

Гепатопротективные свойства полифенольных комплексов из древесины и клеточной культуры маакии амурской

Саратиков А.С., Чучалин В.С., Раткин А.В., Раткин Е.В., Федореев С.А., Булгаков В.П.

Hepatoprotective properties of polyphenolic complexes from wood and cellular culture of maackia amurensis

Saratikov A.S., Chuchalin V.S., Rat`kin A.V., Rat`kin Ye.V., Fedoreyev S.A., Bulgakov V.P.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток
Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

© Саратиков А.С., Чучалин В.С., Раткин А.В. и др.

Для выяснения роли отдельных групп полифенолов в реализации гепатопротективных свойств максара исследована активность полифенольных комплексов (ПФК) из ядровой древесины и клеточной культуры маакии амурской.

Эксперименты проведены на 40 беспородных белых крысах-самцах с экспериментальным ССI₄-гепатитом. Терапевтическую эффективность исследуемых объектов оценивали по их влиянию на выживаемость животных, морфологические и биохимические показатели печени и сыворотки крови.

При ССI₄-гепатите у крыс ПФК из ядровой древесины и клеточной культуры маакии амурской снижают острую токсичность тетрахлорметана, уменьшают некроз гепатоцитов и клеточную инфильтрацию паренхимы печени, препятствуют развитию в печени жировой и белковой дистрофии, нормализуют в крови активность аминотрансфераз, γ -глутамилтрансферазы, содержание белка и липидов, стимулируют конъюгацию билирубина. Более выражен терапевтический эффект ПФК из клеточной культуры. Гепатопротективное действие обусловлено наличием в ПФК изофлавоноидов даидзеина, ретузина, генистеина, афромозина, формонетина, оробола, текторигенина, маакиаина и медикарпина. ПФК из культуры клеток не влияет на уровень холестерина в крови, что, по-видимому, обусловлено отсутствием в его составе моно- и димерных стильбенов.

Ключевые слова: маакия амурская, максар, гепатопротекторы.

Annot For finding-out of a role of separate groups of polyphenols in realization hepatoprotective properties of maksar we investigate activity of polyphenolic complexes (PPC) from duramen and cellular culture of maakia amur. Experiments are carried out on 40 not purebred white rats with an experimental ССI₄-hepatites. Therapeutic efficiency of researched objects estimated on their influence on survival rate of animals, morphological and biochemical parameters of a liver and wheys of blood.

In rat's ССI₄-hepatitis PPC from duramen and cellular culture of maakia amur reduce the acute toxicity of tetrachloromethane, decrease the necrosis of hepatocytes and cellural infiltration of liver's parenchyma, prevent from development of fatty and protein dystrophy of a liver, normalize the activity of amino transferase, γ -glutamyltransferase in blood, the concentration of proteins and lipids, stimulate conjugation of bilirubin. The therapeutic effect of PPC of cellular culture is more evident. The hepatoprotective action is caused by a presence of isoflavonoids daidzein, retuzin, genistein, afromozin, formononetin, orobol, tektorigenin, maakiain and medicarpin. PPC from a culture of cells doesn't influence on a level of cholesterol in blood, that apparently is caused by an absence of mono- and dimeric stilbenes in its structure.

Key words: maakia amurensis, macsar, hepatoprotectors.

УДК 615.322:615.244

Введение

Максар — комплекс полифенолов ядровой древесины дальневосточного растения маакии амурской (*Maackia amurensis* Rupr. et. Maxim.), главными из которых являются

изофлавоны: генистеин, даидзеин, ретузин, афромозин, формонетин, оробол, текторигенин, 3-гидроксистерон, птерокарпаны (маакиаин, медикарпин) [5, 6, 10—12]; мономерные стильбены: резвератрол и питецатаннол, изофлавоностильбен маакиазин [6], а также олигомер-

ные стильбены сцирпусин А, сцирпусин В, маакин, маакин А [7, 8] и стильбенолигнан мааколин [19]. Большинство выделенных фенольных компонентов из маакии показали высокую антирадикальную и антиоксидантную активность, сопоставимую с ионолом [9, 10].

