Влияние янтаря-антитокса и силимарина на окислительное фосфорилирование и перекисное окисление липидов в печени крыс при экспериментальном сахарном диабете

Эскина К.А.¹, Васильев К.Ю.²

The influence of anberry-antitox and silymarin on oxidative phosphorylation and lipid peroxide oxidation in rat's liver in the experimental diabetes mellitus

Eskina K.A., Vasilyev K.Yu.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск

© Эскина К.А., Васильев К.Ю.

Модель сахарного диабета, вызванная введением крысам стрептозотоцина в дозе 65 мг на 1 кг массы тела сопровождается нарушением функционирования митохондрий (гиперактивацией дыхания и разобщением окислительного фосфорилирования) и усилением липидной пероксидации в печени. На 14-е сут после интоксикации стрептозотоцином частично восстанавливается активность дыхания митохондрий, однако не устраняется разобщение окислительного фосфорилирования. Силимарин в дозе 70 мг на 1 кг массы тела животного в этих условиях нормализует процессы липидной пероксидации, однако не влияет на биоэнергетику печени. Терапия янтарем-антитоксом в дозе 50 мг на 1 кг массы тела нормализует процессы окислительного фосфорилирования митохондрий и подавляет липидную пероксидацию в печени крыс на 14-е сут после интоксикации стрептозотоцином.

Ключевые слова: сахарный диабет, митохондрии печени, стрептозотоцин, силимарин, янтарь-антитокс.

The model of diabetes mellitus caused by intraperitoneal injection of streptozotocin in dose of 65 mg/kg in experiment on rats was accompanied by alternation of mitochondrial functions (hyperactivation of respiration and disconnection of oxidative phosphorylation) and lipid peroxidation in the liver. Partial restoration of mitochondrial respiration activity began on the 14th day after streptozocin intoxication, but disconnection of oxidative phosphorylation was not removed. Silymarin in a dose of 70 mg/kg normalizes process of lipid peroxidation but does not influence on bioenergy in the liver. Therapy with amber-antitox in a dose of 50 mg/kg normalizes oxidative phosphorylation in mitochondria and suppresses lipid peroxidation in liver of rats on the 14th day after intoxication caused by streptozocin.

Key words: diabetes mellitus, mitochondria of the liver, streptozotocin, silymarin, amber-antitox.

УДК 616.379–008.64.08:591.436:577.3

Введение

Сахарный диабет является одним из наиболее распространенных эндокринных заболеваний и представляет важную медико-социальную проблему. По данным ВОЗ, ежегодно число больных сахарным диабетом в мире увеличивается на 5—7%, а каждые 12—15 лет удваивается. Меры по лечению и профилактике данного заболевания входят в приоритетные направления медицинских исследований в Европе, утвержденные Европарламентом в 2001 г. на ближайшие 10 лет

[4].

В патогенезе диабета основное значение имеют абсолютный и относительный дефицит инсулина, а также повреждение митохондрий не только островков поджелудочной железы, но и всех тканей вследствие недостатка глюкозы. Повышение концентрации глюкозы в крови и в инсулинонезависимых тканях (эндотелий сосудов, нейроны) при сахарном диабете становится причиной постоянной генерации свободных радикалов, которые повреждают липидные и белковые компоненты клеток, способствуют образованию и накоп-

лению высокотоксичных липоперекисных соединений, усиливающих процессы дестабилизации клеточных мембран [9]. При этом снижается антиоксидантная защита клеток, обеспечивающая постоянство антирадикального и антиперекисного гомеостаза [10]. В митохондриях нарушается функционирование цикла трикарбоновых кислот, происходит частичное разобщение окисления и фосфорилирования. Кроме того, возрастает вклад гликолиза в образование АТФ. Прогрессирующий дефицит энергии нарушает структурную целостность и функциональную активность жизненно важных органов и систем.

Основными лекарственными средствами, воздействующими на метаболизм и функциональное состояние печени и поджелудочной железы, являются гепатопротективные препараты. Среди гепатопротекторов преобладают препараты, содержащие естественные или полусинтетические флавоноиды расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L. семейства *Asteraceae*). Главным действующим компонентом расторопши является силимарин (легалон, карсил) [1]. Силимарин представляет собой сумму флаволигнанов с фенилхромановой структурой — силибин (два изомера), силидианин и силикристин. Одним из основных механизмов терапевтического действия силимарина является мембранотропный. Силимарин, вступая в биохимическое взаимодействие с мембранами клеток печени, нормализует в них количество фосфолипидов — фосфатидилинозитола и фосфатидилэтаноламина. Это повышает резистентность мембран и уменьшает потерю составных веществ клетки. Другой путь стабилизации мембран силимарином — ингибирование фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов и накопление циклического аденозинмонофосфата в гепатоцитах [3].

