

УДК 612.354:546.221.1:615.279

ПРОФИЛАКТИКА НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПЕЧЕНИ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ СЕРОУГЛЕРОДОМ

Т.В. Момот¹, Н.Ф. Кушнерова^{2,3}, С.Е. Фоменко²

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), ² Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43), ³ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

Ключевые слова: токсический гепатит, этерификация, калифен, легалон.

В эксперименте на крысах проведено сравнительное исследование эффективности профилактического приема экстракта из калины «Калифен» и коммерческого препарата «Легалон» до интоксикации и в процессе интоксикации сероуглеродом. Показано, что интоксикация сероуглеродом сопровождалась нарушением в соотношении фракций фосфо- и нейтральных липидов. Действие экстракта из калины в сохранении метаболических реакций печени оказалось более эффективным, чем легалона.

Одним из распространенных токсикантов в газоперерабатывающей промышленности является сероуглерод. Поражающим агентом является как сам токсикант, так и продукты его метаболизма в организме – сульфаты, окисленные и эфирсвязанные фракции серы. При длительном воздействии происходит истощение антирадикальной и антиоксидантной систем защиты организма [6]. Поэтому влияние химических факторов сопровождается нарушением метаболических реакций печени и структурно-функциональным изменениям биомембран гепатоцитов. Для решения такой кардинальной проблемы, как сохранение здоровья и профилактики повреждающего действия при профессиональном контакте с химическими загрязнителями, необходимо систематическое применение компонентов, защищающих организм от агрессивного действия ксенобиотиков и способствующих устранению нарушений, ими вызванных. Известно, что при проживании людей на территориях с экологически неблагоприятными условиями на организм действует комплекс факторов риска, которые при определенных ситуациях могут приводить к запуску массивных радикальных реакций и, в случае непринятия медико-профилактических мероприятий – возникновению различных болезней. В связи с этим остро стоит вопрос разработки медицинских технологий защиты организма человека от воздействия вредных химических веществ техногенного происхождения. Одним из перспективных подходов является использование биологически активных добавок (БАД) растительного происхождения, содержащих комплексы полифенолов [9]. К таким БАД относится экстракт «Калифен» (свидетельство на товарный знак № 228327), выделенный из калины (*Viburnum sargentii* Koehne) и запатентованный как средство, обладающее антирадикальной активностью (патент № 2220614). В составе экстракта содержится широкий диапазон полифенольных

соединений: флавонолы, катехины, лейкоантоцианы, проантоцианидины, танины, лигнин и др., которые составляют свыше 60 % сухого остатка экстракта [8]. Для сравнения использовали растительный полифенольный гепатопротекторный препарат «Легалон» (Madaus AG, Германия), являющийся комплексом флавоноидов из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum*).

Целью работы явилось обоснование возможности использования БАД «Калифен» как профилактического средства в условиях интоксикации сероуглеродом.

Материал и методы. Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Для интоксикации CS₂ животных помещали в специальную затравочную камеру, сконструированную по типу камер Б.А. Курляндского [7], при относительной влажности воздуха 40–60 %, температуре 20–22 °С, с автономной системой очистки и регенерации воздуха. Концентрация сероуглерода в камере поддерживалась на уровне 1 мг/м³, что соответствует предельно допустимой концентрации этого соединения в воздухе рабочей зоны (ГОСТ 12.1.005–88; ГН 2.2.5.1313–03). Расход пропускаемого через камеру воздуха и сероуглерода составлял не менее 10 л/мин, время воздействия (6 часов в сутки на протяжении 3 недель в монотонном режиме кроме выходных) определялось, исходя из конкретных параметров моделирования условий труда на производстве.