В эксперименте максар препятствует развитию острого и хронического гепатита, вызванного гепатотоксинами с различным механизмом повреждающего эффекта (тетрахлорметан, парацетамол, D-галактозамин, гидразин, аллиловый спирт). По гепатопротективному действию максар превосходит референтный препарат легалон. При остром токсическом гепатите максар предупреждает гибель животных (в контроле выживаемость составляла 67—90%), способствует нормализации структуры печеночных долек, защищает паренхиму печени от колликвационного некроза, белковой и жировой дистрофии, устраняет нарушения ультраструктуры гепатоцитов, уменьшает гиперферментемию и гипербилирубинемию. Терапевтический эффект максара, очевидно, обусловлен антиоксидантными свойствами полифенолов, способных нейтрализовать свободные радикалы в процессе обратимого окисления в хиноны. Максар уменьшает продукцию диеновых конъюгатов, оснований Шиффа и малонового диальдегида. Как активный антиоксидант и ингибитор фосфолиполиза, он препятствует деструкции фосфолипидов в детергентные лизофосфатиды. Терапия максаром приводит к улучшению антитоксической функции печени. Препарат предохраняет цитохром Р-450 от конверсии в метаболически инертный цитохром Р-420, восстанавливает нормальное течение реакций окисления и глюкуронирования [1—4, 16].

Для исследования путей биосинтеза полифенолов маакии получены клеточные культуры, приготовленные из побегов, черешков, цветковой кисти, почек, корней растения. Все эти штаммы продуцируют одинаковый набор изофлавонов и птерокарпанов (даидзеин, ретузин, генистеин и формононетин, маакиаин и медикарпин). В результате длительного культивирования первичных каллусов были получены штаммы клеточных культур с содержанием суммы полифенолов до 20,8 мг/г сухой массы клеток, что в 3 раза превышает содержание их в ядровой древесине растения. В отличие от нативного растения ни одна из полученных клеточных культур не продуцирует моно- и димерные стильбены [14, 15, 17].

Для выяснения роли отдельных групп полифенолов в реализации гепатопротективных свойств максара исследо-

вана активность полифенольных комплексов (ПФК) из ядровой древесины и клеточной культуры маакии при экспериментальном ССІ₄-гепатите.

Материал и методы

ПФК из ядровой древесины и культуры каллусов маакии получены в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН по ранее описанной методике [13]. Для выделения полифенолов использовали культуру каллусов, иницированную из листьев *M. amurensis*. Культуру выращивали на среде W_{В/НАА} в течение месяца [17].

Эксперименты проведены в осенне-зимний период на 40 беспородных белых крысах-самцах с массой тела 200—240 г, которых содержали в виварии при естественном световом режиме на стандартной диете при свободном доступе к воде и пище. Животные были разделены на четыре группы: I группа — интактные крысы ($n = 8$); животным II группы ежедневно в течение 4 дней вводили в желудок тетрахлорметан в 50%-м масляном растворе в дозе 1,25 мл/кг массы тела (контроль, $n = 12$); III и IV группы — крысы, получавшие за 2 ч до введения гепатотоксина внутривенно ПФК из ядровой древесины ($n = 10$) и клеточной культуры маакии ($n = 10$) соответственно в ранее установленной для максара оптимальной эффективной дозе 100 мг/кг массы тела в форме суспензии на 1%-й крахмальной слизи ($n = 10$). Животным контрольной (II) группы вводили эквивалентное количество растворителя. Через сутки после последнего введения препаратов крыс декапитировали под эфирным наркозом.

Терапевтическую эффективность гепатопротекторов оценивали по их влиянию на выживаемость животных, морфологические и биохимические показатели печени и сыворотки крови. Ткань печени фиксировали 10%-м нейтральным формалином, заливали в парафин с последующей окраской гематоксилином и эозином.

С помощью окулярной тест-системы Г.Г. Автандилова [1] подсчитывали количество некротизированных и двухъядерных гепатоцитов, плотность клеточного инфильтрата, количество гепатоцитов с жировой и белковой дистрофией. В сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), γ -глутамил-трансферазы (γ -ГТФ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание билирубина, общих липидов, холестерина с помощью наборов «Bio-la-test» фирмы «Lachema» (Чехия); concentra-

цию белка, глюкозы с помощью наборов ОАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Результаты обработаны по параметрическому *t*-критерию Стьюдента с определением среднего арифметического значения *M* и его стандартной ошибки *m*. Оценку нормальности распределения вариантов в выборках проводили по критерию Колмогорова—Смирнова. Анализ данных выполнен с использованием программы Statistica 5.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

В группе крыс, получавших тетрахлорметан в течение 4 дней, летальность составила 33%. У животных резко нарушена структура печеночных долек и печеночных триад. Просвет синусоидных капилляров расширен, эндотелиальные клетки набухшие и часто закрывают просвет многих гемокapилляров (рис. 1). Между гепатоцитами имеются очаги мелких диапедезных кровоизлияний, междольковые желчные капилляры местами разорваны. Клеточный инфильтрат представлен полиморфно-ядерными лейкоцитами и локализован преимущественно вокруг кровеносных сосудов. Количество некротизированных гепатоцитов возросло

в 7 раз, с жировой и белковой дистрофией — в 18 раз, в 3 раза снижено количество двухъядерных гепатоцитов (таблица).

