

УДК 615.362:577
© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ БЕРБЕРИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩЕГО ЖЕЛЧНОГО ПРОТОКА

И.В. Зверинский, Н.Г. Мельниченко, В.А. Поплавский, И.П. Сутько,
П.Г. Телегин, А.Г. Шляхтун*

ГУ “НПЦ “Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси”,
БЛК-50, 230030 Гродно, Республика Беларусь; тел.: +375 (152) 436511;
эл. почта: zverinsky@tut.by

На 8-ые сутки после перевязки общего желчного протока у крыс в сыворотке крови значительно увеличивается как содержание общих липидов, билирубина, холестерина, так и активность АлАТ, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтрансферазы. В микросомальной фракции отмечается снижение содержания и активности монооксигеназ. Внутривентрикулярное введение берберина (10 мг/кг) в течение 6 дней приводило к частичной нормализации проницаемости цитоплазматической мембраны гепатоцитов и активности микросомальных флавиносодержащих монооксигеназ. Предполагается, что берберин является субстратом и индуктором флавиносодержащих монооксигеназ, а мембраностабилизирующий эффект берберина реализуется на уровне торможения прооксидантного статуса клеток печени.

Ключевые слова: холестаз, берберин, цитохром P450, флавиносодержащие монооксигеназы.

ВВЕДЕНИЕ. В развитии холестаза ведущая роль принадлежит детергентному действию желчных кислот, увеличение которых приводит к повреждению клеточных мембран, активации гидролаз и некрозу гепатоцитов [1]. Желчные кислоты ингибируют регенерацию гепатоцитов, активируют фиброгенез, кроме того они способствуют активации процессов свободнорадикального окисления липидов [2].

Таким образом, холестаз провоцирует целый ряд негативных биохимических изменений, приводящих к серьезным метаболическим и структурным нарушениям печени и желчевыводящих путей, что в свою очередь требует применения эффективных антихолестатических средств, которые должны способствовать не только восстановлению пассажа и состава желчи, но также обладать гепатопротекторными, противовоспалительными и антифибротическими свойствами. К таким соединениям можно отнести алкалоид берберин [3, 4].

* - адресат для переписки

Микросомальные системы окисления и конъюгации ксенобиотиков, ассоциированные с мембранами гладкого эндоплазматического ретикулума печени, являются ключевыми ферментными системами гепатоцитов, осуществляющими метаболическую трансформацию ксенобиотиков, способствуя их экскреции из организма почками (основной путь элиминации желчных кислот при вторичной билиарной обструкции) [5]. Поддержание систем микросомального окисления и конъюгации ксенобиотиков на высоком метаболическом уровне при холестазах является одним из механизмов защиты организма от токсического действия желчных кислот [6]. Следует отметить, что берберин претерпевает метаболическую трансформацию в системе микросомальных цитохром Р450-зависимых монооксигеназ печени [7]. Многие вещества, окисляющиеся в системе цитохрома Р450, являются не только субстратами, но и индукторами этой ферментной системы.

Исходя из вышеизложенного представлялось целесообразным и практически важным исследовать эффект берберина на функциональное состояние печени крыс, включая ферментные системы метаболизма ксенобиотиков при моделировании подпечёночного холестаза.

МЕТОДИКА. Опыты проведены на 30 крысах-самцах линии Wistar с начальным весом 230-250 г. Подпеченочный холестаз моделировали путём перевязки общего желчного протока под общим эфирным наркозом. В послеоперационный период животным вводили берберин в дозе 10 мг/кг, внутривентрально: первая инъекция - через 24 часа после операции, в дальнейшем один раз в сутки на протяжении 5 дней. Контрольным животным (лапаротомия без и с перевязкой желчного протока) вводили 0,85% NaCl (4 мл/кг в/б). В каждую группу входило по 10 животных.

На 8-ые сутки животных декапитировали, делали забор крови, вскрывали брюшную полость, печень перфузировали 1,15% раствором KCl, извлекали, а затем гомогенизировали этим же солевым раствором в соотношении 1:3 (масса/объём). Постмитохондриальную фракцию, полученную при помощи стандартного дифференциального центрифугирования, центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин для выделения цитозольной фракции и осадка мембран гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума (микросомальный осадок), который ресуспендировали в 0,05 М трис HCl-буфере, pH 7,4, содержащем 1 mM ЭДТА и 20% глицерина. Все процедуры проводили при температуре +4°C. Микросомы и цитозоль замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующих биохимических исследований.