Две группы животных получали калифен или легалон в течение 3 недель до интоксикации и продолжали получать препараты в течение всего опыта. Доза введения составляла 100 мг общих полифенолов на 1 кг массы, разработана для полифенольных гепатопротекторов [2]. Калифен вводили внутривенно через зонд в виде водного раствора (по 0,4 мл), легалон – в виде суспензии на 1 % крахмальной слизи в том же объеме. Все животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой:

- 1-я группа – контроль (интактные);
- 2-я группа – интоксикация в течение 3 недель;
- 3-я группа – интоксикация с последующей отменой токсиканта в течение 7 дней;
- 4-я группа – прием калифена в течение 3 недель до интоксикации и в период интоксикации в течение 3 недель;
- 5-я группа – прием легалона в течение 3 недель до интоксикации и в период интоксикации в течение 3 недель.

Крыс выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено комиссией по вопросам этики ТОИ ДВО РАН.

Экстракты общих липидов из ткани печени готовили по методу J. Folch [11]. Фракционное разделение фосфолипидных фракций и их количественное определение осуществляли методом двумерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле по методу V.E. Vaskovsky et al. [13]. Использовали системы растворителей, предложенные G. Rouser et al. [4]. Идентификацию фосфолипидных фракций на хроматограммах проводили с помощью специфических реактивов [4]. Хроматографическое распределение нейтральных липидов и их количественное определение проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии в системе растворителей, предложенных J.S. Amenta [10]. Обнаружение пятен нейтральных липидов осуществляли с помощью паров йода. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов и фосфолипидов. Результаты обрабатывали по параметрическому критерию Стьюдента с предварительной оценкой на нормальность распределения в рядах.

Результаты исследования. При интоксикации сероуглеродом в печени крыс отмечалась выраженная картина сформированного токсического гепатита (жировая инфильтрация). Это подтверждалось статистически достоверным увеличением на 22 % доли триацилглицеринов и на 18 % – свободных жирных кислот относительно контрольных величин (табл.). Данный факт обусловлен усилением периферического липолиза (стрессовая реакция на ксенобиотик), в результате которого происходит поступление жирных кислот и глицерина в печень из жировых депо с последующим их ресинтезом в триацилглицерины. Количество холестерина увеличилось на 24 % из-за угнетения митохондриального окисления ацетилкоэнзима А в цикле Кребса. Одновременно на 26 % уменьшился уровень эфиров холестерина и на 20 % – эфиров жирных кислот. Такое соотношение липидных фракций свидетельствует о жировом перерождении печени в связи с нарушением ее этерифицирующей функции. При исследовании фосфолипидного спектра отмечалось достоверное увеличение количества лизофосфатидилхолина (на 47 %), лизофосфатидилэтаноламина (на 77 %) и фосфатидной кислоты (на 45 %) за счет активации фосфолипаз (табл.). При этом наблюдалось снижение содержания основных структурных компонентов мембран: фосфатидилхолина (на 9 %) и фосфатидилэтаноламина

(на 10 %). В то же время количество сфингомиелина возросло на 19 %, что является защитной реакцией организма, так как этот фосфолипид увеличивает вязкость и жесткость мембраны, снижая ее проницаемость [5]. Следует отметить достоверное уменьшение уровня дифосфатидилглицерина (на 15 %) – маркера митохондрий, необходимого для функционирования ферментов дыхательной цепи. Действие токсиканта сопровождалось уменьшением количества метаболически активных фракций – фосфатидилинозита (на 7 %) и фосфатидилсерина (на 16 %), что предполагает угнетение активности мембраносвязанных ферментов.

Через 7 дней после отмены интоксикации сероуглеродом (3-я группа) отмечалось еще большее отклонение от нормы ряда биохимических показателей, что свидетельствовало о неспособности защитных механизмов противостоять развитию токсической патологии. В спектре нейтральных липидов сохранялось повышенное содержание триацилглицеринов (на 21 %), свободных жирных кислот (на 18 %) и холестерина (на 24 %) при одновременно низком уровне эфиров холестерина (на 18 %) и эфиров жирных кислот (на 21 %) относительно таковых в контроле, то есть этерифицирующая функция печени была подавлена. Анализ фракционного состава фосфолипидов печени в период отмены токсиканта показал, что содержание некоторых их фракций стало еще выше: сфингомиелина на 36 %, лизофосфатидилхолина на 63 %,