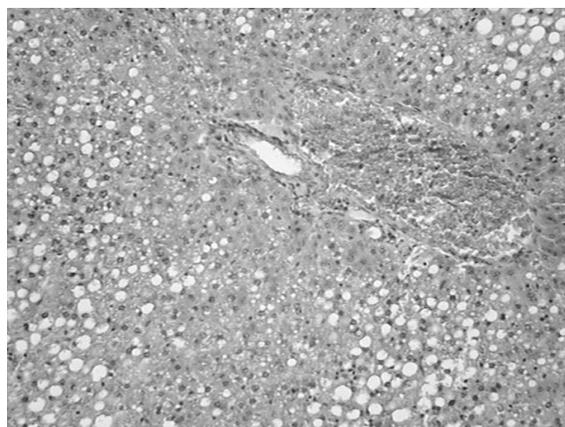


Рис. 1. Гистологический препарат печени крысы с CCl₄-гепатитом. Окраска гематоксилином и эозином. ×250

Биохимические показатели крови также свидетельствуют о значительных нарушениях метаболических процессов в печени. В сыворотке крови активность АСТ, АЛТ, ЩФ и γ-ГТФ возросла в 2,4; 2,2; 3,1 и 7,3 раза соответственно, содержание общего билирубина увеличено в 2,1 раза, непрямого — в 7,4 раза по сравнению с группой интактных животных, коэффициент глюкуронирования билирубина снижен до 22,0% (в норме 77,8%). Содержание общих липидов увеличено в 1,6 раза, белка уменьшено в 1,4 раза (таблица).

Влияние ПФК из ядровой древесины и клеточной культуры мааки амурской на биохимические показатели крови крыс при CCl₄-гепатите (*M* ± *m*, средние из 8—10 наблюдений)

Показатель	Экспериментальные группы			
	Интактные животные	CCl ₄ -гепатит	ПФК	
			из древесины	из клеточной культуры
Некротизированные гепатоциты, %	1,07 ± 0,25	6,80 ± 0,87*	3,52 ± 0,69*	2,31 ± 0,26*
Гепатоциты с дистрофией, %	0,53 ± 0,19	9,84 ± 0,57*	5,65 ± 0,71*	2,81 ± 0,37*
Двухъядерные гепатоциты, %	2,33 ± 0,78	0,71 ± 0,14*	1,58 ± 0,40*	3,51 ± 0,27*
Плотность клеточного инфильтрата, в 1 мм ²	9,35 ± 1,60	80,4 ± 7,80*	41,7 ± 6,00*	25,6 ± 3,93*
АСТ, мккат/л	0,61 ± 0,04	1,44 ± 0,02*	1,12 ± 0,02*	1,16 ± 0,04*
АЛТ, мккат/л	0,62 ± 0,03	1,38 ± 0,06*	0,89 ± 0,03*	0,87 ± 0,03*
АСТ/АЛТ	0,98	1,04	1,25	1,33
ЩФ, Ед/л	290 ± 38,1	914 ± 47,9*	705 ± 37,2*	623 ± 42,6*
γ-ГТФ, мккат/л	0,09 ± 0,01	0,66 ± 0,06*	0,28 ± 0,04*	0,30 ± 0,03*
Билирубин, ммоль/л				
общий	9,00 ± 0,86	19,2 ± 0,79*	13,4 ± 0,55*	12,6 ± 0,41*
непрямой	2,04 ± 0,95	14,9 ± 2,02*	6,76 ± 0,85*	7,70 ± 0,43*
Холестерин, ммоль/л	5,61 ± 0,33	10,2 ± 0,53*	6,73 ± 0,18*	9,77 ± 0,91
Белок, г/л	67,5 ± 2,03	48,9 ± 4,41*	65,7 ± 0,84*	65,0 ± 1,43*
Общие липиды, г/л	1,76 ± 0,07	2,77 ± 0,24*	1,93 ± 0,43*	1,99 ± 0,33*

* Различия достоверны (*p* < 0,05): для CCl₄-гепатита — по сравнению с интактными животными, для исследуемых препаратов — по сравнению с CCl₄-гепатитом.

