

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА — РЕГУЛЯТОРА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА “ЯНТАРЬ-АНТИТОКС” НА СИСТЕМУ ЭНЕРГОПРОДУКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ β -ОКИСЛЕНИЯ

А. В. Черников¹, А. В. Крапивин², В. А. Хазанов³, Д. И. Кузьменко¹, В. Ю. Серебров¹, В. В. Удуг²

Изучали влияние препарата “Янтарь-антитокс” (действующее начало – янтарная кислота) на биоэнергетические процессы в митохондриях печени крыс в условиях экспериментального нарушения β -окисления, вызванного 4-пентеновой кислотой. Показано, что курсовое введение животным препарата “Янтарь-антитокс” способствует нормализации нарушений энергопродуцирующих процессов в печени благодаря стимуляции быстрого метаболического кластера митохондрий.

Ключевые слова: митохондрии печени, β -окисление жирных кислот, янтарная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Среди заболеваний печени, проявляющих в настоящее время тенденцию к росту, важное место занимают приобретенные и врожденные дефекты метаболизма жирных кислот, в том числе — нарушения β -окисления свободных жирных кислот (СЖК) [1, 2]. Для этих заболеваний характерны глубокие нарушения энергетического обмена в печени и высокая летальность [10]. Избыток СЖК блокирует пируватдегидрогеназный комплекс, снижает активность ферментов синтеза мочевины, разобщает окислительное фосфорилирование, инициирует липопероксидацию [11, 13]. Согласно современным представлениям, при нарушении биоэнергетических функций митохондрий корректирующий эффект могут оказывать некоторые экзогенно вводимые метаболиты цикла Кребса, в первую очередь, янтарная кислота (ЯК), которые в настоящее время объединены в группу соединений — регуляторов энергетического обмена (РЭО) [6, 7, 9]. В основе эффекта ЯК, которая проникает в клетку посредством сопряженного с G-белком рецептора GPR91 [12], лежит её способность поддерживать активность реакций быстрого метаболического кластера митохондрий. За счет высокой скорости преимущественного окисления ЯК может происходить купирование нарушений биоэнергетических процессов [6, 7, 9]. Целью работы явилось изучение влияния препарата “Янтарь-антитокс”

(действующее начало – янтарная кислота) из группы РЭО на биоэнергетические процессы в печени крыс в условиях экспериментального нарушения β -окисления.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 40 белых беспородных крысах-самцах массой 200 – 220 г. Содержание, питание, уход за крысами и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Приложения к приказу Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984. Методом случайной выборки животные были распределены на 4 группы. Группа 1 — контроль (интактные животные). У животных группы 2 моделировали нарушение β -окисления СЖК в печени путем ежедневного (в течение 7 дней) внутривентриального введения 0,5 % водного раствора 4-пентеновой кислоты (ICN, США) в дозе 20 мг/кг [14]. Крыс обследовали на следующие сутки. У животных группы 3 моделировали нарушение β -окисления СЖК как и в группе 2, оставляли без последующих воздействий на 14 суток и обследовали в этот срок наблюдения. У животных группы 4 воспроизводили нарушение β -окисления жирных кислот, как и в группе 2. С 8 по 14-е сутки крысам ежедневно вводили в желудок препарат РЭО “Янтарь-антитокс” (регистрационный номер ЛС-002722, компания “Томская фармацевтическая фабрика”) в дозе 50 мг/кг (в расчете на ЯК) в виде суспензии на 1 % крахмальной слизи. Животных обследовали на следующие сутки. Крыс декапитировали под эфирным наркозом и через воротную вену перфузировали печень *in situ* ледяным изотоническим раствором КСl, содержавшим 0,05 М трис-НСl буфер (рН 7,4). Гомогенат готовили с помощью гомогенизатора (стек-

¹ Кафедра биохимии и молекулярной биологии (зав. — проф. В. Ю. Серебров), ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2.

² Лаборатории физиологии, молекулярной и клинической фармакологии (рук. — проф. В. В. Удуг) Учреждение РАМН НИИ фармакологии СО РАМН, Томск.

³ Инновационные фармакологические разработки ИФАР, Томск.

