



З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, Э.Г. Телесманич

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕПАТОЦИТАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИЁМА СИМВАСТАТИНА

*Ростовский государственный медицинский университет,
кафедра общей и клинической биохимии №1,
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29 E-mail: belousovalena@mail.ru*

Цель: анализ состояния метаболических процессов в клетках печени экспериментальных животных после длительного приёма симвастатина.

Материалы и методы: исследование проводилось на 40 беспородных крысах-самцах, которые были разделены на две группы: 1-я группа (контрольная) – 20 интактных животных; 2-я группа (экспериментальная) – 20 животных, получавших в течение 3-х месяцев симвастатин (Zocor, 20 мг) по 1,5 мг один раз в сутки.

Результаты и выводы: на основании определения уровня метаболитов гликолиза, активности ферментов углеводно-энергетического обмена и антиоксидантной защиты установлено, что в основе изменения функционального состояния печени при длительном приёме статинов лежит развитие гипоксии, характеризующейся снижением скорости ключевых путей энергетического обмена и снижением мощности ферментативной антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: статины, гепатоциты, гепатотоксичность.

Z.I. Mikashinovich, E.S. Belousova, E.G. Telesmanich

METABOLIC CHANGES IN HEPATOCYTES OF EXPERIMENTAL ANIMALS AFTER PROLONGED TREATMENT WITH SIMVASTATIN

*Rostov State Medical University,
Department of Common and Clinical Biochemistry №1
29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: belousovalena@mail.ru*

Purpose: To analyse the metabolic changes in the liver cells of experimental animals after prolonged treatment with simvastatin.

Materials and Methods: Our experiment was taken on 40 rates (males) which were divided on two groups: 1-st (control) – 20 intact animals; 2-nd (experimental) – 20 animals who took simvastatin during 3 months (Zocor, 20 mg) on 1,5 mg once per day.

Results and Summary: Estimation the level of glycolysis metabolites, activity of enzymes of carbohydrates and energetic metabolism and antioxidant protection gave us possibility to established that one of the pathophysiological damage of liver functions after the prolonged treatment with statins was hypoxia which characterized by decreasing velocity of key pathways of energetic metabolism and decreasing of power of enzymatic antioxidant defense.

Key words: statins, hepatocytes, hepatotoxicity.



Введение

Исследования последних лет убедительно доказывают высокую эффективность статинов в комплексной терапии заболеваний, сопровождающихся развитием атеросклероза [1]. В то же время существует ряд нерешённых вопросов, связанных с наличием побочных эффектов при длительном приёме статинов. Так, в медицинской литературе описаны случаи повышения активности трансаминаз и уровня общего билирубина в сыворотке крови пациентов на фоне терапии статинами. Согласно данным литературы после отмены препарата показатели, как правило, возвращаются к исходным значениям [2].

Учитывая тот факт, что печень является основным органом-мишенью действия статинов и осуществляет метаболизм этих препаратов, представляется целесообразным определить характер изменения обменных процессов в гепатоцитах после длительного приёма статинов, что позволит существенно углубить представления о молекулярных механизмах изменения функционального состояния печени при длительной терапии статинами и послужит теоретической основой для разработки патогенетически обоснованных способов преодоления побочных эффектов.

В связи с этим, цель работы - анализ метаболических изменений в клетках печени экспериментальных животных после длительного приёма симвастатина.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 40 беспородных крысах-самцах в возрасте 12-14 месяцев (300-350 г). Животные содержались в стандартных клетках в условиях 12-часового режима освещения и свободного доступа к воде. Содержание животных соответствовало санитарным правилам, утверждённым МЗ СССР от 06.07.73 по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Животных кормили натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами, утверждёнными приказом №755 от 12.08.77 (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»). В процессе эксперимента животные были разделены на две группы: 1-я группа (контрольная) – 20 интактных животных; 2-я группа (экспериментальная) – 20 животных, получавших в течение 3-х месяцев симвастатин (Zocor, 20 мг) по 1,5 мг один раз в сутки. По истечении срока эксперимента животных забивали декапитацией.

