

УДК 616.36-099:546.17:615.322

ВЛИЯНИЕ ИНТОКСИКАЦИИ ОКСИДАМИ АЗОТА НА СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНО-УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПЕЧЕНИ И ВОЗМОЖНОСТИ ФАРМАКОПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТОЗОВ

*Н.Ф. Кушнерова^{1,4}, А.В. Кропотов², С.Е. Фоменко¹, Т.В. Момот^{3,4}*¹ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43),² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),³ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),⁴ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)**Ключевые слова:** элеутерококк, амтизол, биохимические параметры печени, эксперимент.

EFFECT OF NITROGEN OXIDES INTOXICATION ON THE LIVER LIPID-CARBOHYDRATE METABOLISM AND PROBABILITY OF HEPATOSIS PHARMACO-PROPHYLAXIS

N.F. Kushnerova^{1,4}, A.V. Kropotov², S.E. Fomenko¹, T.V. Momot^{3,4}¹ V.I. Ilichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russian Federation),² Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), ³ Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation), ⁴ School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation)**Background.** One of the hepatitis prevention ways under the effect of nitrogen oxides is the use of herbal preparations containing complexes of bioactive polyphenols having the ability to quench free radical reactions.**Methods.** The paper studies the preventive action of amthizol and Eleutherococcus under nitrogen oxides intoxication in Wistar rats.**Results.** Effect of nitrogen oxides has been accompanied by disturbances in the xenobiotics detoxification system in the liver, development of tissue hypoxia and fatty hepatitis as well as deterioration in liver esterifying function. Preliminary introduction of amthizol anti-hypoxant helped to reduce the injury in liver functional systems. Combined use of Eleutherococcus and amthizol showed greater protective effect for antitoxic function and lipidic metabolism.**Conclusions.** Use of Eleutherococcus in combination with anti-hypoxants is able to solve the problem of survival in the areas of possible man-made disasters and environmentally adverse regions.**Keywords:** *Eleutherococcus, amthizol, biochemical characteristics of liver, experiment.*

Pacific Medical Journal, 2014, No. 2, p. 77–80.

Нерациональное применение пестицидов и органических удобрений приводит к накоплению соединений азота в питьевой воде, овощах, фруктах и др. В условиях непрерывно расширяющихся контактов человека с химическими веществами возрастает вероятность острых и хронических отравлений веществами-окислителями, входящими в состав пороха, взрывчатых веществ, ракетного топлива, лекарств, удобрений, красителей и др. Продукты горения, возникающие при температуре выше 1000 °С (автотранспорт, стационарные источники) содержат оксиды азота (гидратированные формы азотной и азотистой кислот, нитрат- и нитрит-ионы, пероксиды). При вдыхании паров этих веществ или их употребление с водой и продуктами

питания в организме происходит активация свободно-радикальных реакций, пероксидация липидов и нарушение детоксикационной функции печени [5, 7]. В этих условиях появляется необходимость поиска новых подходов к фармакопрофилактике гепатозов и других поражений печени. Одно из них – использование растительных препаратов, содержащих комплексы биологически активных полифенолов, обладающих способностью гасить свободно-радикальные реакции. В настоящее время наиболее широкой популярностью здесь пользуется элеутерококк, защитное действие которого при гипоксии связывают с регулирующим влиянием на углеводный и пластический обмен [6, 11]. Также экспериментально показано, что новый антигипоксикант амтизол (3,5-диамино-1-тиа-2,3-диазол), являющийся циклическим производным гутимины, при интоксикации адреналином или оксидами азота оказывает защитное действие, нормализуя гравиметрические показатели при легочной гипергидратации [10].

Цель работы – анализ профилактических эффектов амтизола и элеутерококка при моделировании интоксикации оксидами азота.

Материал и методы. Эксперимент проводили на крысах линии Вистар массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Для моделирования интоксикации животных помещали в затравочную камеру, сконструированную по типу камер Б.А. Курляндского [12], при относительной влажности воздуха 40–60 % и температуре 20–22 °С, с автономной системой очистки и регенерации воздуха. Животные были разделены на 4 группы по 20 крыс в каждой:

1-я группа (контроль) – интактные животные;
2-я группа – ингаляция оксидами азота в концентрации 4,3 мг/м³ (предельно допустимая концентрация в атмосферном воздухе – 0,4 мг/м³) в течение 6 мин.;
3-я группа – введение амтизола в дозе 40 мг/кг за 30 мин до ингаляции оксидами азота, как во 2-й группе;
4-я группа – введение элеутерококка в течение 3 недель с последующим подключением амтизола за 30 мин до ингаляции оксидами азота, как во 2-й группе.