Потенциальную гепатопротекторную активность при заболеваниях печени могут проявлять регуляторы энергетического обмена. Экспериментально доказано улучшение функционального состояния печени и ослабление гепатотоксического влияния ряда лекарственных и токсичных соединений под влиянием регуляторов энергетического обмена на основе янтарной кислоты [5]. В механизме их гепатопротекторного эффекта главную роль играет поддержание активности реакций быстрого метаболического кластера митохондрий [7].

Цель работы — исследовать возможность коррекции нарушений функционирования митохондрий и перекисного окисления липидов в печени с помощью гепатопротектора силимарина и регулятора энергетического обмена янтаря-антитокса при экспериментальном сахарном диабете, вызванном стрептозотоцином.

Материал и методы

Эксперименты проводили в зимне-весенний период на 60 беспородных крысах-самцах массой 200—220 г. Животные находились в стандартных условиях вивария, в параллельно исследуемых группах (по 10—12 крыс), имели одинаковую массу тела, контролируемую ежедневным взвешиванием для коррекции вводимой дозы препаратов. Все манипуляции (взвешивание, введение препаратов, декапитацию) осуществляли утром с 9⁰⁰ до 12⁰⁰ с целью исключения влияния суточных колебаний метаболизма.

Животные получали однократные внутрибрюшинные инъекции стрептозотоцина в дозе 65 мг на 1 кг массы тела. Введение стрептозотоцина позволяет моделировать в эксперименте сахарный диабет, в том числе отдельные стадии патологического процесса, что подтверждается результатами морфологических и биохимических исследований [8]. Со второго дня после интоксикации крысам вводили в желудок ежедневно силимарин (70 мг на 1 кг массы тела) или янтарь-антитокс (50 мг на 1 кг массы тела в пересчете на содержание янтарной кислоты) в виде суспензии на 1%-й крахмальной слизи. Продолжительность фармакотерапии составила 14 дней.

Через сутки после последнего введения препаратов крыс декапитировали под эфирным наркозом. Для исследований использовали гомогенат печени. Функциональное состояние митохондрий печени оценивали полярографическим методом с помощью закрытого электрода Кларка лабораторного изготовления по скорости потребления кислорода в различных метаболических состояниях по Б. Чансу [2] с учетом градации метаболических состояний, предложенных М.Н. Кондрашовой [11]. Отдельно рассматривались состояния 4 до внесения АДФ и после окончания цикла фосфорилирования: состояние 4 покоя (4п) и состояние 4 отдыха (4о) соответственно.

Среда инкубации содержала: $1,2 \cdot 10^{-1}$ моль KCl, $1 \cdot 10^{-3}$ моль Нерес-буфер, $2 \cdot 10^{-5}$ моль этилендиаминтетраацетата, $2 \cdot 10^{-3}$ моль KH_2PO_4 (pH = 7,2; $t = 26^\circ\text{C}$). В

качестве субстратов окисления использовали янтарную кислоту (ЯК) в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль, смесь НАД-зависимых субстратов малата и глутамата в концентрации по $3 \cdot 10^{-3}$ моль. В работе использован ингибитор аминотрансфераз аминоксиацетат (АОА) $5 \cdot 10^{-4}$ моль, а также ингибитор сукцинатдегидрогеназы малонат $2 \cdot 10^{-3}$ моль. Во всех случаях указаны конечные концентрации в среде инкубации. Регистрировали скорость дыхания митохондрий до ($V_{4п}$), после ($V_{4о}$) и во время цикла фосфорилирования добавленной до концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль АДФ (V_3). Во всех измерениях абсолютные значения скоростей потребления кислорода выражены в нанограммах атомарного кислорода в минуту на 1 мг белка митохондрий ($\text{нг } O_{\text{атом}} / (\text{мин} \cdot \text{мг белка})$). Для оценки энергетического статуса использовали коэффициенты стимуляции дыхания $СД = V_3/V_{4п}$, дыхательного контроля $ДК = V_3/V_{4о}$ и

Результаты исследований молодых ученых и студентов

сопряженности окислительного фосфорилирования АДФ/О.

