

Роль стильбенов в механизмах гепатопротективных свойств полифенолов маакии амурской

Чучалин В.С.¹, Ратькин А.В.¹, Ратькин Е.В.¹, Фролов В.Н.¹, Иванов В.В.¹, Федореев С.А.², Булгаков В.П.³, Зоркальцев С.С.¹

Role of stilbens in mechanisms hepatoprotective properties of polyphenols *Maackia amurensis*

Chuchalin V.S., Ratkin A.V., Ratkin Ye.V., Frolov V.N., Ivanov V.V., Fedoreyev S.A., Bulgakov V.P., Zorcaltsev S.S.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток

³ Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

© Чучалин В.С., Ратькин А.В., Ратькин Е.В. и др.

Для выяснения роли мономерных и димерных стильбенов в реализации гепатопротективных свойств полифенолов маакии амурской исследована активность полифенольных комплексов из ядровой древесины (максара), экстракта клеточной культуры маакии амурской, а также мономерных и димерных стильбенов, выделенных из субстанции максара.

Терапевтическую эффективность исследуемых объектов оценивали по их влиянию на выживаемость животных, морфологические и биохимические показатели печени и сыворотки крови крыс с экспериментальным СС₄-гепатитом.

Установлено, что гепатопротективное действие максара и экстракта клеточной культуры маакии амурской обусловлено наличием в них суммы изофлавоноидов. Мономерные и димерные стильбены не проявляют терапевтической активности при экспериментальном токсическом гепатите.

Ключевые слова: маакия амурская, максар, стильбены, гепатопротекторы.

For finding-out of a role monomer and dimer stilbens in realization hepatoprotective properties of polyphenols maackia amurensis activity of polyphenolic complexes from wood (Maksar), an extract of cellular culture maackia amurensis, and also monomer and dimer stilbens, allocated of a substance Maksar was investigated.

Therapeutic efficiency of researched objects was estimated on their influence on survival rate of animals, morphological and biochemical parameters of a liver and wheys of blood of rats with an experimental СС₄-hepatites. It was established, that hepatoprotective influence of Maksar and an extract of cellular culture maackia amurensis is caused by presence of the sums isoflavonoids in their structure. Monomer and dimer stilbens do not show therapeutic activity at an experimental toxic hepatites.

Key words: *Maackia amurensis*, maksar, stilbens, hepatoprotectors.

УДК 616.381-002-037-06:616.1/4-008.64

Введение

Маакия амурская (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.) является сырьем для получения гепатопротективного средства «Максар», представляющего собой комплекс полифенолов ядровой древесины этого растения. В состав препарата входят изофлавоны: генистеин, даидзеин, ретузидин, афромозин, формононетин, оробол, текторигенин, 3-гидроксивеститон, птерокарпаны (маакиин, медикарпин); мономерные

стильбены: резвератрол и пицеатаннол, изофлавоно-стильбен маакиазин, а также олигомерные стильбены сцирпусин А, сцирпусин В, маакин, маакин А и стильбенолигнан мааколин и другие соединения [11, 12]. Большинство выделенных фенольных компонентов из маакии показало высокую антирадикальную и антиоксидантную активность, сопоставимую с эффектом синтетического антиоксиданта ионола [6].

В остром и хроническом опытах с экспериментальными гепатопатиями, вызванными токсинами с

различными механизмами повреждающего действия (тетрахлорметан, парацетамол, D-галактозамин, гидразин, аллиловый спирт), максар более эффективно, чем референтный препарат «Легалон», препятствует развитию патологического процесса. Терапевтический эффект максара обусловлен антиоксидантными свойствами полифенолов, способных нейтрализовать свободные радикалы в процессе обратимого окисления в хиноны [1–4, 7].