Влияние регулятора энергетического обмена препарата “Янтарь-антитокс” на состояние энергопродукции печени крыс при интоксикации 4-пентеновой кислотой ($M \pm m$)

Исследуемые параметры	Условия эксперимента			
	Группа 1 (контроль)	Группа 2	Группа 3	Группа 4
<i>Окисление эндогенных субстратов</i>				
$V_{4п}$	17,75 ± 1,09	20,62 ± 0,77 ¹	21,82 ± 1,93 ¹	19,39 ± 0,81
V_3	37,20 ± 1,33	34,83 ± 2,37	31,57 ± 1,26 ¹	37,16 ± 0,92 ³
$V_{4о}$	13,63 ± 1,21	23,57 ± 0,57 ¹	14,73 ± 0,65 ²	24,26 ± 0,75 ^{1,3}
СД	2,08 ± 0,14	1,68 ± 0,08 ¹	1,48 ± 0,09 ^{1,2}	1,92 ± 0,04 ^{2,3}
ДК	2,79 ± 0,15	1,47 ± 0,06 ¹	2,25 ± 0,18 ^{1,2}	1,53 ± 0,05 ^{1,3}
Δt	1,32 ± 0,12	1,75 ± 0,22 ¹	1,43 ± 0,06	1,63 ± 0,04 ^{1,3}
АДФ/О	2,46 ± 0,15	2,28 ± 0,10	2,52 ± 0,17	2,13 ± 0,07 ^{2,3}
<i>Окисление экзогенной ЯК (1 мМ)</i>				
$V_{4п}$	49,23 ± 2,43	69,87 ± 7,43 ¹	52,47 ± 2,39 ²	82,32 ± 1,47 ¹⁻³
V_3	70,73 ± 1,53	104,73 ± 8,10 ¹	89,47 ± 6,89 ^{1,2}	117,57 ± 2,17 ¹⁻³
$V_{4о}$	43,85 ± 1,19	63,28 ± 1,87 ¹	51,78 ± 3,68 ^{1,2}	65,91 ± 3,00 ^{1,3}
СД	1,45 ± 0,05	1,51 ± 0,04	1,69 ± 0,06 ^{1,2}	1,43 ± 0,03 ³
ДК	1,61 ± 0,03	1,65 ± 0,10	1,73 ± 0,02 ²	1,79 ± 0,05 ¹
Δt	1,14 ± 0,10	0,63 ± 0,06 ¹	0,56 ± 0,06 ¹	1,03 ± 0,08 ^{2,3}
АДФ/О	1,44 ± 0,14	1,91 ± 0,20 ¹	2,34 ± 0,11 ^{1,2}	1,03 ± 0,02 ¹⁻³
<i>Окисление экзогенной ЯК (5 мМ)</i>				
$V_{4п}$	56,24 ± 3,34	95,63 ± 5,40 ¹	58,27 ± 1,66	69,83 ± 1,32 ¹⁻³
V_3	105,28 ± 4,96	140,80 ± 2,53 ¹	101,70 ± 3,00	123,77 ± 1,69 ¹⁻³
$V_{4о}$	51,87 ± 3,66	91,70 ± 0,84 ¹	59,17 ± 1,97 ^{1,2}	71,27 ± 1,10 ¹⁻³
СД	1,83 ± 0,16	1,48 ± 0,06 ¹	1,74 ± 0,01 ^{1,2}	1,77 ± 0,01 ²
ДК	1,98 ± 0,14	1,53 ± 0,04 ¹	1,72 ± 0,03 ^{1,2}	1,73 ± 0,01 ^{1,2}