Активность липопероксидации оценивали по скорости образования спонтанного и аскорбатзависимого малонового диальдегида (МДА), содержанию диеновых конъюгатов (КД) и оснований Шиффа (ОШ). Результаты обрабатывали методом парных сравнений по непараметрическому критерию Вилкоксона—Манна—Уитни, вероятность ошибочного вывода не превышала 5% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При интоксикации стрептозотоцином митохондрии печени крыс характеризовались повышением скоростей дыхания до, во время и после фосфорилирования АДФ при окислении ЯК по отношению к показателям нормы (рисунок). При этом снижались коэффициенты СД и ДК, а также время фосфорилирования добавленной АДФ.

Влияние силимарина и янтаря-антиоткса на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс при интоксикации стрептозотонином. Группы экспериментальных животных: 1 — интактные животные; 2 — острая интоксикация стрептозотонином; 3 — интоксикация стрептозотонином спустя 14 сут; 4 — терапия силимарином в течение 14 сут после введения стрептозотонина; 5 — терапия янтарем-антиотксом в течение 14 сут после введения стрептозотонина. Различия достоверны при $p < 0,05$: * — по сравнению с показателем интактных животных; ! — по сравнению с показателем животных, получавших стрептозотонин; #, ^ — по сравнению с показателями животных через 14 дней после введения стрептозотонина. Полученные данные указывают на активацию сукцинатзависимой энергопродукции в митохондриях печени крыс при токсическом воздействии стрептозотонина.

При окислении НАД-зависимых субстратов после введения животным стрептозотонина увеличивались скорости дыхания митохондрий в состояниях 4п, 3 и 4о при сокращении времени фосфорилирования АДФ. Коэффициент ДК уменьшался, а коэффициент АДФ/О становился больше, чем в норме (рисунок). Ингибиторный анализ НАД-зависимого дыхания митохондрий печени с применением конкурентного ингибитора СДГ малоната выявил увеличение параметров избира-

тельного НАД-зависимого дыхания и вклада эндогенной ЯК в энергопродукцию, что подтверждает гиперактивное состояние митохондрий. Внесение АОА в среду инкубации митохондрий, окисляющих НАД-зависимые субстраты, продемонстрировало увеличение по сравнению с нормой скорости дыхания органелл и уменьшение коэффициента СД (см. рисунок) на фоне замедления фосфорилирования АДФ. При этом повышался вклад реакций переаминирования в продукцию эндогенной ЯК. Полученные данные свидетельствуют о доминировании быстрого метаболического кластера митохондрий [6] в энергопродукции при интоксикации стрептозотонином.

Характер выявленных изменений в системе энергопродукции печени указывает на развитие гиперкомпенсированного низкоэнергетического сдвига, связанного с повышением проницаемости мембран митохондрий для H^+ и разобщением окислительного фосфорилирования [67]. Очевидно, изменения обусловлены предшествующей этим процессам генерацией активных форм кислорода под действием стрептозотина. Действительно, об активации свободнорадикальных процессов при интоксикации стрептозотином свидетельствует рост содержания первичных и вторичных продуктов липопероксидации — КД, ОШ, МДА при спонтанном и при аскорбатзависимом перекисном окислении липидов (ПОЛ) в печени крыс по сравнению с показателями у интактных животных (таблица).

Через 14 дней после введения стрептозотина снижались скорости дыхания митохондрий при окис-

лении ЯК в сочетании с увеличением коэффициента АДФ/О по сравнению с показателями группы животных с острой интоксикацией (см. рисунок). Можно предположить, что у этой группы животных частично нормализуется функциональное состояние митохондрий печени, хотя сопряженность окислительного фосфорилирования не достигает нормальных значений.

При окислении НАД-зависимых субстратов митохондриями печени животных на 14-й день после введения стрептозотина скорости контролируемого дыхания V_{4n} и V_{4o} снижались относительно показателей при острой интоксикации, коэффициент ДК повышался (см. рисунок). Это указывает на наличие репаративных процессов в митохондриях и рост вклада НАД-зависимого окисления в продукцию АТФ. Интенсивность липидной пероксидации в печени сохранялась такой же, как на 2-е сут после интоксикации (см. таблицу).

