

# Сравнительная оценка защитного эффекта вальпроата натрия, феназепама и ионола при стрессорном повреждении печени у крыс

Стрессорные повреждения печени, характеризующиеся развитием органоспецифической гиперферментемии, депрессией N-деметилазной активности и уменьшением количественных характеристик системы цитохрома P<sub>450</sub>, могут быть существенно ограничены за счет активации центральных и локальных звеньев стресс-лимитирующих систем организма. При этом синтетический антиоксидант ионол обладает более выраженным гепатопротекторным действием, чем активаторы ГАМК-эргического звена стресс-лимитирующих систем организма.

## Введение

Известно, что при длительном стрессорном воздействии в печени крыс возникают активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), депрессия 7 $\alpha$ -монооксигеназы холестерина — фермента, ответственного за окисление холестерина в желчные кислоты [12], и, как следствие, атерогенная стрессорная дислипидемия [5]. Одновременно при этом повреждаются печеночные клетки, что проявляется, в частности, в многократном увеличении в плазме крови ферментативной активности специфического печеночного фермента — фруктозо-1-фосфатаальдозазы (Ф-1-ФА) [6].

Поскольку атерогенная стрессорная дислипидемия наблюдается и у людей [7], а при определенных условиях может быть довольно длительной [13] и играть важную роль в развитии атеросклероза, представлялось важным выяснить возможность фармакологического предупреждения повреждения печени при стрессе.

Цель работы состояла в сравнительной оценке антистрессорного гепатопротективного действия вальпроата натрия, феназепама, — с одной стороны, и ионола, — с другой, как важных звеньев стресс-лимитирующих систем организма [4].

## Методика

Эксперименты выполнены на 216 крысах-самцах линии Вистар массой 160—180 г. Активаторы ГАМК-эргической системы — вальпроат натрия (150 мг/кг) и феназепама (1 мг/кг) использовали внутривентриально за 1,5 и 1 ч соответственно до стрессорного воздействия. Синтетический антиоксидант ионол (20 мг/кг) применяли пер орально в течение 3 сут до стрессорного воздействия. Такие сроки введения препаратов позволили оценить их гепатопротективный эффект при эмоционально-болевым стрессе (ЭБС) и максимальном содержании в крови животных исследуемых препаратов.

Для изучения сравнительного эффекта вальпроата натрия, феназепама и ионола животные были разделены на восемь групп: 1-я — контрольная; 2-я — животные, получавшие ионол; 3-я — животные, получавшие вальпроат натрия; 4-я — животные, получавшие феназепама; 5-я — животные, подвергнутые ЭБС; 6-я — животные, подвергнутые ЭБС на фоне защиты ионолом; 7-я — то же на фоне защиты вальпроатом натрия и 8-я — то же на фоне защиты феназепамом. Для изучения динамики процесса было взято еще восемь групп животных, что позволило оценить изменения, вызванные стрессом через 24 и 48 ч после окончания стрессорного воздействия. Стрессорное повреждение

печени вызывали, моделируя Desiderate [10]. По забирала кровь, а ткань печени В полученной сыворотке методом Шапиро в модифицированном жидком азоте растирали и использовали для обнаружения (МДА) [11] и диеновых продуктов окисления цитохромов P<sub>450</sub> и B<sub>5</sub> щали в холодный (0°C) гомогенизаторе с тефлоновыми лопастями. Выделение микросомальных ферментов Де-Пьера и Даллнера [9] 2 мл 50 ммоль/л трис-Н-фосфата. Количество цитохромов (N-ДМА) определяли по

## Результаты и их обсуждение

Как видно из результатов (рис. 1), Ф-1-ФА; б — прирост диеновых продуктов окисления; г — N-деметилазная активность фермента в сыворотке крови была более чем в 3 раза выше, чем в контроле (P<0,05). В печени активируется процесс перекисного окисления липидов, что приводит к накоплению липопероксидов. Так, первичных продуктов ПОЛ составил 47 %, а конечных — 96 % (P<0,01). Резко выражена специфическая гиперферментемия, отражающая повреждение печени, и активация ПС-активности печени к стрессу. Известно, что ЭБС приводит к увеличению количества и активности печеночных монооксигеназ. Так, уже сразу по окончании стрессорного воздействия сывороточная ДМА составила 10 %, а в печени цитохромов P<sub>450</sub> и B<sub>5</sub> — соответственно по сравнению с контрольными группами (P<0,05). Через 48 ч после окончания ЭБС депрессия

Рис. 1. Повреждающее действие эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на печень крыс.