При проведении эксперимента соблюдался принцип гуманного обращения с животными и учитывались рекомендации рабочей группы Федерации Европейского сообщества по науке о лабораторных животных [8].

В сыворотке крови определяли содержание билирубина, холестерина, общих липидов, триглицеридов, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) и показатели тимоловой пробы с применением коммерческих аналитических наборов НТПК "Анализ-Х" (Республика Беларусь), согласно прилагаемым инструкциям. В микросомальной фракции измеряли содержание цитохромов Р450, его каталитически неактивной формы 420, а также цитохрома b5, активность глутатион-S-трансферазы, метокси- и пентоксирезорифин деметилаз, флавинодержащих монооксигеназ, а в цитозольной - активность глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Содержание цитохрома *b5* в микросомальной фракции печени определяли по изменению разницы поглощения окисленной и восстановленной форм гемопротейна, а цитохрома P450 - по изменению величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома P450 с окисью углерода при длине волны 450 нм, для цитохрома P420 – 420 нм. В качестве восстановителя гемопротейнов использовали дитионит натрия. Концентрацию цитохрома *b5* рассчитывали по коэффициенту молярной экстинкции $164 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, цитохрома P450 - $91 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и P420 - $111 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [9, 10].

Каталитическую активность цитохром P450-зависимых монооксигеназ оценивали по скорости наработки резорруфина при О-деалкилировании метокси- и пентоксирезорруфинов по методу [11]. Реакции гидроксирования 7-метоксирезорруфина (5 пМ) и 7-пентоксирезорруфина (5 пМ) проводили в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,44, содержащем 10 мкМ MgCl_2 , 2,5 мкМ глюкозо-6-фосфат и 2,5 мг микросомального белка в объеме 0,5 мл. Реакцию инициировали 0,25 мкМ NADPH. Инкубацию проводили в течение 10 мин при 37°C. Реакцию останавливали 1 мл метанола, белок удаляли центрифугированием (3000 g в течение 10 мин). В надосадочной жидкости определяли флуоресценцию резорруфина ($\lambda_{\text{возб.}}$ - 535 нм и $\lambda_{\text{эмис.}}$ - 585 нм), используя спектрофлуориметр LS-55 PerkinElmer. Расчёт содержания резорруфина проводили по калибровочной прямой. Активность ферментов выражали в пмоль резорруфина/мин/мг микросомального белка.

Активность микросомальных флавинсодержащих монооксигеназ определяли по скорости окисления NADPH в присутствии их субстрата - имипрамина, по методу [12]. Инкубационная среда объемом 1 мл содержала 100 мМ трис-HCl буфер pH 8,4, 0,15 мМ NADPH и 1 мг микросомального белка. Перед запуском реакции имипрамином (0,1 мМ) через инкубационную среду пропускали CO в течение 1 мин, с целью ингибирования цитохром P450-зависимого окисления NADPH. Активность флавинсодержащих монооксигеназ выражали в процентах, за 100% принимали начальную скорость окисления NADPH без имипрамина.

О каталитической активности микросомальной и цитозольной глутатион-S-трансфераз судили по скорости образования конъюгата глутатиона с 1-хлор 2,4 динитробензолом (ХДНБ)[13]. Инкубационная смесь объемом 2 мл содержала 100 мМ калий-фосфатный буфер pH 6,5, 1 мМ ХДНБ, 1 мМ GSH. Реакцию запускали внесением 10 мкг микросомального белка или 1 мкг цитозольного белка и проводили в течение 2-3 мин при 25°C. Об активности фермента судили по количеству образовавшегося конъюгата GS-2,4-динитробензола, при 340 нм. Для расчета ферментативной активности использовали коэффициент молярной экстинкции конъюгата - $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

О скорости протекания глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции в цитозольной фракции судили по возрастанию оптической плотности при 340 нм в результате восстановления NADP в ходе катализируемого ферментом превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. Измерение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы проводили в среде, содержащей 0,2 М трис-HCl буфер, pH 8,0, 1 мМ NADP, 1 мМ глюкозо-6-фосфат, 1 мМ $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в объеме 1 мл. Реакцию начинали добавлением 50 мкл цитозольной фракции и проводили в течение 3 мин при 37°C. Активность фермента выражали в нмоль NADPH/мин/мг цитозольного белка.

