

Антиоксидантные и антирадикальные свойства полифенолов в механизме гепатопротективного действия препаратов маакии амурской

Раткин Е.В., Иванов В.В., Раткин А.В., Чучалин В.С.

Antioxidant and antiradical properties of polyphenols in the mechanism hepatoprotective actions of preparations *Maackia amurensis*

Ratkin Ye.V., Ivanov V.V., Ratkin A.V., Chuchalin V.S.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Раткин Е.В., Иванов В.В., Раткин А.В., Чучалин В.С.

Для выяснения роли антиоксидантных и антирадикальных свойств полифенолов в механизмах гепатопротективного действия препаратов из маакии амурской исследована активность препаратов из ядровой древесины (максар), экстракта клеточной культуры маакии амурской, мономерных и димерных стильбенов. Антирадикальные свойства препаратов измеряли по способности взаимодействовать со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ). Установлено, что для максара, полифенольного комплекса маакии амурской (ПКМА), мономерных и димерных стильбенов отсутствуют корреляции между антирадикальной активностью данных препаратов из ПКМА в модельной системе с ДФПГ и их гепатопротективным эффектом *in vivo*. Мономерные и димерные стильбены, обладающие наиболее высокой антирадикальной активностью, оцененной по их способности восстанавливать стабильный радикал ДФПГ, не проявили выраженной гепатопротективной активности при гепатите.

Ключевые слова: маакия амурская, максар, стильбены, гепатопротекторы, антиоксидантная и антирадикальная активность.

For finding-out of a role antioxidant and antiradical properties of poly-phenols in mechanisms hepatoprotective actions of preparations from *Maackia amurensis* activity of preparations from ядровой wood (Macsar), an extract of cellular culture *Maackia amurensis*, stilbens. Antiradical properties of preparations measured on ability to cooperate with difenilpikrilgidrazilom (DPPH). It is established, that for Macsar, PKMA, monomeasured and dimeric Stilbens is absent correlations between antiradical activity of the given preparations from a polyphenolic complex Mauck Amur in modelling system with DPPH and them hepatoprotective effect *in vivo*. Monomeasured and dimeric stilbens, possessing the highest antiradical activity appreciated on their ability to restore stable radical DPPH, have not shown expressed hepatoprotective activity at a hepatites.

Key words: *Maackia amurensis*, Macsar, stilbens, hepatoprotectors, antioxidant and antiradical activity.

УДК 615.322:582.736:615.244.014.425

Введение

В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН (г. Владивосток) совместно с кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) разработан гепатопротективный препарат на основе полифенольного комплекса маакии амурской (ПКМА). В состав препарата входят изофлавоны: генистеин, даидзеин, ретузин, афромозин, формононетин, оробол, текториенин, 3-гидроксивеститон, птерокарпаны (маакиаин, медикарпин); мономерные стильбены: резвератрол и пицеатаннол, изофлавоностильбен маакиазин, а также олигомерные

стильбены: сцирпусин А, сцирпусин В, маакин, маакин А и стильбенолигнан мааколин. Большинство данных фенольных соединений из маакии амурской показали высокую антирадикальную и антиоксидантную активность, сопоставимую с эффектом синтетического антиоксиданта ионола [1, 6–8].

В связи с этим несомненный интерес представляет оценка вклада антиоксидантных и антирадикальных свойств данных полифенолов в механизмы гепатопротективного действия препаратов из маакии амурской. С этой целью была исследована активность препаратов из ядровой древесины (максар), экстракта клеточной культуры маакии амурской (ПКМА), мономерных и димерных стильбенов.

Материал и методы

Максар — полифенольная фракция ядровой древесины мааки амурской. В исследованиях использовали субстанцию сухого экстракта мааки амурской, содержащую по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии 21,6% полифенолов, из которых 8,9% — стильбены и 12,7% — изофлавоноиды [6—8, 11].

Полифенольный комплекс клеточной культуры мааки амурской получен в 2002 г. в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН из клеточной культуры растения с помощью экстракции 95%-м этанолом. Экстрактивный комплекс клеточной культуры *Maackia amurensis* (штамм А-18) состоит из изофлавоноидов, включая изофлавоны и птерокарпаны, а также их моно-, ди- и малонилгликозиды. В отличие от нативного экстракта из ядровой древесины мааки амурской ПКМА не содержит мономерных и димерных стильбенов. Нарботка препарата осуществлена в рамках исследований по созданию новой технологии для получения воспроизводимого источника изофлавоноидов, а также для исследования путей их биосинтеза [9, 10].

Мономерные стильбены — извлечение из полифенольного комплекса древесины мааки амурской, полученное методом колоночной хроматографии на силикагеле, содержащее сумму идентифицированных мономерных стильбенов и минорное количество изофлавоноидов. Содержание мономерных стильбенов 33,56% [12, 13].