Δt	0,59 ± 0,08	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,96 ± 0,02 ¹⁻³
АДФ/О	1,96 ± 0,04	1,82 ± 0,04 ¹	2,29 ± 0,08 ^{1,2}	1,09 ± 0,04 ¹⁻³
<i>Окисление смеси малата и глутамата</i>				
$V_{4п}$	35,56 ± 0,83	45,40 ± 2,89 ¹	31,80 ± 2,51 ²	36,49 ± 2,11 ²
V_3	60,83 ± 1,94	77,43 ± 4,18 ¹	54,37 ± 1,87 ^{1,2}	66,32 ± 4,82 ^{2,3}
$V_{4о}$	29,96 ± 0,55	40,70 ± 1,06 ¹	29,93 ± 1,52 ²	36,03 ± 3,25 ^{2,3}
СД	1,71 ± 0,03	1,71 ± 0,02	1,74 ± 0,08	1,81 ± 0,03 ^{1,2}
ДК	2,03 ± 0,10	1,91 ± 0,11	1,82 ± 0,05 ¹	1,85 ± 0,04 ¹
Δt	0,81 ± 0,06	0,55 ± 0,02 ¹	0,82 ± 0,02 ²	1,22 ± 0,06 ¹⁻³
АДФ/О	2,38 ± 0,10	2,46 ± 0,10	2,54 ± 0,17	1,83 ± 0,07 ¹⁻³
<i>Окисление смеси малата и глутамата в присутствии малоната</i>				
$V_{4п}$	34,10 ± 1,31	50,87 ± 2,43 ¹	32,00 ± 1,19 ²	33,02 ± 1,01 ²
V_3	58,13 ± 3,56	83,50 ± 4,02 ¹	53,23 ± 1,78 ²	68,45 ± 1,40 ¹⁻³
$V_{4о}$	23,91 ± 2,59	45,53 ± 1,41 ¹	25,93 ± 1,66 ²	37,37 ± 1,77 ¹⁻³
СД	1,70 ± 0,04	1,64 ± 0,04	1,66 ± 0,01	2,08 ± 0,02 ¹⁻³
ДК	2,50 ± 0,14	1,85 ± 0,14 ¹	2,07 ± 0,06 ^{1,2}	1,84 ± 0,05 ^{1,3}
Δt	0,78 ± 0,01	0,53 ± 0,02 ¹	0,69 ± 0,01 ^{1,2}	1,20 ± 0,05 ¹⁻³
АДФ/О	2,82 ± 0,15	2,58 ± 0,02 ¹	3,08 ± 0,11 ²	1,44 ± 0,08 ¹⁻³
<i>Окисление смеси малата и глутамата в присутствии АОА</i>				
$V_{4п}$	33,17 ± 0,45	50,70 ± 2,26 ¹	36,07 ± 1,65 ^{1,2}	37,69 ± 1,14 ^{1,2}
V_3	40,49 ± 0,86	65,53 ± 1,65 ¹	51,77 ± 1,30 ^{1,2}	57,01 ± 0,65 ¹⁻³
$V_{4о}$	27,90 ± 0,38	41,60 ± 0,30 ¹	28,00 ± 0,73 ²	34,13 ± 0,94 ¹⁻³
СД	1,22 ± 0,01	1,30 ± 0,03 ¹	1,44 ± 0,06 ^{1,2}	1,52 ± 0,03 ¹⁻³
ДК	1,45 ± 0,01	1,57 ± 0,03 ¹	1,85 ± 0,01 ^{1,2}	1,67 ± 0,03 ¹⁻³
Δt	2,23 ± 0,06	0,57 ± 0,06 ¹	0,79 ± 0,07 ^{1,2}	2,25 ± 0,08 ^{2,3}
АДФ/О	2,39 ± 0,05	2,87 ± 0,13 ¹	2,80 ± 0,23 ¹	1,02 ± 0,06 ¹⁻³

