

Белусова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г.

## **Гипоксия как патофизиологическая основа изменения метаболических процессов в эритроцитах и гепатоцитах крыс после длительного приёма симвастатина (зокора)**

ГБУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра общей и клинической биохимии №1, 344022, г.Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29

С целью оценки функционально-метаболических перестроек клеток печени и эритроцитов после длительного приёма симвастатина (Zocor, 20 мг по 1,5 мг один раз в сутки в течение трех месяцев) определяли концентрацию метаболитов гликолиза, активность ферментов углеводно-энергетического обмена и антиоксидантной защиты. Установлено, что общая метаболическая реакция на длительный приём симвастатина у интактных животных характеризуется развитием гипоксии, что подтверждается увеличением концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах, накоплением лактата в эритроцитах и гепатоцитах. Разнонаправленные изменения активности глутатион-зависимых ферментов, повышение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты свидетельствуют о напряжении защитных механизмов эритроцитов и гепатоцитов. Биохимические изменения в плазме крови отражают тенденцию к формированию синдрома цитолиза и нарушению биосинтетической функции печени. Снижение количества церулоплазмينا может быть использовано в качестве дополнительного биохимического критерия для оценки выраженности повреждения печени при длительном приёме статинов.

**Ключевые слова:** статины; гепатотоксичность; симвастатин.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 93-96.

Belousova E.S., Mikashinowich Z.I., Sarkysjan O.G.

## **Hypoxia as functional base of metabolic processes changes in erythrocytes and hepatocytes of rats after prolonged Simvastatin (Zokor) intake**

SBI HPO Rostov state medical university Ministry of Health protection of Russia, department of common and clinical biochemistry № 1, 344022, Rostov-on-Don, Nakhichevansky str., 29

Concentration of glycolysis metabolites, activity of enzymes of carbohydrate and energetic metabolism and antioxidant enzymes was investigated in hepatocytes and erythrocytes with the purpose of estimation of functional metabolic changes of cells rebuilding after prolonged Simvastatin intake (Zocor, 20 mg; on 1.5 mg once a day during 3 months). It was established that total metabolic reaction on prolonged Simvastatin intake at intact animals characterized by hypoxia formation, that manifested by increasing of 2,3-BPG concentration in erythrocytes, lactate accumulation in erythrocytes and hepatocytes. Different side changes of glutathione-dependent enzymes activity, activation of first line of antioxidant defense enzymes testify about tense defense mechanisms of erythrocytes and hepatocytes. Biochemical changes in blood plasma shows tendency to cytolysis syndrome formation and affection of biosynthetic liver function. Decreasing of ceruloplasmin concentration can be used as additional biochemical test in estimation of the state of liver affection at prolonged Simvastatin intake.

**Key words:** statins, hepatotoxicity, Simvastatin.

**For citation:** Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 93-96

**For correspondence:** Belousova E.S., e-mail: belousovalena@mail.ru

Несмотря на многочисленные исследования, доказывающие высокую эффективность статинов, существует ряд нерешённых вопросов, связанных с их токсическим влиянием на мышцы и печень [1]. Имеющиеся в литературе данные не позволяют сформировать однозначное мнение о степени выраженности поражения печени при длительном приёме статинов, молекулярных механизмах

изменения функционального состояния гепатоцитов и их патогенетической значимости [2, 3]. Выявление особенностей сдвигов ключевых метаболических процессов в гепатоцитах после длительного приёма статинов позволит сформулировать представления о молекулярных изменениях в клетках печени и разработать способы преодоления побочных эффектов.

**Для корреспонденции:** Белусова Елена Сергеевна, канд. биол. наук, зав. каф. фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: belousovalena@mail.ru

Анализ функциональной перестройки красных клеток крови, осуществляющих тесный контакт со всеми тканями, позволит определить вклад типовых патофизиологических механизмов повреждения в изменение функционального состояния гепатоцитов.

*Цель работы* — оценка функционально-метаболической перестройки клеток печени и эритроцитов экспериментальных животных после длительного приёма симвастатина.

### Методика

Исследование проводилось на 70 беспородных крысах-самцах массой 300—350 г в возрасте 12—14 мес. 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: контрольная группа — 35 интактных животных; экспериментальная группа — 35 животных, получавших в течение 3 мес. симвастатин (Zocor, 20 мг) по 1,5 мг 1 раз в сутки. По истечении срока эксперимента животных декапитировали.