В Биолого-почвенном институте ДВО РАН (г. Владивосток) предложены клеточные культуры из побегов, черешков, цветковой кисти, почек, корней растения, которые продуцируют одинаковый набор изофлавонов и птерокарпанов (даидзеин, ретузин, генистеин и формонетин, маакиаин и медикарпин). В результате длительного культивирования первичных каллусов были получены штаммы клеточных культур с содержанием полифенолов более 20 мг на 1 г сухой массы клеток, что в 3 раза превышает концентрацию этих веществ в ядровой древесине растения. В отличие от нативного растения ни одна из полученных культур не продуцирует моно- и димерные стильбены [9, 10].

С целью выяснения роли мономерных и димерных стильбенов в реализации гепатопротективных свойств полифенолов маакии амурской проведены сравнительные исследования активности полифенольных комплексов из ядровой древесины (максара), экстракта клеточной культуры маакии амурской (ЭККМА), а также мономерных и димерных стильбенов, выделенных из субстанции максара при экспериментальном CCl_4 -гепатите.

Материал и методы

Максар из ядровой древесины и ЭККМА получены в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН (г. Владивосток) [8]. Для выделения полифенолов использовали культуру каллусов из листьев *M. amurensis*, выращенную на среде $W_{B/NA}$ в течение 1 мес [9]. Мономерные стильбены (сумма идентифицированных мономерных стильбенов и изофлавоноидов) и димерные стильбены (сумма димерных стильбенов) получены из субстанции максара методом хроматографии. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, образец димерных стильбенов содержит мааколин, маакин А, сципрусин А, сципрусин В, маакин, маакиазин.

Эксперименты проведены в осенне-зимний период на 60 беспородных белых крысах-самцах массой тела 180–210 г, которых содержали в виварии при естественном световом режиме на стандартной диете при свободном доступе к воде. Животные были разделены на шесть групп по 10 крыс в каждой: I группа — интактные крысы; животным II группы (CCl_4 -гепатит) ежедневно в течение 4 дней вводили в желудок 1,25 мл/кг массы тела тетрахлорметана в 50%-м масляном растворе (контроль); III и IV группы состояли из крыс, получавших за 2 ч до введения гепатотоксина внутривенно максар из ядровой древесины или ЭККМА в ранее установленной для максара оптимальной эффективной дозе 200 мг/кг массы тела в форме суспензии на 1%-й крахмальной слизи (по 100 мг/кг массы тела за 2 ч до введения тетрахлорметана и через 2 ч после введения гепатотоксина); крысам V и VI групп вводили мономерные и димерные стильбены в дозе 100 мг/кг массы тела (по 50 мг/кг массы тела за 2 ч до введения тетрахлорметана и через 2 ч после введения гепатотоксина). Животным контрольной (II) группы вводили эквивалентное количество растворителя. Через 1 сут после последнего введения препаратов крыс декапитировали под эфирным наркозом.

Терапевтическую эффективность препаратов оценивали по их влиянию на выживаемость крыс, биохимические характеристики сыворотки крови и морфологические показатели печени. Ткань печени фиксировали 10%-м нейтральным формалином, заливали в парафин с последующим приготовлением гистопрепаратов, окрашенных суданом и гематоксилином и эозином. Определяли степень жировой инфильтрации гепатоцитов в баллах (на препаратах, окрашенных суданом) и морфологические нарушения в печени (на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином).

В сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинфосфокиназы (КФК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), содержание билирубина, холестерина, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и белка с помощью наборов фирмы Biokon (Германия).

Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического M и стандартной ошибки m . Сравнение средних между группами проводили по непараметрическому критерию Краскала—Уоллиса, раз-

личия в группах считали значимыми при $p < 0,05$ [5]. Расчеты проводили с использованием программы Statistica 6.0 для Windows.

Результаты и обсуждение

Тетрахлорметан оказывал выраженное общетоксическое влияние на организм лабораторных животных, вызывал глубокие нарушения метаболической и функциональной активности печени. Во II группе крыс, получавших тетрахлорметан в течение 4 дней, гибель животных составляла 12,5%.