Таблица

Влияние интоксикации сероуглеродом и профилактического введения калифена и легалона до- и в период интоксикации на содержание нейтральных липидов и фосфолипидов в печени крыс

Липиды ¹	Содержание в печени, % от суммы фракций (M±m)				
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	5-я группа
Нейтральные липиды					
ТАГ	20,74±1,10	25,30±1,17 ²	25,00±1,12 ²	21,24±0,42	23,90±0,43 ²
СЖК	17,10±0,19	20,25±0,80 ²	19,00±0,63 ²	17,34±0,38	17,95±0,31
ЭЖК	17,11±0,59	13,78±0,69 ²	13,60±0,31 ²	17,00±0,56	15,33±0,40 ²
ХС	16,18±0,46	20,00±0,42 ²	18,50±0,57 ²	16,17±0,31	17,20±0,52
ЭХС	18,37±0,19	13,67±0,70 ²	15,10±0,73 ²	18,00±0,60	16,54±0,47 ²
ОФ	10,50±0,50	7,18±0,23	7,00±0,18	10,25±0,53	9,08±0,70
Фосфолипиды					
ФХ	43,15±0,64	39,17±0,76 ²	37,39±0,71 ²	43,00±0,66	42,22±0,59
ЛФХ	4,41±0,50	6,48±0,59 ²	7,19±0,14 ²	4,55±0,20	4,70±0,26
СМ	11,00±0,43	13,15±0,46 ²	15,00±0,31 ²	10,98±0,33	12,56±0,39 ²
ФЭ	22,01±0,45	19,88±0,49 ²	19,10±0,44 ²	22,13±0,73	21,00±0,64
ЛФЭ	2,68±0,19	4,74±0,16 ²	5,00±0,13 ²	2,40±0,12	3,00±0,07
ФС	4,55±0,16	3,80±0,10 ²	3,72±0,11 ²	4,48±0,09	4,33±0,08
ФИ	5,00±0,10	4,63±0,11 ²	4,40±0,09 ²	4,90±0,07	4,88±0,08
ФК	3,20±0,14	4,65±0,18 ²	5,00±0,13 ²	3,40±0,11	3,70±0,06 ²
ДФГ	4,14±0,14	3,50±0,12 ²	3,20±0,10 ²	4,16±0,10	3,61±0,07 ²

¹ ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ОФ – остаточная фракция, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота.

² Различие с контролем статистически значимо.

лизофосфатидилэтаноламина на 87 % и фосфатидной кислоты на 56 %. При этом доли фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина равнозначно снизились на 13 %, что свидетельствовало о дальнейшей активизации фосфолипаз. Таким образом, анализ липидного спектра печени указывал на продолжавшиеся и углублявшиеся нарушения метаболических реакций даже в отсутствие токсического агента.

При введении животным калифена (4-я группа) отмечалась нормализация всех исследуемых биохимических показателей. По-видимому, под влиянием профилактического приема препарата восстанавливались метаболические реакции липидного обмена, нарушенные токсикантом. То есть калифен способствовал снятию токсического стресса.

Профилактическое введение препарата сравнения (5-я группа) сопровождалось аналогичной направленностью изменений параметров, как и 4-й группе, однако некоторые показатели оставались отличимыми от контрольных величин. Так, в спектре нейтральных липидов обращало на себя внимание увеличение на 15 % доли триацилглицеринов. Одновременно на 10 % снижались уровни эфиров жирных кислот и эфиров холестерина. В спектре фосфолипидных фракций следует отметить увеличение на 14 % доли сфингомиелина, на 15 % – фосфатидной кислоты, а также снижение концентрации дифосфатидилглицерина на 13 %. То есть действие легалона оказалось менее эффективным в восстановлении метаболических реакций печени, чем калифена.