Эритроциты получали из крови, стабилизированной гепарином (10 ед/мл), отделяли от лейкоцитов и тромбоцитов в 3% желатиновом растворе с последующим центрифугированием. Гомогенат печени готовили в соотношении 1 г ткани : 9 мл охлаждённого физиологического раствора, центрифугировали при 3000 об/мин. Концентрацию 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) определяли методом Лугановой И.С., Блинова М.Н. [4]. Концентрацию пировиноградной (ПВК) кислоты определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином [5]. Концентрацию лактата определяли методом, описанным Даниловой Л.А. [6]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл-6-фДГ) определяли спектрофотометрически [6]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом, описанным Гуревичем В.С. и др. [7]. Активность каталазы определяли по методу Королюк М.А. и соавт. в описании Микашинович З.И. и др. [8]. Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли по скорости окисления НАДФН+Н [5]. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли методом Ellman G.L. [8]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом [5]. Активность трансаминаз (АЛТ и АСТ) определяли на автоматическом анализаторе Bayer. Активность церулоплазмينا (ЦП) определяли методом, описанным Камышниковым В.С. [5].

Митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием после гомогенизации ткани в солевом растворе (0,15 М КСl и 10 мМ трис-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 использовали для определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [9] и цитохромоксидазы (ЦХО) [10].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В эритроцитах животных экспериментальной группы (табл. 1) выявлено повышение концентрации 2,3-ДФГ на 101,60%, лактата на 88,40 и уменьшение концентрации ПВК на 35,86% и относительно контрольной группы, что свидетельствует о развитии тканевой гипоксии.

В эритроцитах животных экспериментальной группы установлено увеличение активности СОД на 62,34%, активность каталазы достоверно не изменилась относительно контрольной группы. В условиях неадекватного изменения активности этих ферментов возникает опасность накопления пероксида водорода, обладающего цитотоксическим действием и способностью инициировать перекисное окисление липидов (ПОЛ).

При определении активности ферментов обмена глутатиона в эритроцитах не выявлено статистически значимого изменения активности ГПО. Активность ГР и концентрация GSH были снижены соответственно на 20,92% и 28,59% по сравнению с контрольной группой, что создаёт условия для осмотического лизиса эритроцитов.

В плазме крови выявлена тенденция к повышению активности АЛТ на 19,57% и АСТ на 13,98% по сравнению с контрольной группой. Обращает внимание значительное снижение активности ЦП — на 58,64%. ЦП, являясь белком, синтезируемым исключительно печенью, может выступать в качестве биохимического маркера, отражающего степень нарушения функций гепатоцитов.

В гепатоцитах животных экспериментальной группы также выявлено повышение содержания лактата на 39,72%, уровень ПВК достоверно не изменился по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

В гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено повышение активности СДГ на 84,02% и ЦХО на 29,55% относительно контрольной группы. В условиях изменения кислородного обеспечения органов наблюдаются фазные изменения активности ферментных митохондриальных комплексов. В процессе метаболической адаптации к гипоксии активация сукцинатзависимо-

го участка дыхательной цепи позволяет сохранять внутриклеточный баланс АТФ, необходимый для сохранения функциональной активности клетки [11].

В гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено статистически значимое повышение активности гл-6-фДГ на 36,61% по сравнению с контрольной группы. Увеличение скорости начального этапа пентозофосфатного шунта в условиях гипоксии обеспечивает усиление генерации восстановленного кофермента НАДФ, необходимого для детоксикации и восстановительных биосинтезов.

При определении активности антиоксидантных ферментов в гепатоцитах экспериментальных животных вы-

явлено увеличение активности СОД на 86,71% и каталазы на 71,87% по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Параллельно установлены неравнозначные изменения ферментов обмена глутатиона: повышение активности ГПО на 34,43% снижение активности ГР на 47,90% и концентрации GSH на 19,77% относительно показателей животных контрольной группы.

