

УДК: 615.27
©Коллектив авторов

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТОКСИЧНОСТИ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ: РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЭФФЕКТЫ L-КАРНИТИНА

И.Л.Быков^{1,2}, А. Н. Мальцев², В. А. Гуринович¹, Л.И. Нефёдов¹

¹Институт биохимии НАН Беларуси

²Медицинский университет, 230017, БЛК 50, Гродно, Республика Беларусь,
факс: 33-41-21, эл. почта: bykovil@netscape.net

Ингибирование процессов митохондриального β -окисления жирных кислот и нарушения метаболизма L-карнитина являются существенными проявлениями гепатотоксичности вальпроевой кислоты (ВК). Нами изучены изменения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в качестве дополнительного механизма, потенцирующего токсичность ВК, а также возможность коррекции этих нарушений L-карнитином. ВК вводили в течение 8 дней в дозе 200 мг/кг крысам двух экспериментальных групп, одна из которых получала также L-карнитин (100 мг/кг). Были оценены следующие показатели: содержание малонового диальдегида (МДА), концентрация гидроперекисей липидов, антиоксидантная активность (АОА), активность каталазы, содержание дисульфидных (S-S) групп в плазме крови и тканях. Хотя существенных изменений в содержании гидроперекисей и активности каталазы не отмечалось, однако у крыс, получавших ВК наблюдалось снижение АОА и концентрации S-S групп в плазме крови. Введение L-карнитина нивелировало эти изменения, повышая АОА и содержание S-S групп. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация процессов ПОЛ является дополнительным фактором токсичности ВК и может быть функционально значимой. Применение L-карнитина с целью снижения токсичности ВК, оправдано не только с точки зрения повышения элиминации токсичных продуктов катаболизма ВК, нормализации внутриклеточного пула КоА, но также и для снижения выраженности окислительных поражений, индуцируемых ВК.

Ключевые слова: вальпроат, токсичность, перекисное окисление липидов, L-карнитин

ВВЕДЕНИЕ. Вальпроевая кислота (ВК) является одним из эффективных противосудорожных препаратов, используемых в клинике с целью терапии различных форм эпилепсии [1]. Как правило, ВК обычно хорошо переносится пациентами, однако, у некоторых из них при длительном приеме возможно развитие осложнений, связанных с гепатотоксичностью ВК и ее метаболитов, образующихся в результате ω -окисления (2-N-пропил-4-пентеновая и 2-N-пропил-4-гидрокси-пентеновая кислоты) [2, 3]. Токсичность ВК может проявляться в виде микровезикулярного стеатоза печени, гипогликемии, гипераммониемии, снижении концентрации β -гидроксibuтирата в плазме крови, а также повышенной экскреции дикарбоновых органических кислот в результате ингибирования β -окисления жирных кислот, что также подтверждается снижением активности ацил-КоА-дегидрогеназ в печени и компенсаторным увеличением экспрессии мРНК этих ферментов в печени и других тканях [4, 5].

Окислительный стресс, ведущий к нарушениям мембранной проницаемости и метаболическим сдвигам на клеточном и тканевом уровне, занимает важное

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧНОСТИ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ

место в ряду механизмов гепатотоксичности ВК у человека. Известно, что ВК снижает поступление окисленного глутатиона в желчь; в свою очередь, перехватчики свободных радикалов (α -токоферол, N-N'-дифенил-*p*-фенилендиамин) нивелируют токсичность ВК в культуре гепатоцитов [6, 7]. К тому же, продукты ω -окисления ВК и ненасыщенные аддукты ВК также вносят определенный вклад в генерацию свободных радикалов [5]. Важно отметить, что активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) отмечается не только в экспериментах на животных, но также и у пациентов, получавших ВК в качестве антиконвульсанта [8]. Еще одним побочным эффектом ВК, потенцирующим ее гепатотоксичность, является вторичная недостаточность L-карнитина, развивающаяся в результате снижения почечной реабсорбции этого эндогенного метаболита, его предшественников, а также угнетения биосинтеза L-карнитина в печени. Вторичная недостаточность L-карнитина на фоне введения ВК проявляется снижением концентрации свободного L-карнитина в плазме крови и увеличением экскреции его эфиров с жирными кислотами, в том числе и вальпроил-L-карнитина [9]. L-карнитин играет ключевую роль в механизмах β -окисления жирных кислот, обеспечивая транспорт длинноцепочечных ацил-КоА через внутреннюю митохондриальную мембрану. К тому же, L-карнитин рассматривается и как соединение с широким спектром биологической, включая антиоксидантную, активности. Показано, что L-карнитин ингибирует процессы пероксидации в микросомах миокарда, снижает выраженность ПОЛ и восстанавливает уровень эндогенных антиоксидантов при экспериментальном атеросклерозе, снижает окислительное поражение мозга, проявляет хелатирующие свойства в отношении ионов Fe^{2+} [10-12].

Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей изменений процессов ПОЛ в плазме крови и тканях крыс, индуцированных введением ВК, а также возможность коррекции нарушений свободнорадикального окисления экзогенно вводимым L-карнитином.

МЕТОДИКА. В экспериментах были использованы белые крысы-самцы (питомник РАМН "Рапполово", г. Санкт-Петербург) весом 180 - 200 г, содержащиеся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к питьевой воде. Крысам первой экспериментальной группы (ВК, $n=7$) в течение 8 дней вводили вальпроат Na в суточной дозе 200 мг/кг, в/бр 1 раз в сутки, крысы второй экспериментальной группы (ВК + L-карнитин, $n=7$) получали кроме ВК, L-карнитин (100 мг/кг в/бр). Животным контрольной группы (Контроль, $n=7$) вводили изобъемно изотонический раствор хлорида натрия в аналогичные сроки. По окончании эксперимента крыс декапитировали под пентабарбиталовым наркозом (60 мг/100 г), быстро извлеченные ткани помещали в жидкий азот, плазму крови получали центрифугированием при + 4°C. Содержание малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и тканях определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [13]. Содержание гидроперекисей липидов ("быстрая вспышка", БВ) и антиокислительную активность (АОА) плазмы крови и тканей оценивали хемилюминесцентным методом на хемилюминометре ХЛМ1Ц-01 [14]. Активность каталазы в плазме крови и тканях определяли по методу [15]. Определение концентрации дисульфидных групп (S-S) в плазме крови проводили на анализаторе АСГ методом амперометрического титрования [16]. В эксперименте использовали L-карнитин и ВК фирмы "Sigma" (США), все остальные реактивы качества не ниже х.ч. после предварительной перекристаллизации.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ для медико-биологических исследований ВМДР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Введение ВК в дозе 200 мг/кг, согласно литературным данным, вызывающей при длительном введении биохимические и морфологические нарушения у экспериментальных животных [2-5], в нашем эксперименте привело к существенному снижению АОА и содержания S-S групп

в плазме крови крыс (табл.). Аналогичная тенденция прослеживалась в отношении этих показателей и в тканях, хотя отмеченные изменения были менее выражены. Концентрация МДА в печени была также несколько выше по сравнению со значениями в контрольной группе животных. У крыс, получавших одновременно с ВК L-карнитин, наблюдалась нормализация исследованных показателей, выражавшаяся в снижении интенсивности хемилюминесценции (БВ) в печени, увеличении АОА и содержания S-S групп плазмы крови (табл.). Следует отметить, что L-карнитин оказался эффективным в использованной нами относительно низкой дозе (100 мг/кг), лежащей в диапазоне терапевтических доз препарата, используемых как в лечебных целях в клинической практике (до 5 г/сутки), так и в экспериментах на животных (20 - 300 мг/кг) [9, 11, 12].

Таблица. Характеристика процессов перекисного окисления липидов в плазме крови и тканях крыс при введении вальпроата натрия (ВК, 200 мг/кг, 8 дней) и L-карнитина (ВК + L-карнитин, 100 мг/кг, 8 дней).