Примечание. Статистически значимые изменения ($p < 0,05$): 1 — по отношению к контролю (группа 1); 2 — по отношению к группе 2; 3 — по отношению к группе 3.

Состав среды инкубации гомогената: KCl — 125 мМ; MgCl₂ — 5 мМ; K₂HPO₄ — 5 мМ; трис-HCl буфер — 50 мМ (pH 7,4). Субстраты окисления: янтарная кислота (ЯК) — 1 и 5 мМ, а также смесь глутамат + малат (по 3 мМ). В качестве ингибитора аминотрансфераз использовали аминоксинацетат (АОА) 2 мМ, ингибитора (СДГ) — малонат 2 мМ. Указаны конечные концентрации в термостатируемой ($t = 26^\circ\text{C}$) полярографической ячейке объемом 1,2 мл. Скорости дыхания представлены в нг-атом кислорода в минуту на 1 мг белка.

ло — тефлон) в охлажденной до 2 °С среде, содержащей 0,125 М КС1; 0,05 М трис-НС1 буфер (рН 7,2) и 0,02 М ЭДТА. Для дальнейшей работы использовали гомогенат печени (концентрация белка 1,5 – 2 мг/мл), содержащий митохондрии. Оценка функционального состояния митохондрий в гомогенате имеет преимущества, обусловленные большей сохранностью ассоциатов органелл с их метаболическим окружением [15]. Функциональное состояние митохондрий исследовали полярографическим методом с помощью анализатора Эксперт-001-4 (ООО “Эконис”, Москва) и электрода Кларка. Состав среды инкубации гомогената указан в примечании к таблице. Регистрировали скорость дыхания митохондрий до ($V_{4п}$), после ($V_{4о}$) и в процессе фосфорилирования добавленной АДФ (V_3), которую вносили в ячейку в количестве 200 мкмоль. Рассчитывали коэффициенты: стимуляции дыхания ($СД = V_3/V_{4п}$), дыхательного контроля ($ДК = V_3/V_{4о}$) и сопряженности окислительного фосфорилирования (АДФ/О), а также время фосфорилирования добавки АДФ (Δt , сек) [3]. Белок в гомогенате определяли биуретовым методом. Данные обрабатывали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни с использованием пакета Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что при нарушении β -окисления СЖК препарат “Янтарь-антитокс” (группа 4) способствовал значительному увеличению скорости дыхания митохондрий печени крыс во всех метаболических состояниях ($V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$) при окислении как эндогенных, так и экзогенных субстратов (ЯК 1 и 5 мМ; пируват + малат). Более выраженные изменения регистрировались при окислении экзогенной ЯК в концентрации, близкой к физиологической (1 мМ). При этом $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ возрастали соответственно в 4,2; 3,2 и 2,7 раза у животных, получавших “Янтарь-антитокс” (группа 4), тогда как у крыс, оставленных без коррекции в течение 14 дней (группа 3), реакция митохондрий оказалась менее выраженной — $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ повышались соответственно в 2,4; 2,8 и 3,2 раза. Коэффициент СД снижался на 26 %, коэффициент ДК увеличивался на 17 % при сокращении Δt на 37 %. Коэффициент АДФ/О снижался с 2,13 до 1,03. Реакция митохондрий крыс группы 4 на внесение ЯК в большей концентрации (5 мМ) подтвердила отмеченную выше тенденцию. В группе 4 при окислении митохондриями малата и глутамата отмечался рост скоростей дыхания $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ в 1,9, 1,8 и 1,5 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями, определенными при окислении эндогенных субстратов. Δt и коэффициент АДФ/О снижались соответственно на 25 и 14 %. Сравнивая показатели состояния системы энергопродукции у крыс, получавших “Янтарь-антитокс” (группа 4), и животных, оставленных без коррекции (груп-

пы 2 и 3), следует отметить снижение в этих группах $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ на 15, 22 и 20 % соответственно при сравнимой степени энергизации митохондрий. В присутствии малоната — ингибитора сукцинатдегидрогеназы (СДГ) — не наблюдалось изменений кинетических параметров окисления смеси малата и глутамата митохондриями крыс группы 4, однако коэффициент АДФ/О снижался на 21 %, что свидетельствует о преобладающей роли СДГ в системе энергообеспечения. В присутствии ингибитора аминотрансфераз — АОА, митохондрии печени крыс группы 4, окисляющие НАД-зависимые субстраты, имели сниженную на 14 % скорость дыхания только в состоянии активного фосфорилирования (V_3). Коэффициенты СД, ДК и АДФ/О оказались ниже на 14, 10 и 44 % при увеличении Δt в 1,8 раза по сравнению с таковыми в группе 4 без АОА. В результате курсового введения “Янтарь-антитокс” (группа 4) для состояния системы энергопродукции печени было характерно увеличение скоростей дыхания по сравнению с контролем. При окислении ЯК $V_{4п}$, V_3 и $V_{4о}$ возрастали на 67, 66 и 50 % соответственно. Коэффициенты СД и ДК при этом значимо не изменялись, хотя коэффициент АДФ/О уменьшался на 30 %. При окислении смеси малат + глутамат скорости дыхания становились сопоставимыми с таковыми в контроле. Коэффициенты СД и ДК также нормализовались, но коэффициент АДФ/О снижался относительно контроля на 24 %.

Результаты свидетельствуют о том, что при дефекте β -окисления СЖК сдвиги в системе энергопродукции печени выражаются в гиперактивном окислении ЯК, которое недостаточно эффективно сдерживается естественными механизмами регуляции СДГ. В результате возникает избыточное образование перекисей, повреждающих мембраны [8, 13]. Оксалоацетатное торможение СДГ является естественным механизмом предупреждения чрезмерной активности системы окислительного фосфорилирования. Такое состояние митохондриального аппарата формируется в ответ на различные воздействия (стресс, избыточные физические нагрузки, гипоксия, ишемия, интоксикации, судорожные состояния) и оценивается как напряженное [6, 7]. Состояние митохондрий печени крыс группы 3 характеризуется угнетением как сукцинат-, так и НАД-зависимого путей окисления. Эти изменения становятся пусковым механизмом цепи патологических сдвигов в митохондриях: снижается трансмембранный потенциал, развивается низкоэнергетический сдвиг, что нарушает связь реакций быстрого метаболического кластера цикла Кребса с реакциями гликолиза в цитозоле [4, 5].