Резюмируя представленные данные можно заключить, что общая метаболическая реакция на длительный приём симвастатина у интактных животных характеризуется развитием гипоксии, что подтверждается увеличением концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах, накоплением лактата в эритроцитах и гепатоцитах. Накопле-

Таблица 1

**Концентрация метаболитов гликолиза и активность ферментов углеводного обмена и антиоксидантной защиты в эритроцитах животных экспериментальной группы**

| Показатели                           | Группы                       |                                  |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
|                                      | Контрольная группа 1, n = 35 | Экспериментальная группа, n = 35 |
| 2,3-ДФГ, [мкмоль/мл плотного осадка] | 8,17 ± 0,850                 | 16,471 ± 0,850 p<0,001           |
| Лактат, [мкмоль/мл плотного осадка]  | 4,88 ± 0,400                 | 9,19 ± 0,860 p<0,001             |
| ПВК, [мкмоль/мл плотного осадка]     | 2,20 ± 0,730                 | 1,41 ± 0,22 p>0,05               |
| Гл-6ф-ДГ, [мкмоль/г Hb]              | 3,026 ± 0,507                | 2,561 ± 0,180 p>0,05             |
| СОД, [усл. ед./г Hb]                 | 1195 ± 137                   | 1940 ± 189 p<0,001               |
| Каталаза, [мКат/г Hb]                | 2,598 ± 0,728                | 2,232 ± 0,386 p>0,05             |
| GSH, [мкмоль/г Hb]                   | 16,916 ± 2,86                | 12,08 ± 1,911 p<0,05             |
| ГПО, [мкмоль/г Hb]                   | 13,151 ± 3,20                | 12,066 ± 0,765 p>0,05            |
| ГР, [мкмоль/г Hb]                    | 0,760 ± 0,063                | 0,601 ± 0,077 p<0,05             |
| АЛТ [мкКат/л]                        | 0,401 ± 0,082                | 0,495 ± 0,075 p>0,05             |
| АСТ [мкКат/л]                        | 0,565 ± 0,069                | 0,644 ± 0,090 p>0,05             |
| ЦП                                   | 2,026 ± 0,573                | 0,838 ± 0,091 p<0,001            |

Примечание. p — достоверность относительно показателей контрольной группы.

Таблица 2

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

| Показатели                  | Группы                     |                                  |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
|                             | Контрольная группа, n = 35 | Экспериментальная группа, n = 35 |
| ПВК, [мкмоль/мг белка]      | 1,48 ± 0,353               | 1,27 ± 0,206 p>0,05              |
| Лактат, [мкмоль/мг белка]   | 3,10 ± 0,561               | 4,33 ± 0,482 p<0,05              |
| Гл-6ф-ДГ, [мкмоль/мг белка] | 0,224 ± 0,044              | 0,306 ± 0,048 p<0,05             |
| СДГ, [нмоль/мг белка]       | 21,80 ± 3,787              | 40,11 ± 7,044 p<0,02             |
| ЦХО [нмоль/мг белка]        | 0,044 ± 0,00077            | 0,057 ± 0,0075 p<0,001           |
| СОД, [усл. ед./мг белка]    | 17,571 ± 3,489             | 32,81 ± 5,496 p<0,001            |
| Каталаза, [мКат/мг белка]   | 22,52 ± 4,028              | 38,70 ± 6,717 p<0,02             |
| GSH, [мкмоль/г Hb]          | 1062 ± 80,79               | 852 ± 98,00 p<0,05               |
| ГПО, [мкмоль/мг белка]      | 98,38 ± 9,470              | 132,26 ± 13,481 p<0,05           |
| ГР, [мкмоль/мг белка]       | 0,428 ± 0,095              | 0,223 ± 0,042 p<0,05             |

Примечание. p — достоверность относительно показателей контрольной группы.

ние лактата на фоне снижения концентрации ПВК, выявленное в эритроцитах и гепатоцитах животных экспериментальной группы отражает изменение метаболизма в сторону превалирования анаэробных процессов и создаёт условия для формирования метаболического ацидоза, что, в свою очередь, изменяет активность ферментных систем клетки. Накопление лактата и тенденция к снижению активности гл-6-ф-ДГ в эритроцитах может отражать изменение соотношения скоростей гликолиза и пентозофосфатного шунта в сторону формирования гипергликолиза и привести к несостоятельности адаптивных механизмов.

Гипоксический стимул оказывает мощное воздействие на всю систему транспорта кислорода, инициирует функциональную перестройку структур, принимающих участие в его утилизации в тканях. Энергетический обмен, интенсивность которого находится в тесной взаимосвязи с кислородным обеспечением клетки, вовлекается в процесс как единая функциональная система, в которой важнейшее регуляторное значение имеет изменение активности митохондриальных ферментных комплексов [11]. Повышение активности СДГ и ЦХО в гепатоцитах животных экспериментальной группы направлено на поддержание энергетического баланса клетки, однако, может привести в постепенному «переутомлению» и истощению адаптивных механизмов.