Водный комплекс полифенолов из элеутерококка (предварительно освобожденный от спирта путем упаривания в вакууме аптечный экстракт) вводили внутривенно в количестве 100 мг/кг массы тела, что соответствовало известной терапевтической

Кушнерова Наталья Федоровна – д-р биол. наук, профессор, заведующая отделом биохимических технологий ТОИ ДВО РАН; e-mail: natasha50@mail.ru

дозе для полифенольных гепатопротекторов [1]. Выживаемость животных рассчитывали по методу М.Б. Жангеловой [4]. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации через 60 мин. после ингаляции под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Исследование одобрено комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН.

В гомогенатах печени животных определяли концентрации пирувата, лактата, гексуроновых кислот, активность ферментов, осуществляющих детоксикацию ксенобиотиков: β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21), β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23), β -глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31), уридиндифосфат-глюкуронилтрансферазы (УДФ-гтф; КФ 2.4.1.17) [9]. Антиоксидантную систему печени исследовали по активности супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) [15]. Уровень перекисного окисления липидов оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) [3], соотношение между никотинамидадениндинуклеотидом и его восстановленной формой (НАД⁺/НАДН) – по концентрациям пирувата и лактата. Хроматографическое распределение и количественное определение нейтральных липидов проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии [13]. Результаты обрабатывали по параметрическому критерию Стьюдента с предварительной оценкой нормальности распределения признаков.

Результаты исследования. Выживаемость крыс после интоксикации оксидами азота составляла 16 %, тогда как предварительное введение амтизола повышало ее до 50 %, а совместное введение элеутерококка и амтизола способствовало 80 %-ной выживаемости животных. Активность лизосомальных ферментов β -глюкозидазы (мембраносвязанного) и β -галактозидазы (цитозольного) в печени крыс 2-й группы увеличивалась в 1,5–2 раза (табл. 1). Это свидетельствовало о повышении проницаемости мембран лизосом и выходе ферментов из органелл, что объясняется образованием высокоактивных нитрат- и нитрит-ионов, супероксидных радикалов, пероксинитритов. Увеличение активности УДФ-гтф на 61 % и уровня гексуроновых кислот на 39 % отражали активацию защитных механизмов, в частности, детоксикационной функции печени. Снижение

Таблица 1

Влияние интоксикации оксидами азота на биохимические показатели печени крыс

Параметр	Биохимические показатели (M±m)			
	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
β -глюкозидаза, нмоль/мин./г	0,22±0,01	0,40±0,04 ¹	0,34±0,01 ¹	0,27±0,02 ¹
β -галактозидаза, нмоль/мин./г	0,53±0,04	0,79±0,06 ¹	0,68±0,03 ¹	0,56±0,07
β -глюкуронидаза, мкмоль/мин./г	1,12±0,07	1,58±0,05 ¹	1,37±0,09 ¹	1,23±0,11
УДФ-гтф, мкмоль/мин./г	2,97±0,14	4,77±0,08 ¹	4,17±0,07 ¹	3,52±0,17 ¹
Гексуроновые кислоты, ммоль/кг	19,20±0,70	26,74±0,47 ¹	24,28±0,69 ¹	22,11±0,58 ¹
Гексозы, ммоль/кг	152,7±6,4	90,4±4,7 ¹	120,6±4,8 ¹	133,3±5,1 ¹
СОД, ед./мг белка	108,5±11,0	344,9±13,0 ¹	180,6±10,8 ¹	146,4±10,3 ¹
МДА, мкмоль/г	68,90±7,74	172,30±10,82 ¹	128,10±8,80 ¹	102,10±6,85 ¹
Лактат, мкмоль/г	1,73±0,07	5,19±0,07 ¹	2,65±0,12 ¹	2,17±0,10 ¹
Пируват (мкмоль/г)	0,13±0,01	0,20±0,01 ¹	0,16±0,01 ¹	0,15±0,01 ¹
НАД ⁺ /НАДН	682	342	544	622

¹ Различие с 1-й группой (контролем) статистически значимо.