Влияние силимарина и янтаря-антиокса на показатели перекисного окисления липидов в печени крыс при интоксикации стрептозотином ($M \pm m$)

Группа экспериментальных животных	Показатель			
	КД	ОШ	МДА спонтанное	МДА аскорбатзависимое
Интактные животные	2,63 $\pm$ 0,21	4,12 $\pm$ 0,21	1,02 $\pm$ 0,05	1,21 $\pm$ 0,09
Стрептозотин	6,31 $\pm$ 0,28 ¹⁾	6,24 $\pm$ 0,18 ¹⁾	2,31 $\pm$ 0,12 ¹⁾	2,71 $\pm$ 0,15 ¹⁾
Стрептозотин, спустя 14 сут	7,14 $\pm$ 0,23 ¹⁾	6,93 $\pm$ 0,14 ¹⁾	2,64 $\pm$ 0,14 ¹⁾	2,94 $\pm$ 0,12 ¹⁾
Силимарин + стрептозотин	3,80 $\pm$ 0,19 ^{2, 3)}	4,43 $\pm$ 0,20 ^{2, 3)}	1,42 $\pm$ 0,09 ^{2, 3)}	1,63 $\pm$ 0,11 ^{2, 3)}
Янтарь-антиокс + стрептозотин	4,11 $\pm$ 0,21 ^{2, 3)}	4,82 $\pm$ 0,14 ^{2, 3)}	1,61 $\pm$ 0,13 ^{2, 3)}	2,08 $\pm$ 0,17

П р и м е ч а н и е. КД — диеновые коньюгаты, ЕД/мг липидов; ОШ — основания Шиффа, отн. ед. на 1 мг липидов; МДА — малоновый диальдегид, нмоль/(мг белка · мин). Различия достоверны при $p < 0,05$: ¹⁾ — по сравнению с показателем интактных животных; ²⁾ — по отношению к группе животных, получавших стрептозотин; ³⁾ — по отношению к группе животных, исследованных через 14 сут после инъекции стрептозотина.

Введение крысам силимарина в течение 14 дней после интоксикации стрептозотином вызывало снижение до нормы скоростей дыхания митохондрий в состояниях покоя и фосфорилирования АДФ при утилизации ЯК (см. рисунок). Коэффициенты, характеризующие сопряженность окислительного фосфорилирования (СД, ДК, АДФ/О), снижались (см. рисунок), что свидетельствует о неспособности силимарина устранить вызываемую стрептозотином дезэнергизацию митохондрий. Данное предположение подтверждает анализ дыхания митохондрий при окислении НАД-зависимых субстратов. У животных, защищенных силимарином, при снижении скоростей поглощения

кислорода митохондриями во всех метаболических состояниях относительно скоростей, регистрируемых в контроле, существенно уменьшался коэффициент АДФ/О (см. рисунок). Ингибиторный анализ дыхания митохондрий крыс, получавших силимарин с применением малоната и АОА, позволил установить сохранение на уровне нормы показателей окисления и продукции эндогенной ЯК, что не приводило к изменению характера окислительного фосфорилирования (см. рисунок).

Введение силимарина в течение 14-е сут после интоксикации стрептозотином полностью сдерживало накопление первичных продуктов ПОЛ — КД. Скорос-

сти образования МДА также снижались, но не достигали значений, выявленных у интактных животных (см. таблицу). Силимарин тормозит только накопление продуктов липидной пероксидации и не улучшает функционирование митохондрий печени.

При интоксикации стрептозотоцином регулятор энергетического обмена янтарь-антитокс нормализовал показатели окислительного фосфорилирования митохондрий печени во всех метаболических состояниях. Так, при окислении ЯК восстанавливались до нормы скорости дыхания митохондрий (см. рисунок). Сниженный коэффициент АДФ/О, судя по величине коэффициентов СД и ДК, указывает на доминирование сукцинатзависимых процессов в энергопродукции.