мальных монооксигеназ в сыворотке крови и составила по N-ДМА и B<sub>5</sub> — 31 и 19 % соответственно. ЭБС достоверных отличий от контрольной группы не на



эффекта  
иола  
ни у крыс

теризующиеся развитием ор-  
депрессией N-деметилазной  
их характеристик системы ци-  
граничены за счет активации  
-лимитирующих систем орга-  
идант ионол обладает более  
чем, чем активаторы ГАМК-  
систем организма.

м воздействии в печени крыс  
ния липидов (ПОЛ), депрес-  
ермента, ответственного за  
ы [12], и, как следствие, ате-  
Одновременно при этом по-  
вляется, в частности, в мно-  
ферментативной активности  
фруктозо-1-фосфатацальдозы

ислипидемия наблюдается и  
вях может быть довольно  
азвитии атеросклероза, пред-  
ть фармакологического пре-  
се.

ой оценке антистрессорного  
натрия, феназепам, — с од-  
кных звеньев стресс-лимити-

амдах линии Вистар массой  
системы — вальпроат нат-  
пользовали внутрибрюшинно  
ного воздействия. Синтети-  
применяли рег оз в течение  
сроки введения препаратов  
эффект при эмоционально-  
одержании в крови живот-

вальпроата натрия, фена-  
ны на восемь групп: 1-я —  
ионол; 3-я — животные, по-  
ле, получавшие феназепам;  
— животные, подвергнутые  
же на фоне защиты валь-  
защиты феназепамом. Для  
де восемь групп животных,  
е стрессом через 24 и 48 ч  
Стрессорное повреждение

печени вызывали, моделируя у животных «невроз тревоги» по методи-  
ке Desiderate [10]. По завершении ЭБС животных декапитировали, со-  
бирали кровь, а ткань печени быстро замораживали в жидком азоте.  
В полученной сыворотке крови определяли активность Ф-1-ФА по  
методу Шапиро в модификации Брагинского [3]. Ткань печени в  
жидком азоте растирали до тканевого порошка, навеску 0,3 г исполь-  
зовали для обнаружения продуктов ПОЛ — малонового диальдегида  
(МДА) [11] и диеновых конъюгатов (ДК) [8]. Для определения коли-  
чества цитохромов  $P_{450}$  и  $B_5$  навеску свежей ткани печени (2 г) поме-  
щали в холодный ( $0^\circ\text{C}$ ) 1,15 %-ный раствор KCl, гомогенизировали в  
гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при 500 мин<sup>-1</sup> в течение 60 с.  
Выделение микросомальной фракции осуществляли по методике  
Де-Пьера и Даллнера [9]. Полученные микросомы ресуспендировали в  
2 мл 50 ммоль/л трис-HCl буфера (pH 7,4 при температуре  $20^\circ\text{C}$ ).  
Количество цитохромов  $P_{450}$ ,  $B_5$  и N-деметилазную активность  
(N-ДМА) определяли по методике Арчакова и Карузиной [2].

### Результаты и их обсуждение

Как видно из результатов, представленных на рис. 1 (а — активность  
Ф-1-ФА; б — прирост диеновых конъюгатов; в — малонового диальде-  
гида; г — N-деметилазной активности; д, е — количество цитохромов  
 $P_{450}$  и  $B_5$  соответственно), под влиянием ЭБС развивается выражен-  
ная органоспецифическая гиперферментация Ф-1-ФА. При этом актив-  
ность фермента в крови увеличи-  
лась более чем в 3 раза по сравне-  
нию с контролем ( $P < 0,01$ ). В тка-  
ни печени активируется ПОЛ, что  
приводит к накоплению продуктов  
липопероксидации. Так, прирост  
первичных продуктов ПОЛ — ДК  
составил 47 %, а конечных продук-  
тов ПОЛ — МДА — 96 % ( $P < 0,01$ ). Резко выраженная органоспе-  
цифическая гиперферментация,  
отражающая повреждение клеток  
печени, и активация ПОЛ свиде-  
тельствуют о высокой чувстви-  
тельности печени к стрессу. Далее пока-  
зано, что ЭБС приводит к измене-  
нию количества и активности ми-  
кросомальных монооксигеназ печени.  
Так, уже сразу по окончании стрес-  
сорного воздействия снижение N-  
ДМА составило 10 %, а количества  
цитохромов  $P_{450}$  и  $B_5$  — 30 и 18 %  
соответственно по сравнению с та-  
ковыми у животных контрольной  
группы ( $P < 0,05$ ). Через 24 ч после  
окончания ЭБС депрессия микросо-