количества гексоз в печени на 41 % было обусловлено стрессовой реакцией на токсикант, которая проявлялась в активации гликогенолиза и высвобождении глюкозы. Далее глюкоза использовалась для синтеза гексуроновых кислот, а также окислялась в каскаде реакций анаэробного и аэробного гликолиза (реакции детоксикации протекают с участием восстановленных никотинамидных эквивалентов, которые образуются при метаболизме глюкозы). Увеличение активности β -глюкуронидазы на 41 % явилось негативным фактором, так как способствовало расщеплению глюкуронидов, и ксенобиотики снова поступали в кровь (явление кишечно-печеночной циркуляции ксенобиотиков).

Изменения параметров липидного обмена в печени продемонстрировали, что воздействие оксидов азота способствовало формированию у животных типичной картины окислительного стресса, тканевой гипоксии и токсического гепатоза. Это проявлялось в увеличении содержания триацилглицеринов на 53 % за счет их ресинтеза из жирных кислот и глицерина, мобилизуемых при липолизе из жировой ткани в ответ на стрессовую реакцию и выброс в кровь катехоламинов. Увеличение уровня холестерина на 28 % можно объяснить активацией его синтеза из ацетил-КоА. При стрессе происходит избыточное образование ацетата из жирных кислот в связи с усилением их распада и подавлением синтеза. Достоверное уменьшение содержания эфиров жирных кислот на 26 % и эфиров холестерина на 40 % свидетельствовало о нарушении этерифицирующей функции печени, а также синтеза и катаболизма липопротеинов. Характерно отметить активацию реакций перекисного окисления липидов и формирование тканевой гипоксии. Это подтверждалось достоверным увеличением в ткани печени уровней малонового диальдегида (в 2,5 раза), лактата (в 3 раза), пирувата (на 50 %) и снижением соотношения НАД⁺/НАДН в 1,5 раза (табл. 1).

Введение амтизола до интоксикации оксидами азота сопровождалось менее выраженными

Таблица 2

Влияние интоксикации оксидами азота на содержание нейтральных липидов в печени крыс

Параметр	Биохимические показатели (M±m), ммоль/л			
	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Триацилглицерины	14,70±0,43	22,48±0,81 ¹	20,32±0,80 ¹	18,65±0,49 ¹
Свободные жирные кислоты	22,00±0,35	25,54±0,56 ¹	24,82±0,65 ¹	23,27±0,48 ¹
Эфиры жирных кислот	14,12±0,16	10,40±0,38 ¹	11,16±0,58 ¹	12,32±0,61 ¹
Холестерин	14,65±0,22	18,79±0,32 ¹	16,18±0,46 ¹	15,83±0,39 ¹
Эфиры холестерина	15,33±0,46	9,28±0,13 ¹	12,61±0,24 ¹	13,92±0,45 ¹
Остаточная фракция	19,20±1,23	13,51±0,61	14,91±0,78	16,01±0,53

¹ Различие с 1-й группой (контролем) статистически значимо.

отклонениями от нормы. Так, активность β-глюкозидазы, β-галактозидазы, β-глюкуронидазы и УДФ-гтф была увеличена, соответственно, на 55, 19, 22 и 40 %, что свидетельствовало о наличии радикальных реакций и активации II фазы детоксикации ксенобиотиков (табл. 1). Также оставалась повышенной активность СОД (на 66 %). Содержание гексуриновых кислот в печени было выше относительно контроля на 26 %, то есть, активировалась система глюкуронидной конъюгации. Уровень гексоз был несколько ниже, чем таковой в контроле, но в то же время на 33 % выше, чем во 2-й группе. Одновременно оставался высоким уровень лактата (на 53 % выше нормы) и сниженным на 20 % соотношение НАД⁺/НАДН (табл. 1). То есть тканевая гипоксия сохранялась, но была менее выраженной.

Характеризуя липидный обмен печени, следует отметить, что введение амтизола не предупреждало гепатоза – жировой инфильтрации органа. Это проявлялось в достоверном увеличении триацилглицеринов на 38 % и свободных жирных кислот на 13 %. Кроме того, показатели этерифицирующей функции печени (эфиры жирных кислот и эфиры холестерина) были достоверно снижены – на 21 и 11 %, соответственно. Также активным было перекисное окисление липидов, что подтверждалось 86 %-ным повышением уровня МДА в 3-й группе (табл. 1). Следовательно, амтизол полностью не предупреждал токсические проявления оксидов азота, а только несколько уменьшал выраженность эффекта.

