

УДК 577.151.042+57.084.1

А.Г. ШЛЯХТУН

заведующий отраслевой лабораторией биологически активных веществ¹

Ю.З. МАКСИМЧИК

старший научный сотрудник отраслевой лаборатории по мониторингу микронутриентного статуса¹

Е.Ф. РАДУТА

старший научный сотрудник отраслевой лаборатории биологически активных веществ¹

И.П. СУТЬКО, канд. биол. наук

старший научный сотрудник отраслевой лаборатории биологически активных веществ¹

Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие

«Институт биохимии биологически активных соединений

Национальной академии наук Беларуси»,

г. Гродно, Республика Беларусь

Статья поступила 6 октября 2022 г.

**ВЛИЯНИЕ БЕТУЛИНА НА АКТИВНОСТЬ
КАРНИТИН-ПАЛЬМИТОИЛТРАНСФЕРАЗЫ 1 ТИПА
В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС**

Впервые показано, что бетулин увеличивает активность карнитин-пальмитойлтрансферазы I типа в митохондриях печени крыс in vivo. Выявлена сильная отрицательная корреляция между активностью фермента и уровнями свободных жирных кислот в крови. Установлено, что in vitro бетулин не влияет на активность фермента. Предполагается, что активация карнитин-пальмитойлтрансферазы I in vivo может быть обусловлена влиянием бетулина на экспрессию либо на посттрансляционную модификацию фермента.

Ключевые слова: бетулин, карнитин-пальмитойлтрансфераза, печень, митохондрии, обмен липидов.

SHLYANTUN A.H.

Head of the laboratory¹

MAKSIMCHYK YU.Z.

Senior Researcher¹

RADUTA E.F.

Senior Researcher¹

SUTSKO I.P., PhD in Biol. Sc.

Senior Researcher¹

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

**EFFECT OF BETULIN ON CARNITINE-PALMITOYLTRANSFERASE-I ACTIVITY
IN RATS LIVER**

The study on the effects of betulin on carnitine palmitoyltransferase I in rat liver mitochondria was performed. It was shown that betulin elevates the activity of enzyme in vivo. Strong negative correlation was found between carnitine palmitoyltransferase I activity in rat liver mitochondria and free fatty acids content in blood serum. Betulin had no direct effect on enzyme activity as it was demonstrated based on in

vitro studies. It was concluded that upregulation of protein content or changes on the level of posttranslational modification may be related to the increased activity enzyme in rat liver mitochondria.

Keywords: *betulin, carnitine palmitoyltransferase, liver, mitochondria, lipid metabolism.*

Введение. Нарушение обмена липидов является важнейшей социальной и медико-биологической проблемой современности. По данным ВОЗ, сердечно-сосудистые заболевания и диабет – патологии, связанные с нарушениями обмена липидов и самым частым их проявлением – дислипидемией, на протяжении многих лет входят в тройку лидеров причин смертности населения [1]. Известно, что дислипидемия является основным фактором риска в развитии сердечно-сосудистой патологии, сахарного диабета и инсулинорезистентности, ожирения и других заболеваний [2]. Терапия нарушений липидного обмена использует как консервативные немедикаментозные способы коррекции, например, изменение образа жизни, увеличение физической активности и диетотерапию, так и фармакологические вмешательства, направленные на устранение дислипидемии. Наиболее часто применяемыми лекарственными средствами являются ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (статины), активаторы рецепторов пролиферации пероксисом (фибраты), секвестранты обратного захвата желчных кислот и другие препараты. Учитывая относительную ограниченность и значительное количество побочных эффектов синтетических препаратов, огромный интерес представляет поиск природных субстанций, обладающих гиполипидемическим действием [3].

Бетулин является природным пентациклическим тритерпеноидом ряда лупана и проявляет различные виды биологической активности, в том числе гиполипидемическую.

Установлено, что бетулин селективно блокирует созревание факторов транскрипции SREBP-2. Ингибирование созревания SREBP-2 бетулином сопровождается снижением биосинтеза холестерина *de novo*. Известно, что SREBP-2 регулирует биосинтез холестерина, но не участвует напрямую в метаболизме ТГ и СЖК. В экспериментах бетулин снижал выраженность диет-индуцированного ожирения у мышей, уменьшал содержание липидов в сыворотке крови и тканях и повышал чувствительность

к инсулину [4]. Нами также установлено, что бетулин нормализует уровни ТГ, липопротеинов и жирных кислот в крови и печени крыс при различных экспериментальных патологиях, в том числе при сахарном диабете 2 типа, алкогольном и неалкогольном стеатогепатитах у крыс [5, 8].