	Контроль	ВК	ВК + L-карнитин
Печень			
«БВ», имп/сек	243 ± 40	249 ± 29	94 ± 16 *#
АОА, %	36,3 ± 8,7	52,9 ± 18,3	56,3 ± 6,1
МДА	21,6 ± 1,9	23,0 ± 2,3	19,0 ± 2,0
Каталаза, мкмоль/мин/г	71,3 ± 6,2	71,5 ± 6,5	61,8 ± 5,6
Плазма			
«БВ», имп/сек	11,1 ± 1,3	9,3 ± 1,5	14,0 ± 2,1
АОА, %	10,1 ± 2,1	27,7 ± 4,6 *	16,4 ± 2,7#
S-S группы, мкМ	152 ± 19,3	120 ± 4,5 *	194 ± 13,2 #
МДА, нмоль/мл	16,6 ± 2,3	20,6 ± 1,8	28,4 ± 2,7 *
Каталаза, мкмоль/мин/мл	4,7 ± 0,6	3,7 ± 0,2	4,2 ± 0,3
Мозг			
Каталаза, мкмоль/мин/г	65,22 ± 8,63	60,67 ± 6,90	73,13 ± 4,44
МДА, нмоль/г	23,13 ± 2,42	19,53 ± 3,37	27,62 ± 2,86

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе # - $p < 0,05$ по отношению к группе ВК

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что введение ВК вызывает выраженные изменения процессов свободнорадикального окисления у крыс. Эти данные согласуются с наблюдениями о генерации супероксид-аниона и продуктов пероксидации липидов под действием ВК, полученными в экспериментах как на людях, так и на лабораторных животных и подтверждают важную роль активации ПОЛ в реализации гепатотоксичности препарата [3, 5, 6].

В организме млекопитающих из ВК в реакциях ω -окисления образуются ненасыщенные метаболиты (2-N-пропил-4-пентеновая, 2-N-пропил-2-пентеновая кислоты, 2-ОН-, 3-ОН-, 4-ОН-вальпроовая кислоты), этот процесс сопровождается генерацией активных форм кислорода и образованием токсичных гидроперекисей липидов [3]. К тому же, показано, что ВК и продукты ω -окисления ВК (2-N-пропил-4-пентеновая и 2-N-пропил-4-гидроксипентановая кислоты, 3-кето-2-пропилпентаноил-КоА, 2-пропилпентаноил-КоА, 3-гидрокси-2-пропилпентаноил-КоА) угнетают глюконеогенез и ингибируют митохондриальные и микросомальные метаболические реакции клетки [17]. Активные радикалы кислорода способны проникать непосредственно через митохондриальную и эндоплазматическую мембраны и реагировать с полиненасыщенными липидами других мембранных структур, нарушая их функции. Предполагается, что ингибирование глюконеогенеза, наряду с угнетением процессов β -окисления

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧНОСТИ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ

жирных кислот, под действием ВК, является одним из важнейших проявлений ее токсичности и предшествует аккумуляции эндогенных продуктов перекисидации липидов в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуи.

Ингибирование реакций глюконеогенеза под действием ВК, в свою очередь, может быть также обусловлено нарушением внутриклеточного гомеостаза NADPH, в результате повышенного окисления восстановленного глутатиона в процессе детоксикации гидроперекисей липидов. Действительно, после однократного введения ВК крысам (500 мг/кг, подкожно), наблюдалось 30% снижение интенсивности NADPH флуоресценции поверхности печени, коррелировавшее с увеличением продукции H_2O_2 и снижением уровня высвобождения окисленного глутатиона в желчь [6].

В физиологических условиях гидроперекиси липидов восстанавливаются глутатионпероксидазой, что сопровождается окислением GSH в GSSG, который, в свою очередь, восстанавливается глутатионредуктазой, использующей NADPH в качестве восстанавливающего эквивалента [18]. Однако, при интенсификации процессов ПОЛ наблюдается снижение концентрации NADPH в печени и отношения NADPH/ NADH + NADPH, что ведет к снижению скорости восстановления глутатиона. В соответствии с этим положением в настоящем исследовании обнаружено снижение содержания дисульфидных групп и параллельное уменьшение АОА в плазме крови крыс, получавших ВК.