У крыс, получавших элеутерококк и амтизол, изученные биохимические параметры были близки к таковым в контроле. Так, активность мембраносвязанного фермента лизосом β-глюкозидазы была выше нормы на 23 %, а активность цитозольных β-галактозидазы и β-глюкуронидазы нормализовалась. Содержание гексуриновых кислот было выше, чем в 1-й группе, на 15 %, а количество гексоз печени – ниже на 12 %. В то же время, при сравнении этой величины с таковой во 2-й группе, отмечался более высокий уровень гексоз в печени как при введении амтизола (на 33 %), так и амтизола с элеутерококком (на 48 %). Уровень лактата был выше нормы на 16 %, а соотношение НАД⁺/НАДН – на 10 % (табл. 1). В 4-й группе липидный обмен печени

страдал в меньшей степени, чем в 3-й группе животных. Так, количество триацилглицеринов было выше на 27 %, свободных жирных кислот – на 6 %, а эфиров жирных кислот и эфиров холестерина снижалось на 10–13 %; уровень холестерина был повышен на 8 % (табл. 2).

Обсуждение полученных данных.

Антигипоксанта амтизол, обладая мембрано-стабилизирующим эффектом [10], по-видимому, снимал опасность глубокого нарушения функционального состояния главного органа детоксикации – печени. Введение

элеутерококка увеличивало эффективность амтизола, что подтверждается более высокой выживаемостью животных. Биохимический механизм этого феномена в значительной мере обусловлен непосредственным участием входящих в состав элеутерококка полифенолов, которые обладают протонотонными свойствами (снятие гиперпротонемии) и выступать в качестве самостоятельной окислительно-восстановительной системы (фенол–семихинон–хинон). Известно, что растительные полифенолы имеют способность улавливать свободные кислородные и пероксильные радикалы, образуя при этом относительно стабильный феноксил-радикал. В этой системе важная роль отводится нестойкому семихинонному радикалу, играющему роль «ловушек» для реакционно-способных радикалов [14]. Также следует отметить, что растительные полифенолы активируют реакции глюконеогенеза из лактата [8], что объясняет феномен более высокой концентрации гексоз в печени животных 4-й группы. Сохранение этерифицирующей функции печени может быть обусловлено активацией полифенолами лецитин-холестеринацилтрансферазы, которая катализирует перенос жирных кислот с лецитина на холестерин с образованием его эфиров и поступлением в гепатоцит возросшего потока этерифицированного холестерина [2].

Выводы

1. Интоксикация оксидами азота в концентрации 4,3 мг/м³ сопровождается напряжением системы детоксикации ксенобиотиков в печени, развитием тканевой гипоксии, жировой инфильтрации и ухудшением ее этерифицирующей функции.

2. Антигипоксанта амтизол и растительный полифенольный препарат элеутерококк повышают выживаемость животных при интоксикации оксидами азота.

3. Предварительное введение антигипоксанта амтизола до ингаляции оксидами азота способствует меньшему поражению функциональных систем печени.

4. Предварительное введение элеутерококка и последующее введение амтизола в большей степени обладает защитным действием в отношении антиоксидантной функции и липидного метаболизма печени, чем таковое при введении только амтизола.

5. Применение элеутерококка к ежедневной диете или в составе продуктов питания (элеутерококковый сахар, столовые воды с элеутерококком и др.) может решить проблему выживания в районах возможных техногенных катастроф и экологически неблагоприятных регионах.

