и при окислении НАД-зависимых субстратов.

При введении экстракта бадана на фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой окисление эндогенных субстратов в состоянии V_3 возрастало на 32%, скорости $V_{4п}$ и $V_{4о}$ были такими же, как при интоксикации 4-пентеновой кислотой. Коэффициент АДФ/О увеличивался на 12%. Коэффициен-

ты СД и ДК повышались соответственно на 32 и 23%. Время фосфорилирования добавленной АДФ снижалось на 25% (рис. 3).

После добавления в среду инкубации сукцината скорость дыхания в состоянии V_3 лишь на 9% была выше скорости, измеренной у интактных животных, скорости дыхания в состояниях покоя и отдыха нормализовались. Коэффициент АДФ/О снижался на 10%. При сравнении скорости дыхания, когда в качестве субстрата окисления использовали сукцинат, со скоростью дыхания при окислении эндогенных субстратов отмечался адекватный ответ митохондрий на усиление субстратной нагрузки.

У животных, получавших экстракт бадана, при окислении НАД-зависимых субстратов (малат и глутамат) ускорялось потребление кислорода в состояниях $V_{4п}$ и $V_{4о}$ на 20 и 55% соответственно, в состоянии V_3 — на 59% относительно скоростей, регистрируемых в поздние сроки интоксикации 4-пентеновой кислотой.

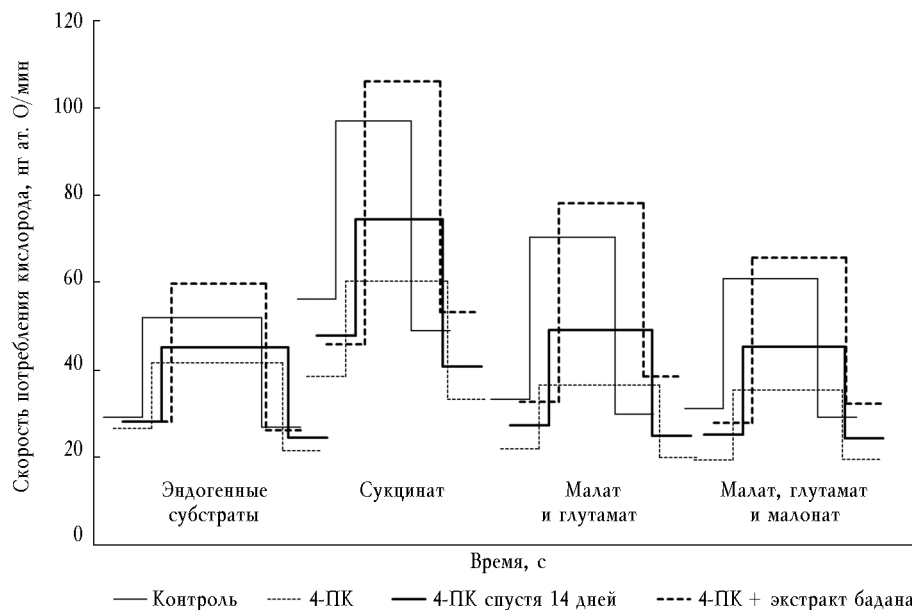


Рис. 3. Влияние экстракта бадана на окислительное фосфорилирование в гомогенате печени крыс при интоксикации 4-пентеновой кислотой (4-ПК)

Коэффициент СД повышался на 32%, коэффициент АДФ/О, напротив, уменьшался на 15%. Можно предположить достаточно эффективную работу НАД-зависимых дегидрогеназ.

Данное предположение подтверждалось ингибиторным анализом, проведенным в среде инкубации митохондрий печени крыс, получавших экстракт бадана. Добавление малоната к смеси НАД-зависимых субстратов приводило к снижению скорости V_3 на 16% по сравнению с показателем, опре-

деленным у животных, оставленных без лечения. Коэффициент АДФ/О незначительно повышался.

Терапия экстрактом бадана в большей степени улучшала функции митохондрий печени при интоксикации 4-пентеновой кислотой, чем лечение силимарином. Скорости дыхания в состоянии активного фосфорилирования на фоне введения экстракта бадана были выше нормы лишь на 9%

при окислении сукцината и на 11% при окислении НАД-зависимых субстратов.

Заключение

Полученные результаты исследования функционального состояния митохондрий печени крыс, отравленных 4-пентеновой кислотой, доказывают, что токсическое воздействие в течение 7 дней активирует преимущественно быстрый путь метаболизма субстратов — быстрый метаболический кластер митохондрий (см. рис. 1). Этот путь связан с усилением образования и окисления сукцината в реакциях переаминирования и сдерживается ингибированием СДГ. При дефекте β -окисления жирных кислот снижается активность НАД-зависимого пути окисления субстратов, что свидетельствует о резистентном состоянии системы энергопродукции. Развитие оксалоацетатного торможения активности СДГ играет важную приспособительную роль в сдерживании гиперактивного состояния митохондрий при нагрузке на систему энергопродукции [4, 7, 11, 21].