В нашем эксперименте на фоне окислительного стресса, индуцированного введением ВК, L-карнитин проявлял антиоксидантные свойства, повышая АОА плазмы крови и снижая уровень гидроперекисей липидов в печени. Отмеченная антиоксидантная активность L-карнитина важна и с точки зрения того, что прием L-карнитина вместе с ВК больным с судорожным синдромом предотвращает развитие симптомов вторичной недостаточности L-карнитина, вызываемой введением ВК, а также нивелирует гепатотоксичность ВК у человека [19].

Ряд экспериментальных и клинических наблюдений свидетельствуют о том, что L-карнитин и некоторые его производные (ацетил-L-карнитин, пропионил-L-карнитин) защищают миокард экспериментальных животных и человека от окислительного стресса при состояниях ишемии-реперфузии [20]. К тому же, у L-карнитина и ацетил-L-карнитина обнаружена прямая антирадикальная активность, подтвержденная в экспериментах *in vitro* [10, 12]. В связи с этим L-карнитин и его эфиры можно отнести к системе первичной антиоксидантной защиты организма (α -токоферол, β -каротин, аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), ограничивающей окислительные повреждения, благодаря перехвату первичных продуктов перекисного окисления, и терминирующей развитие свободнорадикальных реакций. Предполагается, что L-карнитин и его производные могут участвовать и в функционировании системы вторичной антиоксидантной защиты, роль которой состоит в замене модифицированных под действием продуктов окисления молекул биомембран, для поддержания интегральности клетки в целом. Реализация этих эффектов осуществляется главным образом через механизмы модуляции обмена фосфолипидов. Действительно, продемонстрированы прямые мембраностабилизирующие эффекты L-карнитина в отношении мембран эритроцитов и гепатоцитов человека, в основе которых лежит прямое взаимодействие L-карнитина с белками цитоскелета эритроцитарной мембраны, взаимодействие с мембранами митохондрий гепатоцитов, реализуемые через модуляцию обмена кардиолипина, снижение повышенной текучести биомембран, индуцированное введением пальмитоил-L-карнитина [12, 21].

В этом контексте важно подчеркнуть роль L-карнитина и в поддержании соответствующего равновесия между процессами деацилирования и реацилирования (внедрение не окисленных жирных кислот в лизофосфолипиды мембран) для сохранения структурной и функциональной целостности биомембран при окислительном стрессе. L-карнитин и его длинноцепочечные

ацилы являются важными компонентами функционирования этой системы вторичной антиокислительной защиты, рассматриваемой в качестве основного компонента протекции клетки, действующей в условиях недостаточной эффективности первичных механизмов защиты.