ПФК из ядровой древесины и клеточной культуры маакии (группы III и IV) предупреждали гибель животных (выживаемость 100%) и препятствовали развитию морфологических и метаболических нарушений печени (см. таблицу). Содержание некротизированных клеток снизилось соответственно в 1,9 и 2,9 раза, гепатоцитов с дистрофией — в 1,7 и 3,5 раза, количество двухъядерных гепатоцитов возросло в 2,2 и 4,9 раза, что указывает на усиление процессов регенерации печени. Плотность клеточного инфильтрата уменьшилась в 1,9 и 3,1 раза, и он локализовался преимущественно периваскулярно. Значительно возросло количество гепатоцитов нормального строения, уменьшилось венозное полнокровие. Между гепатоцитами появляется молодая соединительная ткань с большим содержанием клеточных элементов — фибробластов и фиброцитов (рис. 2, 3).

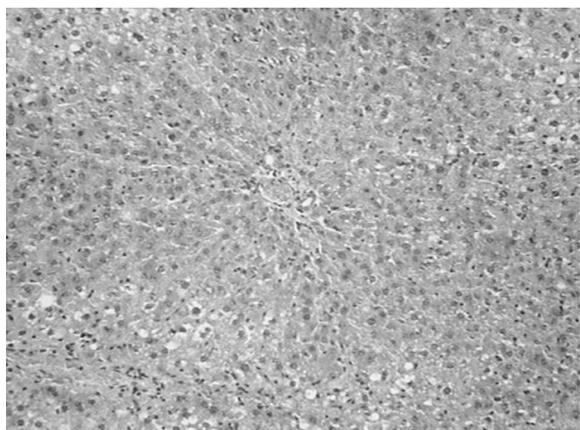


Рис. 2. Гистологический препарат печени крысы с CCl_4 -гепатитом при лечении максаром. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 250$

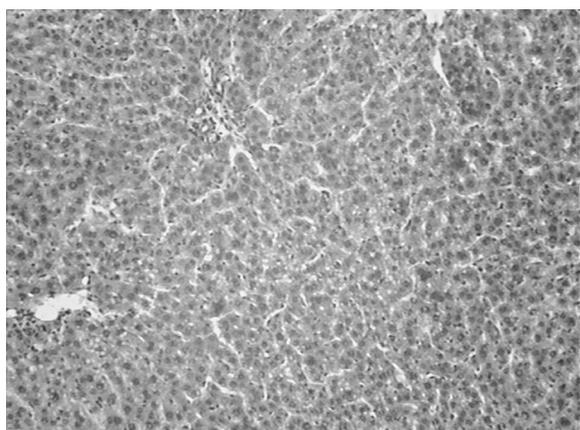


Рис. 3. Гистологический препарат печени крысы с CCl_4 -гепатитом при лечении ПФК из клеточной культуры маакии амурской. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 250$

Более эффективно восстанавливал гистоархитектонику печени ПФК из клеточной культуры, под влиянием которого венозное полнокровие исчезало, не определялись очаги диапедезных кровоизлияний, чаще восстанавливалась структура печеночных триад.

Терапия гепатопротекторами сопровождалась регрессом биохимических показателей. Оба препарата статистически с одинаковой эффективностью уменьшали активность в крови АСТ (в 1,3—1,2 раза), АЛТ (в 1,5—1,6 раза), ЩФ (в 1,3—1,5 раза), γ -ГТФ (в 2,4—2,2 раза) по сравнению с показателями контрольной (II) группы. Содержание общего билирубина под влиянием обоих препаратов снизилось по сравнению с контролем в 1,4—1,5 раза, непрямого — в 2,2—1,9 раза, общих липидов — в 1,4 раза, количество белка возросло в 1,3 раза (см. таблицу). Учитывая различия в химическом составе ПФК из ядровой древесины маакии и из клеточной культуры, которая не содержит моно- и димерных стильбенов [17], очевидно, что их гепатопротективное действие обусловлено наличием изофлавоноидов даидзеина, ретузина, генистеина, афромозина, формонетина, оробола, текторигенина, маакиаина и медикарпина. При этом ПФК из культуры клеток маакии содержит в 2 раза больше изофлавоноидов по сравнению с ПФК из древесины. Возможно, увеличенное содержание изофлавоноидов определяет большую активность ПФК из клеточной культуры (группа IV) (см. таблицу).