При окислении НАД-зависимых субстратов скорости дыхания митохондрий в состояниях V_3 и V_{40} превышали показатели интактных животных. Увеличение степени сопряженности окисления и фосфорилирования (рост коэффициентов СД, ДК, АДФ/О относительно нормы) отражает преобладание вклада НАД-зависимых субстратов в продукцию АТФ. Ингибиторный анализ дыхания митохондрий крыс, получавших янтарь-антитокс, показал значительное увеличение вклада образования и окисления эндогенной ЯК в энергопродукцию по сравнению с сукцинатзависимыми процессами у животных через 14 дней после введения стрептозотоцина (см. рисунок). Это свидетельствует о развитии репаративных процессов за счет активации быстрого метаболического кластера митохондрий.

Терапия янтарем-антитоксом в течение 14 сут после интоксикации стрептозотоцином нормализовала продукцию липидоперекисей в печени крыс (см. таблицу), что указывает на отчетливое антиоксидантное действие янтаря-антитокса, которое реализуется посредством положительного влияния на систему энергопродукции печени. Судя по полученным данным, при моделировании сахарного диабета стратегия гепатопротективного действия силимарина, обладающего прямым антиоксидантным эффектом [3], может проигрывать в сравнении с эффектом янтаря-антитокса, оптимизирующим митохондриальное окисление.

Выводы

Таким образом, интоксикация стрептозотоцином вызывает в митохондриях печени гиперкомпенсированный низкоэнергетический сдвиг с повышением скоростей дыхания во всех метаболических состояниях и разобщением окислительного фосфорилирования, усиливает липидную пероксидацию. Спустя 14 сут после инъекции стрептозотоцина частично восстанавливается функционирование дезэнергизованных митохондрий, однако не устраняется разобщение окислительного фосфорилирования. Силимарин нормализует показатели сукцинат- и НАД-зависимой энергопродукции митохондрий печени крыс, получавших стрептозотоцин, и снижает интенсивность липидной пероксидации, однако не устраняет разобщение окислительного фосфорилирования.

Под влиянием терапии янтарем-антитоксом нормализуются процессы сукцинат- и НАД-зависимой энергопродукции в митохондриях, активируются реакции быстрого метаболического кластера, восстанавливается окислительное фосфорилирование, повышается энергизованность митохондрий, тормозится липидопероксидация в печени. Регулятор энергетического обмена янтарь-антитокс при интоксикации стрептозотоцином обладает более выраженными положительными метаболическими эффектами, чем гепатопротектор силимарин. Полученные результаты указывают на целесообразность применения гепатопротекторов и регуляторов энергетического обмена в комплексной терапии диабета.

Литература

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 14-е изд. М.: Новая волна, 2000. Т. 1. 540 с.; Т. 2. 608 с.
2. Митохондрии в патологии / Под ред. М.Н. Кондрашовой, Ю.Г. Каминского, Е.И. Маевского. Пушино, 2001. 156 с.
3. Подымова С.Д. Эффективность легалона при хронических заболеваниях печени // Клинич. фармакология и терапия. 1996. № 1. С. 40—43.
4. Смирнова О.М. Впервые выявленный сахарный диабет и сердечно-сосудистая патология // Фарматека. 2006. № 3. С. 54—58.
5. Смирнова Н.Б., Хазанов В.А. Коррекция патологических

состояний в эксперименте регуляторами энергетического обмена // Регуляторы энергетического обмена. Клинико-фармакол. аспекты / Под ред. В.А. Хазанова. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. С. 109—113.

6. Хазанов В.А. Роль системы окисления янтарной кислоты в энергетическом обмене головного мозга: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 1993. 35 с.
7. Хазанов В.А., Васильев К.Ю. Возрастные особенности гепатопротекторного действия митохондриальных субстратов при стрессе и интоксикации // Бюл. exper. биологии и медицины. 2005. Прил. 1. С. 54—60.

Результаты исследований молодых ученых и студентов

8. Cardinal J.W., Allan D.J., Cameron D.P. Differential metabolite accumulation may be the cause of strain differences in sensitivity to streptozotocin-Induced β cell death in inbred mice // Europ. J. Medical Res. 1999. V. 7. № 3. P. 65.
9. Baynes J.W. // Diabetes. 1991. V. 40. P. 405—412.
10. Ceriello A., Dello Russo P., Amstad P., Cerutti P. // Diabetes. 1996. V. 45. P. 471—477.
11. Kondrashova M.N. Mechanism of physiological activity and cure affect of small doses of succinic (amber) acid // Europ. J. Medical Res. 2000. V. 5. № 1. P. 58—68.

Поступила в редакцию 20.03.2006 г.