Содержание белка в цитозольной и микросомальной фракциях определяли по методу Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [14].

ВЛИЯНИЕ БЕРБЕРИНА НА ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 4.00. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Полученные результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Через 8 суток после перевязки общего желчного протока в сыворотке крови крыс отмечено повышение активности более чем в два раза АлАТ, щелочной фосфатазы, ГГТ и содержания общих липидов. Концентрация билирубина в сыворотке крови на 8-ые сутки после перевязки общего желчного протока увеличивалась в сравнении с ложнооперированными животными в 62 раза. В микросомальной фракции печени крыс отмечено снижение суммарного содержания цитохромов P450 и b5 на 69 и 68% соответственно. Активность 7-метоксирезорифин-О-деалкилазы (цитохром P450 1A2-зависимая реакция) снижалась в два раза. Практически отсутствовала активация скорости окисления NADPH при добавлении в среду инкубации имипрамина (субстрат флавинсодержащих монооксигеназ) (табл. 1). Таким образом, перевязка общего желчного протока у крыс на 8-ые сутки характеризуется нарушением мембранных структур печени и ферментов ассоциированных с ними.

Таблица 1. Некоторые биохимические показатели сыворотки крови крыс на 8-е сутки после перевязки общего желчного протока (ОЖП) на фоне введения берберина в дозе 10 мг/кг/день, внутривентрально, в течение 6 дней.

| Показатели | Лапаротомия | | |
|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| | без перевязки ОЖП | перевязка ОЖП | перевязка ОЖП + берберин |
| АлАТ, Е/л | 11,82 \pm 1,00 | 31,86 \pm 5,43* | 17,60 \pm 1,58*# |
| Общий билирубин, мкмоль/л | 3,36 \pm 0,514 | 209,72 \pm 16,43* | 184,71 \pm 24,16* |
| Гамма-глутамилтрансфераза, Е/л | 28,27 \pm 2,10 | 63,67 \pm 5,34* | 46,46 \pm 4,42*# |
| Холестерин, ммоль/л | 1,84 \pm 0,11 | 3,81 \pm 0,40* | 4,04 \pm 0,52* |
| Щелочная фосфатаза, Е/л | 520,91 \pm 39,31 | 1115 \pm 118,30* | 745,01 \pm 68,96*# |
| Общие липиды, г/л | 3,36 \pm 0,19 | 6,86 \pm 0,69* | 6,53 \pm 0,57* |
| Триглицериды ммоль/л | 3,65 \pm 0,37 | 3,16 \pm 0,66 | 3,77 \pm 0,97 |

Примечание. Здесь и в таблице 2: * - $p < 0,05$ к группе "лапаротомия без перевязки ОЖП"; #- $p < 0,05$ к группе "лапаротомия перевязка ОЖП".

Назначение берберина в дозе 10 мг/кг в период вторичной билиарной обструкции не усугубляло биохимической картины крови, более того, отмечается снижение активности АлАТ, щелочной фосфатазы и ГГТ на 45, 23 и 27% соответственно по отношению к животным контрольной группы (лапаротомия с перевязкой желчного протока). В микросомальной и цитозольной фракциях отмечается несколько иная ситуация: в частности, назначение берберина приводило к снижению активности микросомальной глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, в тоже время активность флавинсодержащих монооксигеназ фактически была на уровне ложнооперированных животных (табл. 2).

Таблица 2. Активность и содержание некоторых ферментов метаболизма ксенобиотиков и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 8-е сутки после перевязки общего желчного протока (ОЖП) на фоне введения берберина в дозе 10 мг/кг/день, внутрибрюшинно, в течение 6 дней.