Таким образом, результаты настоящей работы подтверждают роль активации процессов ПОЛ в реализации гепатотоксичности ВК. L-карнитин в этих условиях снижает выраженность окислительного стресса, повышая активность антиокислительной системы. В этой связи, применение L-карнитина для снижения токсичности ВК, оправдано не только с точки зрения повышения элиминации токсичных продуктов катаболизма ВК в виде вальпроил-L-карнитина, нормализации внутриклеточного пула КоА, но также и для снижения выраженности окислительных поражений, индуцируемых ВК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davis R., Peters D.H., Mc Tavish D. (1994) *Drugs*, **42**, 332 - 372.
2. Loscher W., Wahnshaffe K., Honack D. et al. (1992) *Epilepsy Res.*, **13**, 187-198.
3. Rittle A.E., Rettewmeier A.W., Howard W.N., Baillie T.A. (1987) *Science*, **235**, 890-893.
4. Kibayashi M., Nagao M., Chiba S. (1999) *Pediatr. Int.*, **41**, 52 - 60.
5. Kassahum K., Hu P., Glillo M.P., et al. (1994) *Chem. Biol. Interact.*, **90**, 253-275.
6. Olson M.J., Handler J.A., Thurman R.G. (1986). *Mol. Pharmacol.*, **30**, 520-525.
7. Buchi K.N., Gray P.D., Rollins D.E. and Tolman K.G. (1984) *J. Clin. Pharmacol.*, **24**, 148 - 154.
8. Yuksel A., Cengiz M., Seven M., Klutin T. (2000) *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **11**, 73 - 81.
9. Stadler D.D., Bale J.F., Chenard C.A., Rebouche C.J. (1999) *Metabolism*, **48**, 74 - 79.
10. Schinetti M.L., Rossini D., Greco R., Bertelli A. (1987) *Drugs Exp. Clin. Res.*, **13**, 509 - 515.
11. Koudelov J., Mourek J., Rauchota H. (1994) *Physiol. Res.*, **43**, 387 - 389.
12. Geremia E., Santoro C., Scalia M. et al. (1988) *Med. Sci. Res.*, **7**, 699 - 700.
13. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979) *Analyt. Biochem.* **95**, 351 - 358.
14. Владимиров Ю.А., Оленев В.И., Суслов Т.В. (1974) Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. М., Наука.
15. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988) *Лаборат. Дело*, №1, 16-19.
16. Капунникова Н.П., Омелянчик С.Н., Слышенков В.С., Быков И.Л., Преображенский Д.В., Мальцев А.Н. (1998) *Эколог. антропология. Мат. VI Межд. научно практ. конф. "Экология человека в постчернобыльский период"*, с. 69 - 71.
17. Rogiers V., Kndenberghe Y., Vereruyse A. (1985) *Xenobiotica*. **15**, No 8-9. 759-765.
18. Beutler E. (1974) In: (Flohe L., e.a., eds) *Glutathione*, George Thieme. Stuttgart, pp. 109 - 114.
19. Ishikura H., Matsuo N., Matsubara M. et al. (1996) *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 55-58.
20. Paulson D.J., Schnidt M.J., Shug A.L. (1984) *Basic Res. Cardiol.*, **79**, 551-561.
21. Fritz I.B., Aarigoni-Martelli E. (1993) *TIPS*, **14**, 355 - 361.

Поступила 06.03.2002.

BIOCHEMICAL BASIS OF VALPROIC ACID TOXICITY: ROLE OF OXIDATIVE STRESS
AND EFFECTS OF L-CARNITINE

I.L. Bykov^{1,2}, A.N. Maltsev², V.A. Gurinovich², L.I. Nefyodov²

¹Institute of Biochemistry of National Academy of Science of Belarus¹,

²Medical University; BLK 50, Grodno, 230017 Republic of Belarus, fax: 33-41-21,
e-mail: bykovil@netscape.net

Reduced hepatic mitochondrial β -oxidation and changes in L-carnitine metabolism are important biochemical manifestations of valproate (VA)-induced hepatic toxicity. Lipid peroxidation activation as a possible mechanism implicated in VA - induced damage as well as the possibility of L-carnitine (LC) attenuation of lipid peroxidation activity were studied. The level of malondialdehyde (MDA), lipid peroxide concentration and antioxidant activity (AOA), catalase activity, free S-S groups content in plasma and liver homogenates from male albino rats supplemented with VA (200 mg/kg, 8 days) and VA plus LC (100 mg/kg, 8 days) were measured. There were insignificant differences in MDA formation and catalase activity in the plasma and liver of control and VA - treated groups, however decreases in the plasma AOA activity and S-S groups level were observed in VA-treated rats. The LC administration significantly decreased liver lipid peroxide concentration and increased plasma AOA activity and S-S groups. Our results suggest that lipid peroxidation may be involved as an additional mechanism for VA - induced liver damage in rats. The potential antioxidant activity of LC may be particularly relevant in understanding the pharmacological and biochemical properties of LC in VA - induced pathologic conditions.

Key words: valproate, toxicity, lipid peroxidation, L-carnitine.