CCl_4 -гепатит сопровождался повышением уровня холестерина в крови в 1,8 раза. ПФК из древесины маакии амурской препятствовал развитию гиперхолестеринемии, снижая содержание холестерина в 1,5 раза. Вместе с тем ПФК из культуры клеток не влиял на уровень холестерина в крови, что, по-видимому, можно объяснить отсутствием в его составе моно- и димерных стильбенов. Известно, что мономерный стильбен резвератрол обладает гиполлипидемическим действием, тормозит перекисное окисление липидов и метаболизм арахидоновой кислоты [18].

Выводы

На основании результатов проведенного эксперимента сделаны следующие выводы:

1. Гепатопротективное действие полифенольных комплексов из растения маакии амурской и ее клеточной культуры обусловлено наличием в них суммы изофлавоноидов

дов: даидзеина, ретузина, генистеина, афромозина, формонетина, оробола, текторигенина, маакиаина и медикарпина. Более выражен терапевтический эффект ПФК из клеточной культуры.

2. Гипохолестеринемический эффект ПФК из древесины маакии амурской (препарат максар), очевидно, зависит от содержания в нем моно- и димерных стильбенов (резвератрол, пицеатаннол, маакиазин, сцирпусины А и В, маакин, маакин А).

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 03-04-49-515 и 03-04-48102, а также программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (проект № 03-1-0-05-006) и гранта Секции физико-химической биологии (проект № 03-1-0-05-003).

Литература

1. Белобородова Э.И., Венгеровский А.И., Саратиков А.С. // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 2000. № 10. С. 75—77.
2. Венгеровский А.И., Седых И.М., Власова Т.В., Саратиков А.С. // Растит. ресурсы. 1993. № 3. С. 95—99.
3. Венгеровский А.И., Седых И.М., Саратиков А.С. // Эксперим. и клинич. фармакология. 1993. Т. 56 (5). С. 47—49.
4. Власова Т.В., Венгеровский А.И., Саратиков А.С. // Хим.-фарм. журн. 1994. № 3. С. 56—59.
5. Комиссаренко А.Н., Ковалев В.Н., Комиссаренко Н.Ф. // Химия природ. соединений. 1994. № 3. С. 288—290.
6. Кривошекова О.Е., Степаненко Л.С., Максимов О.Б. // Химия природ. соединений. 1986. № 1. С. 39—42.
7. Кулеш Н.И., Исаков В.В., Максимов О.Б. // Химия природ. соединений. 1992. № 5. С. 468—476.
8. Кулеш Н.И., Максимов О.Б., Федорев С.А. и др. // Химия природ. соединений. 1999. № 5. С. 664—669.
9. Максимов О.Б., Горовой П.Г., Кольцова Е.А. и др. // Вестн. ДВО РАН. 1996. № 1. С. 40—50.
10. Максимов О.Б., Кривошекова О.Е., Степаненко Л.С. и др. // Химия природ. соединений. 1985. № 6. С. 775—781.
11. Максимов О.Б., Кулеш Н.И., Горовой П.Г. // Растит. ресурсы. 1992. № 2. С. 157—163.
12. Максимов О.Б., Кулеш Н.И., Степаненко Л.С. // Химия в интересах устойчивого развития. 1998. Т. 6. С. 447—460.
13. Максимов О.Б., Кулеш Н.И., Федорев С.А. и др. Патент РФ 2104027 // Бюл. изобретений. 1998. № 4.
14. Покушалова Т.В., Глебо Л.И., Максимов О.Б. // Химия природ. соединений. 1988. № 6. С. 801—804.
15. Покушалова Т.В., Глебо Л.И., Степаненко Л.С. и др. // Растит. ресурсы. 1990. № 1. С. 555—558.
16. Саратиков А.С., Венгеровский А.И. // Эксперим. и клинич. фармакология. 1995. Т. 58 (1). С. 8—11.
17. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V. et al. // Fitoterapia. 2000. V. 71. P. 365—372.
18. Kai X., Lijiang X., Yaming X., Donglu B. // J. Nat. Prod. 2000. V. 63. P. 1373—1376.
19. Kulesh N.I., Denisenko V.A., Maksimov O.B. // Phytochemistry. 1995. V. 40 (3). P. 1001—1003.

Поступила в редакцию 26.09.2006 г.