Обсуждение полученных данных. Интоксикация сероуглеродом в течение 3 недель способствовала развитию токсического гепатита у крыс. Применение калифена и легалона до- и в период интоксикации сопровождалось сохранением липидного обмена печени. Биохимический механизм данного феномена, по нашему мнению, обусловлен тем, что растительные полифенолы, входящие в их состав, имеют способность как улавливать свободные кислородные и пероксильные радикалы, образуя при этом относительно стабильный феноксил-радикал, так и локализоваться в пределах липидного бислоя плазматической мембраны [1, 12]. Известно, что растительные полифенолы восстанавливают этерифицирующую функцию печени, ингибируют фосфолипазы [3], что сопровождается снижением количества триацилглицеринов, свободных жирных кислот, увеличением фосфатидилхолина и метаболически активных фракций фосфолипидов. То есть происходит синтез фосфолипидов из триацилглицеринов. Снижение уровня холестерина и рост концентрации его эфиров можно объяснить тем, что молекулы полифенолов активируют 7 α -холестерингидроксилазу, участвующую в окислении холестерина в желчные кислоты [14]. Однако при сравнении выраженности восстановительного эффекта калифена и легалона проявляются определенные преимущества первого. Известно, что в состав легалона входит активная группа изомерных флавоноидных содинений (силибинин, силикристин, силидианин), не образующих олигомерных форм. Видимо, калифен,

будучи комплексом олигомерных и полимерных веществ, демонстрирует защитные свойства в большей степени, чем мономеры легалона.

Литература

1. Афанасьева Ю.Г., Фахретдинова Е.Р., Спирихин Л.В., Насибуллин Р.С. О механизме взаимодействия некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран // Хим.-фарм. журнал. 2007. Т. 41, № 7. С. 12–14.
2. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатопротективных средств // Ведомости фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9–12.
3. Гаскина Т.К., Курилович С.А., Горчаков В.Н. Изменение скорости лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции и липидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального перерождения печени // Вопр. мед. хим. 1989. Т. 35, № 4. С. 24–28.
4. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 221 с.
5. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. Новосибирск: Наука, 1988. 192 с.
6. Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А., Кушнерова Т.В., Другова Е.С. Профилактика нарушений физиологических и биохимических характеристик эритроцитов при интоксикации сероуглеродом // Гиг. и сан. 2010. № 4. С. 17–21.
7. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. М.: Медицина, 1970. 347 с.
8. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф. Калина – новый нетрадиционный источник олигомерных проантоцианидинов // Хим.-фарм. журнал. 2004. Т. 38. № 2. С. 41–45.
9. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф. Использование экстрактов зеленого и черного чая для профилактики токсического воздействия ацетона // Мед. труда и пром. экология. 2010. № 12. С. 38–44.
10. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid. Res. 1964. Vol. 5, No. 2. P. 270–272.
11. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
12. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. // Free Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 26, No. 9–10. P. 1231–1237.
13. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasenden I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatography. 1975. Vol. 114, No. 1. P. 129–141.
14. Yang T.T., Koo M.W. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal excretion // Life Sci. 2000. Vol. 66, No. 5. P. 411–423.

Поступила в редакцию 31.01.2013.

PREVENTION OF LIPID METABOLISM DISORDERS IN LIVER IN CASE OF CARBON-DISULFIDE INTOXICATION

T.V. Momot¹, N.F. Kushnerova^{2,3}, S.E. Fomenko²

¹ A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690059 Russian Federation), ² Pacific Oceanological Institute, FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russian Federation), ³ School of Biomedicine of the Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation) Summary – The experiment on rats allowed carrying out comparative investigation of efficiency of preventive intake of snowball extraction 'Kalifen' and commercial medication 'Legalon' before and during carbon-disulfide intoxication. As reported, the carbon-disulfide poisoning caused disturbances in phospho- and neutral lipid fractions. With respect to the maintenance of metabolic responses in liver, the snowball extraction has proved to be more efficient than Legalon. **Key words:** toxic hepatitis, etherification, Kalifen, Legalon.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 2, p. 57–59.