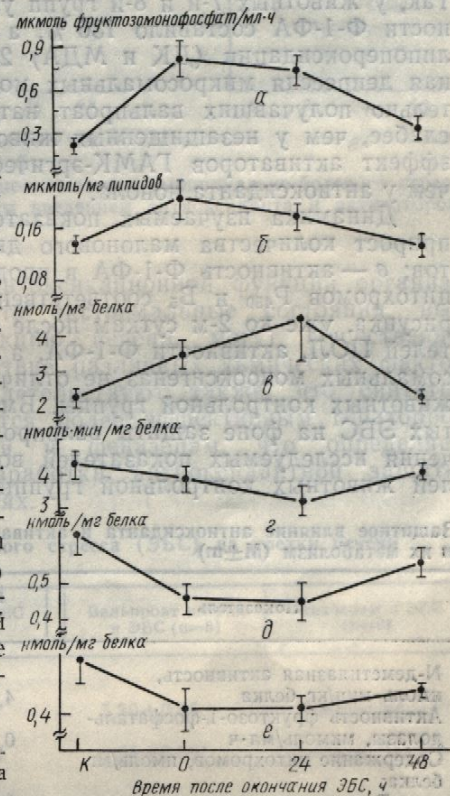


Рис. 1. Повреждающее действие шестичасового эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на печень крыс.

мальных монооксигеназ печени достигла своего максимального значе-  
ния и составила по N-ДМА — 25 %, а по количеству цитохромов  $P_{450}$   
и  $B_5$  — 31 и 19 % соответственно ( $P < 0,01$ ). Через 48 ч после оконча-  
ния ЭБС достоверных отличий этих показателей от таковых у животных  
контрольной группы не наблюдалось.



Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о повреждающем влиянии ЭБС на систему цитохрома P<sub>450</sub> печени крыс, которое проявляется, в основном, в первые 24 ч после окончания стрессорного воздействия и может быть причиной нарушения детоксикационной функции печени при различных экстремальных состояниях. Учитывая ведущую роль ПОЛ в повреждении биологических мембран [1], можно сделать вывод о возможности влияния продуктов липопероксидации на систему цитохрома P<sub>450</sub> при стрессе, а также о предупреждении этих повреждений посредством активации стресс-лимитирующих систем самого организма и (или) разнообразных экзогенных антиоксидантов.

В таблице представлены результаты влияния ионола, вальпроата натрия и феназепама на ферментацию Ф-1-ФА, ПОЛ и систему цитохрома P<sub>450</sub> в печени при стрессе. Введение ионола животным практически не влияло на систему цитохрома P<sub>450</sub>. В то же время вальпроат натрия и феназепам оказывали индуцирующее влияние на систему микросомальных монооксигеназ. Так, у животных 3-й и 4-й групп повышение N-ДМА составило 39 %, а прирост количества цитохромов P<sub>450</sub> и B<sub>5</sub> — 16 и 10 % соответственно. ЭБС на фоне защиты ионолом (см. таблицу) не вызывал столь выраженной активации ПОЛ и гиперферментации, как у животных 5-й группы. Предварительное введение антиоксиданта также полностью отменяло стрессорную депрессию микросомальных монооксигеназ. Вальпроат натрия и феназепам оказывали менее выраженное антистрессорное действие (см. таблицу). Так, у животных 7-й и 8-й групп увеличение в сыворотке крови активности Ф-1-ФА составило 136 %, а прирост в ткани печени продуктов липопероксидации (ДК и МДА) 25 и 50 % соответственно. Стрессорная депрессия микросомальных монооксигеназ у животных, предварительно получавших вальпроат натрия и феназепам, была выражена слабее, чем у незащищенных животных, однако этот антистрессорный эффект активаторов ГАМК-эргической системы был менее выражен, чем у антиоксиданта ионола.