Для объяснения эффектов бетулина на обмен ТГ и СЖК выдвинута гипотеза о том, что бетулин способен активировать катаболизм СЖК и ТГ в печени путем влияния на активность, экспрессию или посттрансляционную модификацию ферментов, обеспечивающих транспорт и окисление СЖК. В качестве первой возможной мишени для действия бетулина рассмотрен митохондриальный фермент, относящийся к семейству ацилтрансфераз, карнитинпальмитоилтрансфераза 1 (КФ 2.3.1.21).

КПТ1 является первым и скоростью-лимитирующим ферментом карнитиновой транспортной системы, обеспечивающей транспорт длинноцепочечных жирных кислот из цитозоля в митохондриальный матрикс, где они подвергаются β -окислению. КПТ1 локализована на наружной митохондриальной мембране и катализирует перенос ацильной группы с активированных длинноцепочечных жирных кислот на карнитин, с образованием свободного КоASH и ацилкарнитина, который далее переносится через внутреннюю митохондриальную мембрану белком-переносчиком, карнитин-ацилкарнитин-транслоказой.

Идентифицировано 3 изоформы КПТ1, обозначаемые как КПТ-1А, КПТ-1В и КПТ-1С. Печёночная изоформа (КПТ-1А) локализована во всех клетках, за исключением клеток скелетных мышц и бурой жировой ткани. Мышечная изоформа (КПТ-1В) экспрессируется в миокарде, клетках скелетной мускулатуры и в бурой жировой ткани. КПТ-1С экспрессируется преимущественно в головном мозге и семенниках [6].

Установлено, что изменение активности КПТ1 вносит существенный вклад в развитие различных патологий, связанных с обменом

липидов, как, например, сахарный диабет, стеатогепатит и других [7].

Регуляция активности фермента изучена недостаточно. Основным метаболическим регулятором активности КПП1 выступает малонил-КоА – метаболит, участвующий в биосинтезе жирных кислот, который ингибирует фермент. В ряде исследований показано, что регуляция активности КПП1 может осуществляться на уровне экспрессии белка фермента под влиянием тиреоидных и половых гормонов, инсулина. Посттрансляционная регуляция активности КПП1 происходит путем фосфорилирования, ацетилирования или нитрования аминокислотных остатков фермента [7].

Установлен ряд нутриционных регуляторов КПП1, в частности показано активирующее влияние на карнитинпальмитоилтрансферазную активность митохондрий кверцетина и ряда изофлавонов. Также известны фармакологические регуляторы активности КПП1 как активирующие фермент (агонисты рецепторов пролиферации пероксисом, прежде всего, фибраты), так и ингибирующие его активность (триметазидин, амиодарон, пергексиллин, производные аминокарнитина и др.) [7].

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в установлении роли карнитинпальмитоилтрансферазы 1 типа в гиполлипидемическом действии бетулина путем исследования его действия на активность фермента в печени крыс.

Материалы и методы исследований. Использованные в работе реактивы имели квалификацию не ниже, чем «химически чистый». Бетулин выделяли из коры *Betula pendula Roth.* путем экстракции, в соответствии с описанным ранее методом [8]. В качестве субстратов КПП1 использовали пальмитоил-КоА (Sigma-Aldrich P9716) и L-карнитин (Sigma-Aldrich C0283). Для оценки общего количества свободного КоASH, образующегося в результате конкурирующих реакций, использовали D-карнитин (Sigma-Aldrich C8835). В качестве ингибитора карнитинпальмитоилтрансферазной активности использован 4-гидрокси-L-фенилглицин (Sigma-Aldrich 56160). Буферные растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной на деионизаторе Merk Millipore Direct Q3 (США).

Для оценки непосредственного воздействия бетулина на активность КПП1 выполнена серия экспериментов *in vitro*, в которых после 30 минут инкубирования выделенных из печени самцов крыс митохондрий с различными концентрациями бетулина (0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 мкг/мл) проводилось измерение активности фермента.