Литература

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Ведомости фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9–12.
2. Гаскина Т.К., Курилович С.А., Горчаков В.Н. Изменение скорости лецитинхолестеринацилтрансферазной реакции и липидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального перерождения печени // Вопр. мед. химии. 1989. Т. 35, № 4. С. 24–28.
3. Гончаренко М.С., Лагинова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // Лаб. дело. 1985. № 1. С. 60–61.
4. Жангелова М.Б. Медиаторные процессы при отеке легких: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. Л., 1988. 45 с.
5. Иванова А.С., Ситникова О.Г., Назаров С.Б. Состояние свободнорадикальных процессов у беременных крыс и их плодов при хронической нитритной токсикации // Гигиена и санитария. 2008. № 4. С. 72–75.
6. Кропотов А.В. Экспериментальный отек легких и его фармакопрофилактика антигипоксантами: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. СПб., 1997. 45 с.
7. Куценко С.А. Основы токсикологии. М.: Медицина, 2002. 608 с.
8. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Рахманин Ю.А. Влияние стресса на состояние липидного обмена печени, профилактика // Гигиена и санитария. 2005. № 5. С. 17–21.
9. Меркурьева Р.В., Билич Г.Л., Нарциссов Р.П. Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и ферментных систем различной клеточной локализации. Йошкар-Ола, 1982. 45 с.
10. Рахманин Ю.А., Кропотов А.В., Кушнерова Н.Ф., Веселков О.В. Профилактическое влияние антигипоксанта амтизола при интоксикации оксидами азота // Гигиена и санитария. 1998. № 2. С. 34–37.
11. Рахманин Ю.А. Физические факторы в экологии человека и гигиене окружающей среды // Гигиена и санитария. 2009. № 5. С. 4–7.
12. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). М.: Медицина, 1970. 347 с.
13. 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.
14. Flavonoids in health and disease / ed. by Rice-Evance C.A., Packer S.L. New York: Marcel Dekker, 1998. 504 p.
15. Paoletty F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts // Analytical biochemistry. 1986. Vol. 154. P. 536–541.

Поступила в редакцию 09.12.2013.

Влияние интоксикации оксидами азота на состояние липидно-углеводного обмена печени и возможности фармакопрофилактики гепатозов

Н.Ф. Кушнерова^{1,4}, А.В. Кропотов², С.Е. Фоменко¹, Т.В. Момот^{3,4}

¹ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43),

² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ³ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальцевого, 17), ⁴ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

Резюме. Проведены экспериментальные исследования по изучению профилактического действия амтизола и элеутерококка при интоксикации оксидами азота. Показано, что воздействие оксидов азота сопровождалось нарушениями в системе детоксикации ксенобиотиков в печени, развитием тканевой гипоксии и жирового гепатоза и ухудшением этерифицирующей функции печени. Предварительное введение антигипоксанта амтизола способствовало меньшему поражению функциональных систем печени. Совместное применение элеутерококка и амтизола давало больший защитный эффект в отношении антиоксидантной функции и липидного метаболизма печени.

Ключевые слова: элеутерококк, амтизол, биохимические параметры печени, эксперимент.

УДК 615.322:582.988.16

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАСТОЙКИ ПЛОДОВ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

П.С. Зориков, В.М. Колдаев

Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова Дальневосточного отделения Российской академии наук (692533, Приморский край, Уссурийский район, с. Горнотаежное, ул. Солнечная, 26)

Ключевые слова: *Silybum marianum*, силибин, спектрофотометрия.

OPTICAL PROPERTIES OF SILYBUM MARIANUM FRUITS TINCTURE

P.S. Zorikov, V.M. Koldaev

V.L. Komarov Gornotaezhnaya station, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (26 Solnechnaya St. Gornotaezhnoe village, Ussuriysky district, Primorsky Region 692533 Russian Federation)

Background. Saint-Mary-thistle (*Silybum marianum* Gaerth., Asteraceae) is used as a hepatoprotective medicine due to flavolignans. Existing methods of their control are rather laborious, and

simpler spectrophotometric methods have not been developed sufficiently.

Methods. Absorptive optical spectra of *Silybum marianum* fruits tincture and silybine flavolignan solution in ethanol (40%) have been recorded by digital spectrophotometer UV-2051PC (Shimadzu). For normalized spectra the researchers measured highs, lows, points of inflection, jaggies, the width of the absorption bands and the area, asymmetry coefficients. The content of flavolignans in *Silybum marianum* fruits has been evaluated by comparing the spectral parameters and the specific absorption for the tincture and silybine solution.

Results. The absorption spectra of *Silybum marianum* fruits tincture and silybine solution were almost identical according to many spectral parameters.

Колдаев Владимир Михайлович – д-р биол. наук, профессор, ведущий н.с. лаборатории лекарственных растений ГТС ДВО РАН; kolvm42@rambler.ru