Действие препарата “Янтарь-антитокс” (группа 4) характеризуется стимулированием быстрого метаболического кластера и активацией СДГ благодаря поступлению в митохондрии экзогенной ЯК. Активация быстрого метаболического кластера за счет высокой скорости фосфорилирующего дыхания при преимуще-

ственном окислении ЯК дает существенный прирост выхода АТФ [4, 5].

ВЫВОДЫ

1. В условиях нарушения β -окисления жирных кислот, вызванного введением 4-пентеновой кислоты, в митохондриях печени крыс формируется гиперактивное окисление янтарной кислоты.

2. Курсовое введение животным препарата “Янтарь-антитокс” способствует нормализации энергопродуцирующих процессов в печени благодаря стимуляции быстрого метаболического кластера в митохондриях при сохранении механизма предупреждения чрезмерной активности системы окислительного фосфорилирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. П. Загоскин, Е. М. Хватова, *Вопр. мед. химии*, № 4, 321 – 326 (2002).
2. *Клиническая гастроэнтерология*, П. Я. Григорьев, А. В. Яковенко (ред.), Москва (2001).
3. М. Н. Кондрашова, Л. В. Николаев, В. В. Чистяков, Л. П. Калиниченко, *Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом*, М (1973), сс. 50 – 59.
4. М. Н. Кондрашова, *Биофизика*, вып. 3, 455 – 458 (1989).
5. М. Н. Кондрашова, *Биохимия*, № 3, 388 – 405 (1991).
6. М. Н. Кондрашова, *Регуляторы энергетического обмена. Материалы симпозиума*, М., Томск (2002), сс. 16 – 26.
7. М. Н. Кондрашова, *Вопр. биол. и фармацевт. химии*, № 1, 7 – 12 (2002).
8. *Митохондрии в патологии*, М. Н. Кондрашова, Ю. Г. Каминский, Е. И. Маевский (ред.), Пушино (2001).
9. Н. Б. Смирнова, В. А. Хазанов, *Регуляторы энергетического обмена. Клинико-фармакологические аспекты*, Томск (2004), сс. 109 – 113.
10. К. Badizadegan, A. Perez-Atayde, *Hepatology*, **26**(2), 365 – 373 (1997).
11. P. Bernardi, D. Penzo, L. Wojtczak, *Vitam. Horm.*, **65**, 97 – 126 (2002).
12. P. Correa, E. A. Kruglov, M. Thompson, et al., *J Hepatol.*, **47**(2), 262 – 269 (2007).
13. N. I. Fedotcheva, A. P. Sokolov, M. N. Kondrashova, *Free Radical Biol. Med.*, **41**, 56 – 64 (2006).
14. A. Glasgow, H. Chase, *Pediatr. Res.*, **9**(3), 133 – 138 (1975).
15. М. Kondrashova, M. Zakharchenko, N. Khunderyakova, *Internat. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 2036 – 2050 (2009).

Поступила 09.11.11

EFFECT OF THE ENERGY METABOLISM REGULATOR YANTAR-ANTITOX ON THE SYSTEM OF ENERGY PRODUCTION IN RAT LIVER DURING EXPERIMENTAL PATHOLOGY OF BETA-OXIDATION

A. V. Chernikov¹, A. V. Krapivin², V. A. Khazanov³, D. I. Kuz'menko¹, V. Yu. Serebrov¹, and V. V. Udut²

¹ Siberian State Medical University, Moskovskii trakt 2, Tomsk, 634050, Russia

² Institute of Pharmacology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, prosp. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia

³ Innovative Pharmacological Research (IPhAR) Company, prosp. Akademicheskii 8/8, Tomsk, 634055, Russia

Effects of the Yantar-Aantitox (succinic acid preparation) preparation on bioenergetic processes in mitochondria of rat liver during the experimental disorders of beta oxidation process evoked by 4-pentenoic acid have been studied. It is established that the course administration of Yantar-Antitox leads to normalization of disturbed bioenergetic processes in rat liver, which is due to stimulation of the rapid metabolic cluster of mitochondria.

Key words: liver mitochondria, beta-oxidation of fatty acids, succinic acid