Динамика изучаемых показателей представлена на рис. 2 (а — прирост количества малонового диальдегида, б — диеновых конъюгатов; в — активность Ф-1-ФА в крови, г — N-ДМА, д, е — количество цитохромов P<sub>450</sub> и B<sub>5</sub> соответственно в печени). Как видно из этого рисунка, уже ко 2-м суткам после окончания стресса значения показателей ПОЛ, активности Ф-1-ФА, а также количества и N-ДМА микросомальных монооксигеназ не отличались от значений, определяемых у животных контрольной группы. Вместе с тем, у животных, подвергнутых ЭБС на фоне защиты вальпроатом натрия или феназепамом, значения исследуемых показателей возвращались к значениям показателей животных контрольной группы уже через 24 ч после окончания

Защитное влияние антиоксиданта и активаторов ГАМК-эргической системы на повреждение и их метаболизм (M±m)

| Показатель                                         | Контроль (n=12) | Ионол (n=8) | Вальпроат натрия (n=8) |
|----------------------------------------------------|-----------------|-------------|------------------------|
| N-деметилазная активность, нмоль·мин/кг белка      | 4,23±0,19       | 4,78±0,31   | 5,48±0,65              |
| Активность фруктозо-1-фосфаталядолазы, мкмоль/мл·ч | 0,22±0,02       | 0,13±0,02*  | 0,18±0,03              |
| Содержание цитохромов, нмоль/мг белка:             |                 |             |                        |
| B <sub>5</sub>                                     | 0,50±0,02       | 0,48±0,024  | 0,55±0,02              |
| P <sub>450</sub>                                   | 0,63±0,026      | 0,65±0,043  | 0,75±0,035*            |
| Содержание диеновых конъюгатов, мкмоль/мг липидов  | 0,13±0,005      | 0,10±0,006* | 0,13±0,005             |
| Содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка  | 2,27±0,12       | 1,97±0,045  | 2,22±0,12              |

Примечания: n — число животных; \* достоверность различий по сравнению с контролем (P<0,05).

стрессорного воздействия тически полностью отменяло наблюдения значения ис животных не отличались от

Таким образом, заметным изменениям кле

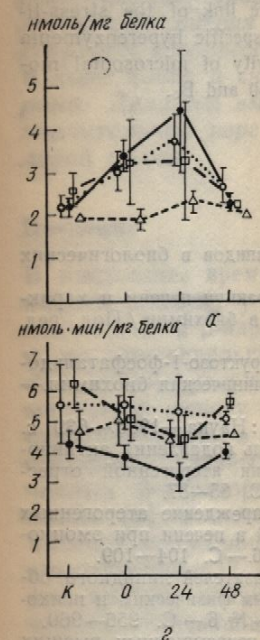


Рис. 2. Защита повреждающего действия (ЭБС) на печень крыс препаратами ГАМК-эргической системы.

хрома P<sub>450</sub> — основного фермента. Это положение объясняется тем, что стресс, нарушая функцию цитохрома P<sub>450</sub>, способствует повреждению печени. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антиоксидант ионол оказывает более выраженное антистрессорное действие, чем вальпроат натрия и феназепам, что подтверждается данными о состоянии организма при стрессорном

более выраженное действие шестичасового эмоционального стресса.

| Феназепам (n=8) | ЭБС (n=12)  |
|-----------------|-------------|
| 6,25±0,42*      | 3,20±0,21*  |
| 0,24±0,03       | 0,88±0,07   |
| 0,55±0,027      | 0,41±0,016* |
| 0,75±0,05*      | 0,44±0,026  |
| 0,14±0,014      | 0,19±0,014* |
| 2,59±0,19       | 4,44±0,69*  |

ем (P<0,05).

ISSN 0201-8489. Физиол. журн.



Результаты свидетельствуют о повреждении цитохрома P<sub>450</sub> печени крыс, уже 24 ч после окончания стрессорной нагрузки. Повреждение биологических процессов, влияющих на продукцию цитохромов P<sub>450</sub> при стрессе, а также о нарушении активации стресс-лигандов (или) разнообразных экзоген-

ных влияний ионола, вальпроата натрия, Ф-1-ФА, ПОЛ и систему цитохрома P<sub>450</sub>. В то же время вальпроат натрия оказывает влияние на систему цитохромов P<sub>450</sub> на фоне защиты ионолом. Предварительное введение ионола оказывает депрессирующее действие (см. таблицу). В сыворотке крови активны в ткани печени продукты стрессорного действия. Стрессорное действие у животных, предварительно обработанных вальпроатом, было менее выражено, однако этот антистрессорный эффект был менее выражен,

представлена на рис. 2 (а — диеновых конъюгатов, б — количество N-ДМА, в — количество N-ДМА микро- и макромолекул, определяемых у животных, подвергнувших стрессу или вальпроату натрия, а также феназепаму, зна- чения показателя через 24 ч после окончания

АМК-эргической системы на поврежда-

| Ионол (n=8) | Вальпроат натрия (n=8) |
|-------------|------------------------|
| 4,78±0,31   | 5,48±0,65              |
| 0,13±0,02*  | 0,18±0,03              |
| 0,48±0,024  | 0,55±0,02              |
| 0,65±0,043  | 0,75±0,035*            |
| 0,10±0,006* | 0,13±0,005             |
| 1,97±0,045  | 2,22±0,12              |

ость различий по сравнению с контро-

стрессорного воздействия. Предварительное же введение ионола практически полностью отменяло стресс-реакцию, так как во все сроки наблюдения значения исследуемых показателей в данной группе животных не отличались от таковых у интактных животных.