Димерные стильбены — извлечение из полифенольного комплекса древесины мааки амурской, полученное методом колоночной хроматографии на силикагеле и содержащее сумму идентифицированных димерных стильбенов. Содержание димерных стильбенов 50% [12, 13].

Эксперименты проведены в осенне-зимний период на 80 беспородных белых крысах-самцах массой 180—210 г. Содержание животных соответствовало Правилам лабораторной практики (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.) Все манипуляции (взвешивание, введение препаратов, декапитацию) осуществляли с 09.00 до 12.00, опыты выполняли, соблюдая Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденные МЗ РФ. В качестве экспериментальной модели для моделирования токсических поражений печени использовали масляный раствор тетрахлорметана. Схема введения препаратов исключала прямое взаимодействие на уровне желудочно-кишечного тракта. Тетрахлорметан вводили внутривенно

из расчета 1,25 мл/кг массы тела животного (в 50%-м масляном растворе). Исследуемые препараты вводили в желудок с помощью зонда в наиболее эффективных терапевтических дозах, отобранных на этапе скрининга соответствующих препаратов: ПКМА и максар — в виде суспензии на 1%-м растворе крахмальной слизи в дозе 200 мг/кг массы тела (по 100 мг/кг массы тела за 2 ч до введения тетрахлорметана и спустя 2 ч после введения гепатотоксина), мономерные стильбены — в виде суспензии на 1%-м растворе крахмальной слизи в дозе 50 мг/кг массы тела (по 25 мг/кг массы тела за 2 ч до введения тетрахлорметана и спустя 2 ч после введения гепатотоксина), димерные стильбены — в виде суспензии на 1%-м растворе крахмальной слизи в дозе 35 мг/кг массы тела (по 17,5 мг/кг массы тела за 2 ч до введения тетрахлорметана и спустя 2 ч после введения гепатотоксина). Дозировки фракций стильбенов были рассчитаны исходя из содержания соответствующих групп веществ в максаре.

Антиоксидантную активность различных групп полифенолов из мааки амурской оценивали по гепатопротекторному эффекту соответствующих фракций (влиянию на активность ферментативных систем).

Антирадикальные свойства комплекса полифенолов каждой фракции измеряли по их способности взаимодействовать со стабильным радикалом ДФПГ. Активность характеризовали показателем IC_{50} , означающим эффективную концентрацию вещества, при которой восстанавливается 50% свободных радикалов ДФПГ.

Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического M и стандартной ошибки среднего m . Сравнение средних между группами проводили по непараметрическому H -критерию Краскала—Уоллиса, различия в группах считали значимыми при $p < 0,05$. Расчеты проводили с использованием программы Statistica 6.0 for Windows [5].

Результаты и обсуждение

В результате оценки гепатопротективной активности различных комплексов полифенолов из мааки амурской установлено, что терапия максаром и ПКМА приводила к снижению или нормализации повышенной тетрахлорметаном активности ферментативных систем печени: аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), кислой фосфатазы (КФ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) (табл. 1).

Таблица 1

Влияние максара, ПКМА, мономерных и димерных стильбенов на активность ферментов в сыворотке крови при остром ССІ₄-гепатите (M ± m, средние из 6–10 наблюдений)

Экспериментальная группа	Показатель					
	АСТ, мккат/л	АЛТ, мккат/л	КФ, Е/л	ЛДГ, мккат/л	ЩФ, мккат/л	ГГТП, мккат/л
Контрольная	0,59 ± 0,04	0,45 ± 0,03	16,1 ± 1,1	3,19 ± 0,13	11,55 ± 1,05	0,09 ± 0,02
ССІ ₄ -гепатит	1,01 ± 0,03*	0,81 ± 0,03*	33,8 ± 4,8*	4,64 ± 0,21*	18,53 ± 0,2*	0,24 ± 0,01*
Максар + ССІ ₄	0,68 ± 0,02**	0,63 ± 0,04**	19,6 ± 1,5**	3,21 ± 0,19**	13,80 ± 0,4**	0,13 ± 0,02**
ПКМА + ССІ ₄	0,66 ± 0,04**	0,66 ± 0,02**	21,7 ± 1,4**	3,29 ± 0,03**	14,03 ± 27**	0,14 ± 0,02**
Мономерные стильбены + ССІ ₄	3,21 ± 0,69**	2,08 ± 0,26**	35,9 ± 5,4	3,40 ± 0,13**	18,75 ± 2,58	0,22 ± 0,03
Димерные стильбены + ССІ ₄	0,87 ± 0,08	1,01 ± 0,54	40,2 ± 8,6	3,54 ± 0,15**	17,07 ± 4,91	0,25 ± 0,02

Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к контрольным животным для ССІ₄-гепатита; ** — $p < 0,05$ по отношению к ССІ₄-гепатиту для препаратов.