Для исследования влияния бетулина на активность КПП1 печени на уровне живого организма проводили исследования *in vivo* на самцах крыс линии Wistar. При работе с животными соблюдались этические нормы, установленные «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [9]. Животные содержались в стандартных условиях в помещении с контролируемым уровнем освещенности, температурой и влажностью, на обычном рационе вивария, с свободным доступом к воде и корму [10]. Перед началом эксперимента крыс разделили на 2 группы по 12 особей в каждой: контрольную группу и группу «Бетулин». Учитывая ограниченную растворимость бетулина в воде, для введения вещества крысам готовили суспензию исследуемого вещества в 2% крахмале. Крысам в группе «Бетулин» ежедневно внутрижелудочно вводили суспензию бетулина в дозе 100 мг/кг/сут на протяжении 28 суток. Контрольные животные получали эквивалентные количества 2% крахмала.

По окончании эксперимента крыс декапитировали под эфирным наркозом. После декапитации животных образцы крови собирали в стеклянные пробирки, печень выделяли без перфузирования, на холоде (0–4 °С). После забора крови форменные элементы осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. В сыворотке крови животных определяли уровни ТГ, ОХ и ХЛВП при помощи клинико-диагностических наборов «НТПК АнализХ» (Беларусь) в соответствии с инструкциями производителя. Измерение уровней СЖК в крови проводили по методу Dupcombe [11]. Митохондриальную фракцию печени получали путем дифференциального центрифугирования [12]. Активность КПП1 определяли в митохондриях печени по методу Bieber с соавт. [13]. Содержание белка определяли по методу Peterson [14].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием GraphPad Prism v.8.0. Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для выявления статистической значимости отличий между экспериментальными группами двухвыборочный непарный t-критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$). Для оценки корреляционных связей между измеренными показателями рассчитывали коэффициенты корреляции Пирсона (r) и уровни статистической значимости (p). Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое в выборке, m – стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение. Для оценки влияния бетулина на активность КПП1 и выяснения ее роли в гиполипидемическом действии бетулина и проведена серия экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

В экспериментах *in vitro* показано, что при инкубировании митохондрий, выделенных из печени крыс, с бетулином как в физиологических концентрациях (0,1 и 0,5 мкг/мл) [15], так и в концентрациях, значительно превышающих физиологические (1, 5, 10 мкг/мл), карнитин-пальмитоилтрансферазная активность митохондрий существенно не изменя-

лась. Следовательно, бетулин не оказывает прямого влияния на активность КПП1 митохондрий.

Установлено, что введение бетулина здоровым животным в дозе 100 мг/кг/сут на протяжении 28 суток сопровождалось увеличением активности КПП1 в митохондриальной фракции печени крыс на 44,6% (таблица 1).

Исследованные показатели обмена липидов в сыворотке крови контрольной группы животных и группы «Бетулин» находились в пределах физиологической нормы для крыс линии Wistar [16]. Таким образом, бетулин не оказывал негативного воздействия на липидный обмен у животных.

Обнаружено, что в сыворотке крови наблюдалась тенденция к снижению содержания СЖК на 17,0 % ($p < 0,1$) и увеличению уровней ХЛВП на 36,9% ($p < 0,1$) по сравнению с контрольной группой. Содержание ОХ и ТГ практически не изменялось (таблица 2).

Для оценки взаимосвязей между активностью КПП1 печени крыс после введения бетулина и показателями обмена липидов в сыворотке крови крыс рассчитывали коэффициенты корреляции Пирсона между показателями. Показано наличие отрицательной корреляции высокой силы между активностью КПП1 с концентрациями в сыворотке крови СЖК ($r = -0,937$, $p = 0,0002$).

Таблица 1. – Влияние внутрижелудочного введения бетулина в дозе 100 мг/кг/сут на протяжении 28 суток на активность КПП1 печени крыс

Группы	Активность КПП1, нмоль/мин/мг белка
Контроль Стандартная диета	10,17±0,50
Бетулин 100 мг/кг/сут в/ж, 28 сут	14,71±0,63*

Примечание – * – $p < 0,001$

Таблица 2. – Влияние внутрижелудочного введения бетулина в дозе 100 мг/кг/сут на протяжении 28 суток на некоторые показатели липидного обмена в сыворотке крыс, ммоль/л

Группы	Показатели			
	Общий холестерол	ХЛВП	ТГ	СЖК
Контроль Стандартная диета	4,31±0,49	3,12±0,39	0,71±0,05	0,53±0,04
Бетулин 100 мг/кг/сут в/ж, 28 сут	5,12±0,57	4,27±0,50 $p = 0,0846$	0,72±0,07	0,44±0,02 $p = 0,051$