Функциональное состояние митохондрий печени крыс спустя 14 дней после окончания инъекций 4-пентеновой кислоты характеризуется угнетением как сукцинат- так и НАД-зависимого путей окисления субстратов. На это указывают уменьшение скоростей дыхания и увеличение времени фосфорилирования добавленной АДФ (см. рис. 1). Данный комплекс изменений становится пусковым механизмом цепи патологических реакций в митохондриях и клетке в целом: снижается величина мембранного потенциала митохондрий, развивается низкоэнергетический сдвиг, тормозится продукция гуанозинтрифосфата, что нарушает связь реакций быстрого метаболического кластера цикла трикарбоновых кислот с реакциями гликолиза в цитозоле [3, 4].

Показательны изменения, выявленные при терапевтическом воздействии флавоноидов экстракта бадана и силимарина при нарушениях энергопродукции, которые сопровождают дефект β -окисления жирных кислот. Экстракт бадана эффективнее силимарина способствует нормализации показателей энергопродукции в митохондриях печени крыс, перенесших воздействие 4-пентеновой кислоты. На фоне умеренной активности дегидрогеназ нормализуется сопряженность окисления и фосфорилирования. Наиболее четко это проявляется в ответ на повышенную субстратную нагрузку, что иллюстрирует высокую энергизованность митохондрий печени крыс, леченных экстрактом бадана толстолистного. При исследовании митохондриальной энерго-

продукции на фоне коррекции силимарином вызванных 4-пентеновой кислотой нарушений регистрируется увеличение сопряженности окислительного фосфорилирования в сочетании с небольшим снижением скорости дыхания во всех метаболических состояниях по сравнению с показателями у животных, получавших 4-пентеновую кислоту (см. рис. 2, 3).

Литература

1. Белобородова Э.И., Буркова В.Н., Венгеровский А.И. и др. Новое гепатопротективное средство эплир // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 1998. № 6—7. С. 291—292.
2. Гомеостазирование физиологических функций на уровне митохондрий / М.Н. Кондрашова, Е.В. Григоренко, А.М. Бабский, В.А. Хазанов // Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза. Новосибирск, 1987. С. 44—48.
3. Кондрашова М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. 1991. № 3. С. 388—405.
4. Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В. Проявление стресса на уровне митохондрий, их стимуляция гормонами и регуляция гидроаэрономии // Журн. общей биологии. 1985. Т. 46. № 4. С. 516—526.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1973. 243 с.
6. Лекарственные растения Сибири. Томск, 1995. 325 с.
7. Лукьянова Л.Д. Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1987. С. 153—161.
8. Матюшин Б.Н., Логинов А.С. Механизм детоксикации в печени при ее поражениях и гепатотропные препараты // IV Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство»: Тез. докл. М., 1997. С. 82.
9. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. 606 с.
10. Митохондрии в патологии / Под ред. М.Н. Кондрашовой, Ю.Г. Каминского, Е.И. Маевского. Пущино, 2001. 124 с.
11. Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав и использование. Л.: Наука, 1987. 328 с.
12. Саратиков А.С., Венгеровский А.И. Новые гепатопротекторы природного происхождения // Эксперим. и клинич. фармакология. 1995. № 1. С. 8—11.
13. Суслев Н.И. Патогенетическое обоснование психофармакологических эффектов препаратов природного происхождения: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 1995. 34 с.
14. Хазанов В.А. Прошлое, настоящее и будущее биоэнергетической фармакологии // Регуляторы энергетического обмена. Клин.-фармакол. аспекты / Под ред. В.А. Хазанова. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. С. 3—7.
15. Чучалин В.С., Дорофеева О.Е., Тараканова Е.В. Оптимальная лекарственная форма гепатозащитного средства растительного происхождения // Актуал. пробл. фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов. Томск, 1987. Вып. 3. С. 89—90.
16. Ben-Noun L. Use of aspirin for fever by Russian immigrant children // Harefuah. 1996. V. 130. № 12. P. 820—821.
17. Berk P.D., Stump D.D. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids // Mol. Cell. Biochem. 1999. V. 192. № 1. P. 17—31.
18. Eaton S., Bartlett K., Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial β -oxidation // Biochem. J. 1996. V. 320. № 4. P. 345—357.

Результаты исследований молодых ученых и студентов

19. Glasgow A., Chase H. Production of the features of Reye's syndrome in rats with 4-pentenoic acid // *Pediatr. Res.* 1975. V. 9. № 3. P. 133—138.
20. Kang E., Matsuo N., Nagai T. *et al.* Serum lipolytic activity in Reye's syndrome // *Clin. Chim. Acta.* 1989. V. 184. № 1. P. 107—114.
21. Maevsky E.I., Guzar I.B., Rosenfeld A.S. *et al.* Doesn't succinic acid mediate adrenaline stimulation in mitochondria // *EBEC Reports.* Lyon. 1982. V. 2. № 6. P. 589—590.
22. Olson J., Evers J., Holtzman D. Astrocyte volume regulation and ATP and phosphocreatine concentrations after exposure to salicylate, ammonium, and fatty acids // *Metab. Brain. Dis.* 1992. V. 7. № 4. P. 183—196.
23. Yamamoto M., Nakamura Y. Inhibition of beta-oxidation by 3-mercaptopropionic acid produces features of Reye's syndrome in perfused rat liver // *Gastroenterology.* 1994. V. 107. № 2. P. 517—524.

Поступила в редакцию 10.09.2007 г.