Гомогенат печени готовили в соотношении 1г ткани:9мл охлаждённого физиологического раствора, центрифугировали при 6000 об/мин.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл-6-фДГ) определяли путём регистрации повышения уровня НАДФН+Н⁺, образующегося при окислении глюкозо-6-фосфата [3]. Способ определения активности супероксиддисмутазы (СОД) основан на способности фермента тормозить автоокисление адреналина

в щелочной среде при рН=10,2 [4]. Активность каталазы определяли по методу Корольюк М.А. и соавт. [5]. Активность глутаонредуктазы (ГР) определяли по скорости окисления НАДФН+Н [3]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по изменению содержания восстановленного глутатиона в пробах до и после инкубации с модельным субстратом [3]. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли методом EllmanG.L. [5].

Концентрацию пировиноградной (ПВК) кислоты определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином [6]. Концентрацию лактата определяли методом, описанным Даниловой Л.А. [3].

Для определения активности ферментов дыхательной цепи митохондрии клеток выделяли дифференциальным центрифугированием после гомогенизации на холоду в солевом растворе (0,15 М КСl и 10 мМтрис-НСl). Для удаления ядерной фракции гомогенаты центрифугировали 15 мин при 640 g. Фракцию митохондрий выделяли в течение 25 мин при 20 000 g с двукратным промыванием средой выделения. Суспензию митохондрий (400-500 мг белка в 0,2 мл суспензии) использовали для определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [7] и цитохромоксидазы (ЦХО) [8].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили согласно общепринятым методам с определением средней арифметической, ошибки средней с использованием программы STATISTICA версия 6.0. О достоверности отличий учитываемых показателей сравниваемых групп судили по величине t-критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты

Установлено, что в гепатоцитах животных экспериментальной группы достоверно повышено содержание ПВК на 227,77% ($p < 0,001$) и лактата на 238% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о формировании тканевой гипоксии (таб. 1). Накопление недоокисленных продуктов гликолиза способствует формированию ацидоза, что приводит к снижению активности ферментов и нарушению биоэнергетических процессов.

В пользу данного предположения свидетельствует снижение активности ферментов дыхательной цепи СДГ на 25,89% ($p < 0,05$) и ЦХО на 64,82% ($p < 0,001$) относительно контрольной группы.

В гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено статистически значимое снижение активности гл-6-фДГ на 35,71% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группы. В клетках печени активность этого фермента имеет ключевое значение, так как обеспечивает восстановление кофермента НАДФН+Н⁺, необходимого для детоксикации ксенобиотиков, биосинтеза жирных кислот и холестерина и регенерации окисленного глутатиона.



Таблица 1.

Содержание метаболитов гликолиза и активность ферментов углеводно-энергетического обмена в гепатоцитах животных экспериментальной группы

Показатели	Группа 1 (контрольная), n=20	Группа 2 (экспериментальная), n=20
ПВК, [мкмоль/мг белка]	0,36 ± 0,035	1,18 ± 0,065 p<0,001
Лактат, [мкмоль/мг белка]	1,06 ± 0,051	3,58 ± 0,258 p<0,001
Гл-6ф-ДГ, [мкмоль/мг белка]	0,028 ± 0,0011	0,018 ± 0,0003 p<0,001
СДГ [нмоль/мг белка]	3,816 ± 0,158	2,828 ± 0,246 p<0,05
ЦХО [нмоль/мг белка]	1,211 ± 0,059	0,426 ± 0,030 p<0,001

Примечание: p – достоверность относительно показателей контрольной группы.

При определении активности ферментов АОЗ выявлено синхронное снижение активности СОД на 58,18% (p<0,001) и каталазы на 68,89% (p<0,001) по сравнению с контрольной группой (таб. 2).

Таблица 2.

Активность ферментов антиоксидантной защиты в гепатоцитах животных экспериментальной группы

Показатели	Группа 1 (контрольная), n=20	Группа 2 (экспериментальная), n=20
СОД, [усл. ед./мг белка]	0,330 ± 0,032	0,138 ± 0,006 p<0,001
Каталаза, [мКат/мг белка]	3,568 ± 0,525	1,110 ± 0,119 p<0,001
GSH, [мкмоль/г Hb]	100,66 ± 14,293	57,40 ± 7,954 p<0,01
ГПО, [мкмоль/мг белка]	11,86 ± 0,392	7,05 ± 0,456 p<0,001
ГР, [мкмоль/мг белка]	0,158 ± 0,0045	0,014 ± 0,0003 p<0,001

Примечание: p – достоверность относительно показателей контрольной группы.