Таблица 3. – Взаимосвязь активности КПП1 с показателями обмена липидов в сыворотке крови крыс после внутрижелудочного введения бетулина в дозе 100 мг/кг/сут на протяжении 28 суток

		r				
		КПП1	ОХ	ХЛВП	ТГ	СЖК
p	КПП1	1 0	-0,089	-0,062	-0,064	-0,937
	ОХ	0,3953	1 0	-0,352	0,98	0,125
	ХЛВП	0,9747	0,1084	1 0	-0,394	0,044
	ТГ	0,1554	<0,0001	0,8415	1 0	0,076
	СЖК	0,0002	0,8200	0,8415	0,8416	1 0

Кроме этого, установлено наличие тесной положительной корреляционной связи между уровнями ОХ и ТГ в сыворотке крови ($r=0,98$, $p < 0,0001$) (таблица 3).

Известно, что концентрации СЖК в крови являются отражением баланса между гидролизом депонированных в адипоцитах ТГ и метаболической активностью печени и мышц окислять жирные кислоты. Гидролиз ТГ до СЖК в адипоцитах осуществляется с помощью различных липаз (гормончувствительной липазы, моноглицеридлипазы, триглицеридлипазы и др.). Влияние бетулина на указанные ферменты не исследовалось. Можно предположить, что снижение концентраций СЖК в крови обусловлено активирующим действием бетулина на активность печеночной КПП1. Основанием для такой гипотезы служит то, что введение бетулина сопровождается появлением отрицательной корреляции между активностью КПП1 и концентрациями СЖК в сыворотке крови.

Закключение. Таким образом, впервые показано, что введение бетулина сопровождается увеличением активности КПП1 в митохондриях печени крыс. При этом отмечается тенденция к снижению концентраций СЖК и увеличению уровней ХЛВП в сыворотке кро-

ви. Анализ взаимосвязей между показателями установил наличие отрицательной корреляции высокой силы между активностью КПП1 с концентрациями СЖК в сыворотке крови. Возможным объяснением активирующего действия бетулина на активность КПП1 печени крыс может быть усиление экспрессии фермента, либо влияние бетулина на посттрансляционную модификацию фермента, так как исследования *in vitro* не подтверждают прямого действия бетулина на карнитин-пальмитоилтрансферазную активность митохондрий печени. Для выяснения молекулярных механизмов влияния бетулина на активность КПП1 *in vivo* необходимы дополнительные исследования.

Список обозначений

КоА – кофермент А; КПП1 – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1 типа (КФ 2.3.1.21); ОХ – общий холестерин сыворотки крови; СЖК – свободные жирные кислоты; ТГ – триацилглицеролы; ХЛВП – холестерол липопротеинов высокой плотности; SREBP-2 – фактор транскрипции SREBP-2

Список литературы

1. Noncommunicable diseases. Progress Monitor – 2020 / World Health Organization. – Gene-

- va: WHO Press, 2020. – 236 p. ISBN 978-92-4-000049-0.
2. Kopin, L. Dyslipidemia / L. Kopin, C. J. Lowenstein // *Ann. Intern. Med.* – 2017. – Vol. 167, Iss. 11. – P. 81–96. doi: 10.7326/AITC201712050.
 3. Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult (2021) / G. J. Pearson [et al.] // *Can. J. Cardiol.* – 2021. – Vol. 37, Iss. 8. – P. 1129–1150. doi: 10.1016/j.cjca.2021.03.016.
 4. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques / J. J. Tang [et al.] // *Cell Metab.* – 2011. – Vol. 13, Iss. 1. – P. 44–56. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.004.
 5. Betulin attenuated liver damage by prevention of hepatic mitochondrial dysfunction in rats with alcoholic steatohepatitis / V. Buko [et al.] // *Physiology International.* – 2019. – Vol. 106, Iss. 4. – P. 323–334. doi: 10.1556/2060.106.2019.26.
 6. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects / J. P. Bonnefont [et al.] // *Mol. Aspects Med.* – 2004. – Vol. 25, Iss. 5–6. – P. 495–520. doi: 10.1016/j.mam.2004.06.004.
 7. Schlaepfer, I. R. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential / I. R. Schlaepfer, M. Joshi // *Endocrinology.* – 2020. – Vol. 161, Iss. 2. – Article ID: bqz046. doi: 10.1210/endo/bqz046.
 8. Betulin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: physicochemical characterization and hepatoprotective activity / V. Buko [et al.] // *J. Mol. Liq.* – 2020. – Vol. 309. – Article ID: 113118. doi: 10.1016/j.molliq.2020.113118.
 9. European Treaty Series No.170. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe. – Strasbourg, 1998. – 3 p.
 10. ТКП 125–2008 (02040) Надлежащая лабораторная практика. Основные положения. – Минск, 2008. – 35 с.
 11. Duncombe, W. G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma / W. G. Duncombe // *Clinica Chim. Acta.* – 1964. – Vol. 9. – P. 122–125. doi: 10.1016/0009-8981(64)90004-x.
 12. Johnson, D. Isolation of liver or kidney mitochondria / D. Johnson, H. Lardy // *Methods Enzymol.* – 1967. – Vol. 10. – P. 94–96. doi: 10.1016/0076-6879(67)10018-9.
 13. Bieber, L. L. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase / L. L. Bieber, T. Abraham, T. Helmrath // *Anal. Biochem.* – 1972. – Vol. 50, Iss. 2. – P. 509–518. doi: 10.1016/0003-2697(72)90061-9.
 14. Peterson, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall / G. L. Peterson // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100, Iss. 2. – P. 201–220.
 15. Jäger, S. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betula alba cortex*) / S. Jäger, M. N. Laszczyk, A. Scheffler // *Molecules.* – 2008. – Vol. 13, Iss. 12. – P. 3224–3235. doi: 10.3390/molecules13123224.
 16. Haematological and biochemical parameter standardization of Swiss mice and Wistar rats / M. F. Diniz [et al.] // *Rev. Bras. Cienc. Saude.* – 2006. – Vol. 10, Iss. 2. – P. 171–176.