У животных была резко нарушена структура печеночных долек и печеночных триад, наблюдалась вакуолярная жировая дистрофия. Между гепатоцитами имелись очаги мелких кровоизлияний, междольковые желчные капилляры местами разорваны. Клеточный инфильтрат представлен в основном базофилами и полиморфно-ядерными лейкоцитами. Степень жировой дистрофии печени составила 3,5 балла (по 5-балльной шкале).

Биохимические показатели крови также свидетельствовали о значительных нарушениях метаболических процессов в печени. В сыворотке крови активность АСТ, АЛТ, ЩФ, КФК и ЛДГ выросла в 1,7; 1,8; 1,6; 2,1 и 1,5 раза соответственно, содержание общего билирубина увеличено в 3,4 раза, прямого — в 3,9 раза по сравнению с группой интактных животных. Содержание мочевины и холестерина увеличилось в 1,8 и 1,7 раза, белка и ЛПНП — уменьшилось в 1,4 и 1,7 раза соответственно (таблица).

Полифенолы из ядровой древесины (максар) и клеточной культуры мааки амурской (группы III и IV) предупреждали гибель животных (выживаемость 100%) и препятствовали развитию морфологических и метаболических нарушений печени (таблица). Снижилось количество гепатоцитов с дистрофией, увеличилось количество двухъядерных гепатоцитов, что указывает на усиление процессов регенерации печени. Уменьшилась плотность клеточного инфильтрата, увеличилось количество гепатоцитов нормального строения, уменьшилось венозное полнокровие. Более эффективно восстанавливал гистоархитектонику печени максар, под влиянием которого венозное полнокровие исчезало, не определялись очаги кровоизлияний, чаще восстанавливалась структура печеночных триад, появлялись гипертрофированные гепатоциты, содержащие 1—3 крупных ядрышка, имелись митозы, что свидетельствует о регенерации ткани, цитоплазма клеток почти в норме. Сохранялось незначительное расширение межклеточного пространства, кровеносных сосудов и желчных капилляров. Степень жировой дистрофии печени при терапии максаром составила 2,16 балла, полифенолами клеточной культуры — 1,71 балла.

Терапия максаром и ЭККМА сопровождалась регрессом биохимических показателей. Оба препарата равноэффективно уменьшали активность в крови АСТ (в 1,4—1,5 раза), АЛТ (в 1,3—1,2 раза), ЩФ (в 1,2—1,3 раза), КФК (в 1,7—1,6 раза) и ЛДГ (в 1,4 раза) по сравнению с показателями контрольной (II) группы.

Влияние максара, ЭККМА, мономерных и димерных стильбенов на биохимические показатели крови крыс и жировую инфильтрацию печени крыс при ССЛ₄-гепатите ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных					
	I	II	III	IV	V	VI
АСТ, мккат/л	220,9 ± 15,1	376,0 ± 13,1*	255,0 ± 10,3*	244,7 ± 15,4*	1186,4,0 ± 257,7	322,0 ± 29,0
АЛТ, мккат/л	232,5 ± 13,1	418,0 ± 13,2*	325,6 ± 22,2*	340,0 ± 15,3*	1070,9,0 ± 136,2	522,0 ± 279,0
ЩФ, Ед/л	693,0 ± 62,9	1111,6 ± 15,3*	828,7 ± 25,9*	842,1 ± 27,6*	1125,3 ± 154,8	1024,0 ± 294,5
КФК, Ед/л	16,1 ± 1,1	33,8 ± 4,8*	19,6 ± 1,5*	21,7 ± 1,4*	35,9 ± 5,4	40,2 ± 8,6
ЛДГ, Ед/л	1917 ± 80	2784 ± 127*	1930 ± 116*	1971 ± 17*	2038 ± 79*	2121 ± 88
Билирубин общий, мкмоль/л	5,6 ± 0,4	19,3 ± 0,8*	7,6 ± 0,5*	7,1 ± 0,4*	14,3 ± 3,0	10,4 ± 1,4
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,4 ± 0,1	5,5 ± 0,5*	1,9 ± 0,1*	1,8 ± 0,1*	4,9 ± 0,7	2,7 ± 0,4
Мочевина, ммоль/л	6,0 ± 0,3	10,3 ± 0,3*	6,2 ± 0,7*	7,7 ± 0,5*	6,5 ± 0,4*	16,3 ± 2,7
Общий холестерол, ммоль/л	2,20 ± 0,12	4,02 ± 0,36*	2,36 ± 0,28*	2,44 ± 0,19*	2,55 ± 0,22*	3,50 ± 0,60
Белок, г/л	67,9 ± 1,3	47,2 ± 2,6*	62,2 ± 2,6*	67,9 ± 2,7*	58,8 ± 2,3	69,2 ± 2,4
ЛПНП, моль/л	0,99 ± 0,12	0,60 ± 0,11*	0,82 ± 0,07*	0,74 ± 0,12*	0,93 ± 0,1*	1,40 ± 0,90
Степень жировой дистрофии гепатоцитов, балл	0 ± 0	3,50 ± 0,42*	2,16 ± 0,24*	1,71 ± 0,74*	2,30 ± 0,53*	2,43 ± 0,44*