Снижение активности ферментов первой линии АОЗ способствует накоплению потенциально опасных активных форм кислорода – супероксидного анион-радикала и пероксида водорода и может привести к неконтролируемой активации перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Параллельно в гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено снижение активности ГПО на 40,56% (p<0,001), ГР на 91,14% (p<0,001) и концентрации GSH на 57,02% (p<0,001) относительно животных контрольной группы. Одной из причин снижения активности ГПО может быть ацидоз. С другой стороны, для обеспечения ферментативной активности ГПО необходим GSH, регенерацию которого обеспечивает ГР. Снижение активности ГР может быть обусловлено дефицитом НАДФН+Н⁺, возникающем на фоне сниженной активности гл-6-фДГ.

Обсуждение

В основе молекулярных перестроек в ответ на любое патологическое или экстремальное воздействие, как правило, лежит включение типовых механизмов нарушения клеточного гомеостаза [9]. Выявленное нами накопление недоокисленных продуктов гликолиза в гепатоцитах свидетельствует о наличии тканевой гипоксии. Гипоксический стимул оказывает сильнейшее воздействие на системы энергообеспечения клетки, приводящее к изменению соотношения узловых метаболитов, нарушению процессов тканевого дыхания и, как следствие, снижению скорости синтеза АТФ [10]. В условиях гипоксии необходимо повышение функциональной активности печени для утилизации продуктов анаэробного гликолиза, избыточ-



ное накопление которых приводит к нарушению кислотно-основного равновесия. Однако в нашем эксперименте выявлено уменьшение активности ключевых ферментов дыхательной цепи, что может указывать на снижение мощности дыхательной цепи. При несоответствии скорости синтеза АТФ потребностям клетки изменяется активность мембранных АТФ-аз, что приводит к нарушению ионного равновесия и развитию синдрома цитолиза.

Кроме того, нами выявлено снижение активности гл-6-ф-ДГ, что для клеток печени имеет принципиальное значение, так как коферменты НАДФН+Н⁺ широко используются в процессах детоксикации и восстановительных биосинтезах.

Развитие гипоксии сопровождается резким усилением свободно-радикального окисления, что требует повышения мощности систем антиоксидантной защиты. В нашем эксперименте выявлено снижение активности ключевых

ферментов антиоксидантной защиты, что может послужить причиной свободно-радикального поражения гепатоцитов. Согласно данным литературы снижение активности антиоксидантных ферментов может быть связано с их протеолизом, обусловленным накоплением лактата и пирувата [10].

Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод, что в основе изменения функционального состояния гепатоцитов при длительном приёме статинов лежит развитие гипоксии, характеризующееся накоплением узловых метаболитов гликолиза, снижением активности ферментов углеводно-энергетического обмена и антиоксидантной защиты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кабалава Ж.Д., Виллевалде С.В. Статины в первичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. // *Терапевтический архив*. – 2011. – Т. 83, №9. – С. 70-75.
2. Ito M.K. Dyslipidemia: management using optimal lipid-lowering therapy. // *Annales Pharmacotherapy*. – 2012. – Vol. 46, 10. – P. 1368-1381.
3. Справочник по лабораторным методам исследований. / Под ред. Даниловой. Л.А. - СПб.: Питер, 2003. - 736 с.
4. Гуревич В.С., Конторщикова К.Н., Шатилина Л.В. Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутазы. // *Лабораторное дело*. - 1990. - № 4. - С. 44-47.
5. Биохимические исследования слюны в клинической практике. / Под ред. проф. Микашинович З.И. – Ростов н/Д, 2004. – 80 с.
6. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. / Под ред. Камышникова В.С. – М.: «МЕДпресс-информ», 2004. – 920 с.
7. Nordmann I.N. Determination the activitidehydrogenasiqne des mitochondries a 1-acid-dichloride-2,3,5-triphenyl-tetrazolium. // *Bull. Sos. Chim. Biol.* – 1957. – Vol. 33. - P. 189-197.
8. Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий. // *Современные методы в биохимии*. – М.: Медицина, 1977. – С. 47-49.
9. Дизрегуляционная патология системы крови. / Под ред. Гольдберга Е.Д., Крыжановского Г.Н. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. - 432 с.
10. Гипоксия: адаптация, патогенез, клиника. / Под ред. Шевченко Ю.Л. – СПб., 2000. – 350 с.

ПОСТУПИЛА: 15.02.2013