| Показатели | Лапаротомия | | |
|---|-------------------|---------------|--------------------------|
| | без перевязки ОЖП | перевязка ОЖП | перевязка ОЖП + берберин |
| Цитохром Р450, нмоль/мг | 0,51±0,04 | 0,16±0,04* | 0,15±0,03* |
| Цитохром Р420, нмоль/мг | --- | 0,051±0,02* | 0,098±0,03* |
| Цитохром b5, нмоль/мг | 0,33±0,02 | 0,15±0,02* | 0,17±0,02* |
| 7-Метоксирезорусифин-О-деэтилаза, рнмоль/мг/мг | 49,54±9,68 | 24,04±4,75* | 14,71±3,78* |
| 7-Пентоксирезорусифин-О-деэтилаза, рнмоль/мг/мг | 13,23±2,72 | 11,05±3,04 | 8,37±2,41 |
| Цитозольная глутатион-S-трансфераза, мкмоль GS-XДНБ/мг/мг | 0,94±0,09 | 0,97±0,09 | 0,91±0,06 |
| Окисление NADPH (+наилпримен), % | 203±41,32 | 105,6±16,02* | 187,7±7,01* |
| Микросомальная глутатион-S-трансфераза, нмоль GS-XДНБ/мг/мг | 85,39±8,29 | 68,94±5,27 | 47,91±3,84* |
| Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, нмоль NADPH/мг/мг | 51,16±7,21 | 39,89±3,93 | 32,08±2,10* |

Снижение ксенобиотико-метаболизирующей функции печени обнаружено при всех формах холестаза, как в эксперименте, так и в клинике [15, 16].

В механизме развития нарушения детоксицирующей функции печени при холестазе ведущая роль принадлежит желчным кислотам. Хорошо известно, что моно- и дигидроксихолановые желчные кислоты являются поверхностно-активными соединениями и могут вызывать структурные изменения мембраны, её вязкости и нарушение мембранных белок-липидных взаимодействий [1]. Ранее нами в серии экспериментов было установлено, что цитохром Р450 (I фаза метаболизма ксенобиотиков) более подвержен токсическому действию желчных кислот, чем ферменты II фазы метаболизма чужеродных веществ [17-19]. В отличие от флавинодержащих монооксигеназ цитохром Р450-зависимые относятся к монооксигеназам внешнего типа и для катализа используют электроны, поставляемые в основном NADPH-цитохром Р450 редуктазой, поэтому ингибирующее действие желчных кислот на активность цитохрома Р450 реализуется первоначально на уровне электрон-транспортной цепи и только при значительном увеличении их содержания проявляется прямое ингибирование цитохрома Р450.

Введение берберина в период билиарной обструкции не оказывало влияние на содержание и активность цитохрома Р450, в тоже время наблюдалась нормализация каталитической активности флавинодержащих монооксигеназ. Исходя из полученных результатов можно предположить: первое - берберин является субстратом и индуктором флавинодержащих монооксигеназ; второе - при снижении активности цитохром Р450-зависимых монооксигеназ при холестазе, в качестве альтернативного пути, желчные кислоты могут окисляться в системе флавинодержащих монооксигеназ, как одного из механизмов защиты печени от их повреждающего действия [5, 6].

Холестаз характеризуется нарушением про- и антиоксидантного статуса гепатоцитов, активацией перекисного окисления мембранных липидов, и как следствие нарушением структуры, функции и проницаемости клеточных мембран [20].

Мы полагаем, что мембранопротекторный эффект берберина (снижение активности АЛАТ, ГГТ, щелочной фосфатазы), по-видимому, связан с его способностью активировать ферменты антиоксидантной защиты [21], взаимодействовать с радикалами и активными формами кислорода и азота [22], а также ингибировать ферменты их нарабатывающие [23]. К другим метаболическим эффектам гепатопротекторного действия берберина можно отнести активацию АМР-зависимой протеинкиназы [24], что может приводить к частичной коррекции сниженного энергетического баланса клетки при холестазах [25] через активацию гликолиза и ингибирования пентозофосфатного пути. В пользу этого предположения свидетельствует снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при введении берберина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Назначение берберина в период вторичной билиарной обструкции не усугубляет течение патологического процесса.

2. Берберин оказывает мембраностабилизирующий эффект на клетки печени при подпечёночном холестазе.

3. Нормализация активности флавиносодержащих монооксигеназ при назначении берберина может свидетельствовать об его окислении в данной ферментной системе.