* Различия статистически значимы ($p < 0,05$): для II группы — по сравнению с интактными животными, для исследуемых препаратов — по сравнению со II группой.

Содержание общего билирубина под влиянием обоих препаратов снизилось по сравнению с контролем в 2,5—2,7 раза, прямого — в 2,9—3,0 раза, мочевины в 1,6—1,4 и холестерина в 1,7—1,6 раза, возросло содержание белка в 1,3—1,4 раза и ЛПНП в 1,3—1,2 раза (таблица). Учитывая различия в химическом составе полифенолов из ядровой древесины маакии амурской и из клеточной культуры, которая не содержит моно- и димерных стильбенов [9], очевидно, что их гепатопротективное действие обусловлено наличием изофлавоноидов даидзеина, ретузина, генистеина, афромозина, формонетина, оробола, текторигенина, маакиаина и медикарпина. Действительно, мономерные и димерные стильбены, выделенные из максара (группы V и VI), проявили слабую терапевтическую активность на фоне экспериментального токсического гепатита. Мономерные предупреждали гибель животных, в то время как 62,5% крыс, получавших димерные стильбены, не дожили до конца эксперимента, что может быть опосредовано потенцированием токсического действия тетрахлорметана.

Мономерные и димерные стильбены не оказывали выраженного влияния на морфологическую структуру печени, измененную гепатотоксином. В ткани сохранялась соединительная ткань вокруг долек, клетки печени местами гипертрофированы (редко встречались участки с нормальным строением), клеточный инфильтрат представлен в основном макрофагами. Как и в гистопрепаратах печени нелеченых животных, фиксируется стаз эритроцитов, расширение сосудов, мелкие кровоизлияния, междольковые желчные капилляры местами разорваны. Вместе с тем при терапии мономерными и димерными стильбенами достоверно снижается степень жировой дистрофии гепатоцитов — до 2,30 и 2,43 балла соответственно.

Мономерные стильбены (группа V) снижали активность ЛДГ в 1,3 раза, содержание мочевины и холестерина в 1,6 раза, повышали содержание ЛПНП в 1,5 раза и не влияли на другие исследованные показатели. Влияние на содержание холестерина и ЛПНП связано с тем, что мономерный стильбен резвератрол обладает гиполипидемическим действием, тормозит

перекисное окисление липидов и метаболизм арахидоновой кислоты [9].

Димерные стильбены (группа VI) не влияли на нарушенные при экспериментальном гепатите биохимические показатели крови крыс.

Выводы

1. Гепатопротективное действие максара и экстракта клеточной культуры маакии амурской обусловлено наличием в них суммы изофлавоноидов: даидзеина, ретузина, генистеина, афромозина, формонетина, оробола, текторигенина, маакиаина и медикарпина.