References

1. Noncommunicable diseases. Progress Monitor – 2020 / World Health Organization, Geneva, WHO Press, 2020, 236 p. ISBN 978-92-4-000049-0.
2. Kopin L., Lowenstein C. J. Dyslipidemia. *Ann. Intern. Med.*, 2017, vol. 167, iss. 11, pp. 81–96. doi: 10.7326/AITC201712050.
3. Pearson G. J. et al. Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult (2021). *Can. J. Cardiol.*, 2021, vol. 37, iss. 8, pp. 1129–1150. doi: 10.1016/j.cjca.2021.03.016.
4. Tang J. J. et al. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.*, 2011, vol. 13, iss. 1, pp. 44–56. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.004.
5. Buko V. et al. Betulin attenuated liver damage by prevention of hepatic mitochondrial dysfunction in rats with alcoholic steatohepatitis. *Physiology International*, 2019, vol. 106, iss.

- 4, pp. 323–334. doi: 10.1556/2060.106.2019.26.
6. Bonnefont J. P. et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol. Aspects Med.*, 2004, vol. 25, iss. 5–6, pp. 495–520. doi: 10.1016/j.mam.2004.06.004.
7. Schlaepfer I. R., Joshi M. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential. *Endocrinology*, 2020, vol. 161, iss. 2, article ID. bqz046. doi: 10.1210/endo/bqz046.
8. Buko V. et al. Betulin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: physicochemical characterization and hepatoprotective activity. *J. Mol. Liq.*, 2020, vol. 309, article ID. 113118. doi: 10.1016/j.molliq.2020.113118.
9. European Treaty Series No.170. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe, Strasbourg, 1998, 3 p.
10. ТКР 125–2008 (02040) Nadlezhshhaja laboratornaja praktika. Osnovnye polozhenija [*Technical codex of established practice 125–2008 (02040) Good laboratory practice. Fundamentals*]. Minsk, 2008, 35 p. (In Russian)
11. Duncombe W. G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. *Clinica Chim. Acta.*, 1964, vol. 9, pp. 122–125. doi: 10.1016/0009-8981(64)90004-x.
12. Johnson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. *Methods Enzymol.*, 1967, vol. 10, pp. 94–96. doi: 10.1016/0076-6879(67)10018-9.
13. Bieber L. L., Abraham T., Helmrath T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal. Biochem.*, 1972, vol. 50, iss. 2, pp. 509–518. doi: 10.1016/0003-2697(72)90061-9.
14. Peterson G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 100, iss. 2, pp. 201–220.
15. Jäger S., Laszczyk M. N., Scheffler A. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*). *Molecules*, 2008, vol. 13, iss. 12, pp. 3224–3235. doi: 10.3390/molecules13123224.
16. Diniz M. F. et al. Haematological and biochemical parameter standardization of Swiss mice and Wistar rats. *Rev. Bras. Cienc. Saude.*, 2006, vol. 10, iss. 2, pp. 171–176.

Received 6 October 2022