Исходя из полученных результатов и литературных данных, можно сделать предварительное заключение, что берберин является перспективным лекарственным препаратом для включения в комплексную терапию при холестазах с целью предупреждения мембранометаболических нарушений печени и билиарного фиброза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monte M.J., Marin J.J.G., Antelo A., Vazquez-Tato J. (2009) *Gastroenterology*, **17**, 804-816.
2. Sedlacek N., Jia Ji-D., Bauer M., Herbst H., Ruehl M. (2001) *Amer. J. Pathol.*, **158**, 1239-1244.
3. Sun X., Zhang X., Hu H., Lu Y. (2009) *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1533-1537.
4. Lin W.F.C., Lin J.Y. (2011) *J. Agric. Food. Chem.*, **59**, 184-192.
5. Kliewer S.A., Wilson T.M. (2002) *J. Lipid. Res.*, **43**, 359-364.
6. Marschall H.U., Wagner M., Bodin K., Zollner G., Fickert P., Gumbold J. (2006) *J. Lipid Res.*, **47**, 582-592.
7. Liu Y., Hao H., Xie H. (2009) *J. Pharm. Sci.*, **98**, 43914401.
8. Копаладзе P.A. (2000) *Успехи физ. наук*, **31**(3), 79-90.
9. Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 23702378.
10. Omura T., Sato R. (1967) *Meth. Enzymol.*, **10**, 556-561.
11. Burke M.D., Prough R.A., Mayer R.T. (1977) *Drug Metab. Dispos.*, **5**, 1-8.
12. Itoh K., Kimura T., Yokoi T., Itoh S., Kamataki T. (1993) *Biochem. Biophys. Acta*, **1173**, 165171.
13. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 130139.
14. Lowry O.N., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.G. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

15. *Lytton S.D., Bery U., Neweth A., Ingelman-Sundberg M.* (2002) Clin. Exp. Immunol., **127**, 293-302.
16. *Fukushima S., Okuma H., Shibatani N., Nakahashi Y., Seki T., Okazaki K.* (2009) World J. Gastroenterol., **14**, 2556-2560.
17. *Зверинский И.В., Карпович В.Е., Бушма М.И., Легонькова Л.Ф., Мельниченко Н.Г., Нечипоренко Л.И., Никитин В.С.* (1998) Экспер. клин. фарм., **61**, 33-36.
18. *Бушма М.И., Легонькова Л.Ф., Зверинский И.В., Васильев А.В.* (2000) Бюлл. экспер. биол. мед., **129**(1), 56-60.
19. *Сутько И.П., Легонькова Л.Ф., Мельниченко Н.Г., Судникович Е.Ю.* (2002) Весці НАН Беларусі, №3, 59-62.
20. *Ara C., Kirimlioglu H., Karabulut A.B., Cobah S., Ay S.* (2005) J. Surg. Res., **127**, 112-117.
21. *Zhou J.Y., Zhou S.W.* (2011) Fitotherapia, **82**, 184-189.
22. *Jang M.H., Kim H.Y., Kang K.S., Yokozawa T., Park J.H.* (2009) Arch. Pharm. Res., **32**, 341-345.
23. *Domitrovic R., Jakovac H., Blagojevic G.* (2011) Toxicology, **280**, 33-43.
24. *Lee Y.S., Kim W.S., Kim K.H.* (2006) Diabetes, **55**, 2256-2264.
25. *Polo A.P., Oliveria P.J., Moreno A.J.M., Palmeria C.M.* (2000) Toxicol. Sci., **57**, 177-185.

Поступила: 02. 09. 2011.

**THE EFFECT OF BERBERINE ADMINISTRATION OF EVALUATION
OF THE FUNCTIONAL STATE OF RAT LIVER AFTER LIGATION
OF COMMON BILE DUCT**

I.V. Zverinsky, N.G. Melnichenko, V.A. Poplavsky, I.P. Sutko, P.G. Telegin, A.G. Shlyahatun

Institute of Pharmacology and Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, BLK-50,
Grodno, 230030 Republic of Belarus; tel.: +375 (152) 436511; e-mail: zverinsky@tut.by

On the eighth day after ligation of the common bile duct in rats a significant increase in the serum content of total lipids, cholesterol bilirubin and ALT, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyltransferase was observed. In the microsomal fraction there was a marked decrease in the content and activity of microsomal monooxygenases. Intraperitoneal injection of berberine (10 mg/kg) for 6 days caused a partial normalization of permeability of hepatocytes plasma membranes and activity of microsomal flavin-containing monooxygenases. It is suggested that berberine is a substrate and inducer of flavin-containing monooxygenases. Membrane-stabilizing effect of berberine is probably realized at the level of inhibition of prooxidant status of liver cells.

Key words: Cholestasis, berberine, cytochrome P450, flavin-containing monooxygenases.