2. Мономерные и димерные стильбены снижают степень жировой дистрофии гепатоцитов и не влияют на большинство биохимических показателей, при этом мономерные стильбены снижают уровень холестерина и активность ЛДГ и повышают содержание ЛПНП, что, возможно, связано с их гиполипидемическим действием.

3. Мономерные и димерные стильбены (резвератрол, пицеатаннол, мааказин, сцирпусины А и В, маакин, маакин А) не проявляют терапевтической активности при экспериментальном токсическом гепатите, что может свидетельствовать о незначительной их роли в цитопротективных свойствах полифенольного комплекса маакии амурской.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-99130.

Литература

1. Белобородова Э.И., Венгеровский А.И., Саратиков А.С. Влияние гепатозащитных средств на антиоксидантную функцию печени // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 2000. № 10. С. 75—77.
2. Венгеровский А.И., Седых И.М., Власова Т.В., Саратиков А.С. Гепатозащитные свойства полифенолов маакии амурской при экспериментальной токсической патологии печени // Растит. ресурсы. 1993. № 3. С. 95—99.
3. Венгеровский А.И., Седых И.М., Саратиков А.С. Влияние полифенолов маакии амурской на антиоксидантную функцию печени // Эксперим. и клинич. фармакология. 1993. Т. 56, № 5. С. 47—49.
4. Власова Т.В., Венгеровский А.И., Саратиков А.С. Полифенолы маакии амурской — эффективное гепатозащит-

- ное и желчегонное средство // Хим.-фарм. журн. 1994. Т. 28, № 3. С. 56—59.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
6. Максимов О.Б., Горовой П.Г., Кольцова Е.А., Кулеш Н.И. Природные антиоксиданты // Вестн. ДВО РАН. 1996. № 1. С. 40—50.
7. Саратиков А.С., Венгеровский А.И. Новые гепатопротекторы природного происхождения // Эксперим. и клинич. фармакология. 1995. Т. 58, № 1. С. 8—11.
8. Федореев С.А., Кулеш Н.И., Глебо Л.И. и др. Препарат максар из дальневосточного растения маакии амурской // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38, № 11. С. 22—26.
9. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V. et al. Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis* // Fitoterapia. 2000. V. 71. P. 365—372.
10. Fedoreyev S., Bulgakov V. Isoflavonoid composition of the *Maackia amurensis* callus culture // J. of Biotechnology. 2008. V. 136. P. 140—143.
11. Kulesh N.I., Denisenko V.A., Maksimov O.B. Stilbenolignan from *Maackia amurensis* // Phytochemistry. 1995. V. 40, № 3. P. 1001—1003.
12. Kulesh N.I., Maksimov O.B., Denisenko V.A. et al. Isoflavonoids from heartwood of *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim // Chemistry of Natural Compounds. 2001. V. 37, № 1. P. 29—31.

Поступила в редакцию 25.12.2009 г.

Утверждена к печати 17.03.2010 г.

Сведения об авторах

В.С. Чучалин — д-р фарм. наук, доцент, зав. кафедрой фармацевтической технологии СибГМУ (г. Томск).

А.В. Ратькин — канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической технологии СибГМУ (г. Томск).

Е.В. Ратькин — ассистент кафедры фармацевтической технологии СибГМУ (г. Томск).

В.Н. Фролов — канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии СибГМУ (г. Томск).

В.В. Иванов — канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии СибГМУ (г. Томск).

С.А. Федореев — канд. хим. наук, зав. лабораторией химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (г. Владивосток).

В.П. Булгаков — д-р биол. наук, член-корреспондент РАН, гл. науч. сотрудник, зав. отделом биотехнологии Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток).

С.С. Зоркальцев — ассистент кафедры фармацевтической технологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Чучалин Владимир Сергеевич, тел.: 8-913-116-4343, (3822) 42-09-58, e-mail: phtech@ssmu.ru