Известно, что в механизме токсического действия ССІ₄ лежит его способность генерировать преимущественно в печени ССІ₃, которые инициируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембранах гепатоцитов.

По всей видимости, изофлавоноиды, присутствующие в данных препаратах, обладают лиофильностью, за счет чего встраиваются в мембраны гепатоцитов и ингибируют в них процессы липопероксидации, а также предохраняют мембранные фосфолипиды от деструкции. Наряду с этим полифенольные соединения образуют хелатные комплексы с ионами железа и выключают эти катализаторы из реакций свободно-радикального окисления, что также приводит к стабилизации мембраны и прекращению диффузии в кровь печеночно-специфических ферментов [1]. Фракции, в состав которых входили только мономерные или димерные стильбены, на активность данных ферментов в сыворотке крови практически не влияли, что может быть обусловлено отсутствием изофлавоноидов, которые, вероятно, и отвечают за антиоксидантные свойства препаратов из маакии амурской.

Результаты определения антирадикальной активности показали, что среди ПКМА, максара, мономерных и димерных стильбенов фракция димерных стильбенов наиболее эффективно восстанавливала стабильный радикал ДФПГ в диапазоне концентраций от 0,5 до 10,0 мкг/мл и обладала наиболее выраженной антирадикальной активностью. Показатели у максара и мономерных стильбенов были практически одинаковыми, ПКМА проявил наименьшую антирадикальную активность, по-видимому, из-за отсутствия в своем составе группы стильбенов (табл. 2).

Таблица 2

Антирадикальная активность ПКМА, максара, мономерных и димерных стильбенов на модели ингибирования ДФПГ (IC₅₀)

Исследуемый образец	Степень ингибирования IC ₅₀ , мкг/мл
Максар	7,5
ПКМА	22,9
Мономерные стильбены	7,0
Димерные стильбены	4,9

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии корреляции между антирадикальной активностью данных препаратов из ПКМА в модельной системе и их гепатопротективным эффектом *in vivo*. Мономерные и димерные стильбены, обладающие наиболее высокой антирадикальной активностью, оцененной по их способности восстанавливать стабильный радикал ДФПГ, не проявили выраженной гепатопротективной активности при экспериментальном гепатите.

Этот факт позволяет предположить, что в реализации *in vivo* гепатопротективного эффекта препаратов из маакии амурской основное значение имеет не их способность непосредственно взаимодействовать с активными радикалами, а в первую очередь регулирующее влияние полифенолов на деятельность ряда ферментных комплексов, возможно, через антиоксидант-респонсивный элемент, а также способностью оказывать антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие.

Выводы

1. Для максара, ПКМА, мономерных и димерных стильбенов отсутствуют корреляции между антирадикальной активностью данных препаратов из полифенольного комплекса маакии амурской в модельной системе с дифенилпикрилгидразином и их гепатопротективным эффектом *in vivo*.

2. Фракции мономерных и димерных стильбенов определяют антирадикальную активность суммарного экстракта полифенольного комплекса маакии амурской.

3. Гепатопротективное действие препаратов из маакии амурской в первую очередь связано с наличием антиоксидантных свойств у полифенолов, входящих в состав комплекса.

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 гепатозащитное 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. Кулеш Н.И., Максимов О.Б., Глебко Л.И. и др. «Максар» — гепатозащитный препарат из дальневосточного растительного сырья // Тез. докл. на регион. ассамблее: здоровье населения Дальнего Востока. Владивосток, 1996. 263 с.
7. Федорев С.А., Кулеш Н.И., Глебко Л.И. и др. Препарат максар из дальневосточного растения маакии амурской // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38, № 11. С. 22—26.
8. Федорев С.А., Кулеш Н.И., Веселова М.В. и др. Препарат максар из маакии амурской — эффективное гепатозащитное средство // Материалы региональной научной конференции «Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии»: сб. тез. докл. Владивосток, 2004. С. 98—99.
9. Fedoreyev S., Bulgakov V. Isoflavonoid composition of the *Maackia amurensis* callus culture // Journal of Biotechnology. 2008. V. 136. P. 140—143.
10. 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.
11. Fedoreyev S.A., Kulesh N.I., Glebko L.I. et al. Maksar: a preparation based on Amur *Maackia* // Pharm. Chem. J. 2004. V. 38. P. 605—610.
12. Kulesh N.I., Denisenko V.A., Maksimov O.B. Stilbenolignan from *Maackia amurensis* // Phytochemistry. 1995. V. 40, № 3. P. 1001—1003.
13. Kulesh N.I., Maksimov O.B., Denisenko V.A. et al. Isoflavonoids from heartwood of *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim // Chem. of Natural Compounds. 2001. V. 37, № 1. P. 29—31.

Поступила в редакцию 01.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

Сведения об авторах

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

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

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

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

Для корреспонденции

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