Повреждающее действие гипоксии реализуется за счёт совокупности факторов, обеспечивающих активацию ПОЛ, и требует повышения мощности внутриклеточных защитных механизмов [12]. Характерной чертой изменения активности ферментативных антиоксидантов в исследуемых клетках является значительное увеличение активности СОД и снижение концентрации GSH. По данным литературы, Mn-СОД и ГПО являются основными ферментативными антиоксидантами митохондрий и клеточных мембран, снижают выход цитохрома с из митохондрий и предотвращают развитие апоптоза при действии повреждающих факторов. Снижение концентрации GSH в клетках печени в условиях гипоксии служит индикатором мощности АОЗ и приводит к нарушению их функции [13]. Выявленные нами разнонаправленные изменения активности глутатион-зависимых ферментов, повышение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты свидетельствуют о напряжении защитных механизмов эритроцитов и клеток печени, что может привести к их постепенному истощению.

#### Сведения об авторах:

Микашинович Зоя Ивановна, доктор, биол. наук, проф., зав. каф. общей и клинической биохимии № 1 ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: kbunpk-rostov@yandex.ru

Саркисян Олег Грачинович, канд. мед. наук, доцент каф. общей и клинической биохимии № 1 ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: vergiliusmerlin@yandex.ru

При действии повреждающего фактора адаптивная перестройка клетки должна быть направлена на изменение функциональной активности систем, способных обеспечить сохранение её жизнедеятельности с наименьшими затратами. Биохимические изменения в плазме крови отражают тенденцию к формированию синдрома цитолиза, нарушению биосинтетической функции печени, что может быть метаболическим отражением несостоятельности адаптивных механизмов и развития дизрегуляторной патологии печени.

#### References

1. Dolzhenko M.N., Bazilevich A.Ya., Simagina T.V. et al. Statines safety: pro et contra. *Mistetstvo likuvannya*. 2010; 2(68): 26-34. (in Russian)
2. Kang S., Liu Y., Liu X.B. Effects of aggressive statin therapy on patients with coronary saphenous vein bypass grafts: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. 2013; Vol. 35(8): 1125-36.
3. Maji D., Sh., Solanki et al. Safety of statins. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2013; 17(4): 636-46.
4. Lukanova I.S., Blinov M.N. Estimation of 2,3-BPG by nonenzymatic method and ATP in erythrocytes of patients with chronic lympholeucosis. *Laboratory business*. 1975; 7: 652-4. (in Russian)
5. Kamyshnikova V.S., ed. Guide on biochemical investigations and laboratory diagnostics. Moscow, «MEDpress-inform»; 2004. (in Russian)
6. Guide on laboratory methods of investigation. Under the editorship of Danilovoy L.A. — St.Petersburg: Piter, 2003:736. (in Russian)
7. Gurevich V.S., Kontorshchikova K.N., Shatilina L.V. Competitive analysis of two methods of superoxidedismutase estimation. *Laboratory business*. 1990; 4: 44-7. (in Russian)
8. Mikashinovich Z.I., Letunovskiy A.V., Volzhin O.O. et al. Biochemical investigations of saliva in clinical practice. Rostov-on-Don, RostGMU Publishers; 2004. (in Russian)
9. Nordmann I.N. Gauchery J. Determination the activiti dehydrogenasiue des mitochondriies a 1-acid-dichloride-2,3,5-triphenyl-tetrazolium. *Bull. Sos. Chim. Biol.* 1957; V. 33: 189-97.
10. Krivchenkova R.S. Estimation of cytochromeoxidase activity in mythochondrial suspension. *Modern methods in biochemistry*. Moscow; Medicine, 1977. (in Russian)
11. Luk'yanova L.D., Dudchenko A.M., Tsybina T.A. et al. Regulatory role of mithochondrial dysfunction in hypoxia and it interrelation with transcriptional activity. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2007; 2: 3-13. (in Russian)
12. Kryzhanovskiy G.N. Dysregulatory pathology. Moscow: Medicine, 2002. (in Russian)
13. Kulinskiy V.I., Kolesnichenko L.S. Gluthathione I system. Synthesis, transport of gluthathionetransferase, gluthathioneperoxidase. *Biomedicine chemistry*. 2009; 55(3): 255-77. (in Russian)

Поступила 28.10.13