Таким образом, нами установлено, что ЭБС приводит к значительным изменениям клеточных мембран гепатоцитов и системы цито-

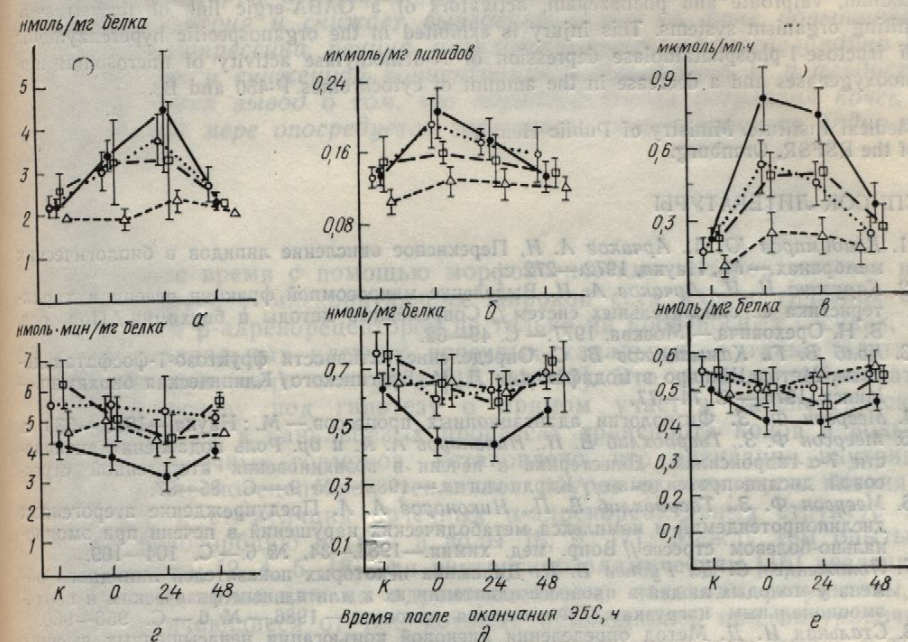


Рис. 2. Защита повреждающего действия шестичасового эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на печень крыс предварительным введением антиоксиданта и активаторов ГАМК-эргической системы.

хрома P<sub>450</sub> — основного звена дезинтоксикационной функции организма. Это положение означает, что экстремальные состояния, вызывающие стресс, нарушая функцию печени, могут существенно потенцировать повреждающее действие различных химических факторов. Полученные результаты свидетельствуют также, что синтетический антиоксидант ионол является более эффективным гепатопротектором, чем вальпроат натрия и феназепам, что определяет целесообразность дальнейшей разработки антиоксидантной защиты организма при стрессорных ситуациях.

Результаты исследования действия шестичасового эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на клетки печени

| Феназепам (n=8) | ЭБС (n=12)  | Ионол и ЭБС (n=8) | Вальпроат натрия и ЭБС (n=8) | Феназепам и ЭБС (n=8) |
|-----------------|-------------|-------------------|------------------------------|-----------------------|
| 6,25±0,42*      | 3,20±0,21*  | 4,54±0,27         | 5,36±0,55                    | 4,40±0,39             |
| 0,24±0,03       | 0,88±0,07   | 0,28±0,04         | 0,55±0,06*                   | 0,5±0,04*             |
| 0,55±0,027      | 0,41±0,016* | 0,53±0,026        | 0,50±0,02                    | 0,45±0,03             |
| 0,75±0,05*      | 0,44±0,026  | 0,63±0,034        | 0,62±0,026                   | 0,58±0,04             |
| 0,14±0,014      | 0,19±0,014* | 0,12±0,008        | 0,18±0,012*                  | 0,15±0,004*           |
| 2,59±0,19       | 4,44±0,69*  | 2,36±0,1          | 3,72±0,28*                   | 3,28±0,68             |

ем (P<0,05).



