

УДК 577.126:57.042

А.Л. ЗАГАЙКО, О.А. КРАСІЛЬНИКОВА, С.В. ЗАЙКА, І.В. СЕНЮК

Національний фармацевтичний університет

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ КОНЦЕНТРАТІВ ТА ЛІПОТРОПНИХ РЕЧОВИН В УМОВАХ ГОСТРОГО ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТИТУ

Проведено порівняльне дослідження ліпотропної активності поліфенольних екстрактів з насіння Винограду культурного сорту «Каберне» та ліпотропних речовин метіоніну та холіну на стан метаболізму ліпідів, показники перекисного окиснення ліпідів у печінці та сироватці крові щурів в умовах гострого токсичного ураження печінки, який спричинено введенням тетрахлорметану. Встановлено, що найбільш виразну ліпотропну активність на моделі гострого тетрахлорметанового ураження печінки продемонстрував комплекс, який складався з метіоніну та поліфенольного концентрату «Каберне».

Ключові слова: поліфеноли, метіонін, холін, тетрахлорметан, фосфоліпіди, триацилгліцерини.

ВСТУП

Найбільш значущими метаболічними захворюваннями печінки поряд з алкогольними ураженнями є неалкогольний стеатоз і неалкогольний стеатогепатит, в патогенезі яких провідна роль належить накопиченню ліпідів у гепатоцити і посиленню процесів вільнорадикального окиснення з накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і розвитком некрозів печінкових клітин [1, 14]. Одночасно відзначаються зміни вмісту в плазмі крові ліпідів і ліпопротеїнів [10]. Для лікування жирового переродження печінки використовуються гепатопротектори – група лікарських засобів природного (рослинного та тваринного) і синтетичного походження, з різними механізмами дії, які підвищують стійкість гепатоцитів до патологічних впливів, підсилюють знешкоджувальну функцію гепатоцитів, сприяють відновленню порушених функцій печінкових клітин [6, 8]. Тому пошук нових гепатопротекторів є надзвичайно актуальною проблемою. Широкий спектр фармакологічних ефектів демонструють рослинні поліфеноли. Багатим джерелом рослинних поліфенолів є насіння Винограду культурного. Для поліфенолів винограду показані антиоксидантна, мембраностабілізуюча, імуномодельюча, протизапальна активності [2, 4, 17]. Метою цієї роботи було проведення порівняльного до-

слідження ліпотропної активності поліфенольних екстрактів з насіння Винограду культурного сорту «Каберне» та ліпотропних препаратів метіоніну та холіну на стан метаболізму ліпідів, показники перекисного окиснення ліпідів у печінці та сироватці крові щурів в умовах гострого токсичного ураження печінки, який спричинено введенням тетрахлорметану.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проводили на самцях щурів масою 180-220 г., що утримувалися на стандартному раціоні виварію. Гостре ураження печінки у щурів моделювали шляхом підшкірного введення 50 % олійного розчину тетрахлорметану в дозі 0,8 мл/100 г маси тіла протягом 2 діб [3].

Тварини були розділені на шість дослідних груп: 1 група – інтактний контроль; 2 група – контрольна патологія; 3 група – поряд з тетрахлорметаном вводили поліфенольний екстракт «Каберне» в дозі 9 мг/100 г маси тіла (в перерахунку на поліфеноли); 4 група – на тлі тетрахлорметанового ураження печінки вводили ліпотропний препарат «Метіонін» в дозі 2 г/кг; 5 група – поряд з тетрахлорметаном одночасно вводили поліфенольний екстракт «Каберне» в дозі 9 мг/100 г маси тіла (в перерахунку на поліфеноли) та препарат «Метіонін» в дозі 2 г/кг; 6 група – поряд з тетрахлорметаном одночасно вводили поліфенольний екстракт «Каберне» в дозі 9 мг/100 г маси тіла (в перерахунку на поліфеноли) та Холіна хлорид в дозі 2 г/кг. Досліджу-

© А. Л. Загайко, О. А. Красільникова, С. В. Зайка,
І. В. Сенюк, 2013

вані поліфенольні комплекси, метіонін та холін вводили за годину до введення тетрахлорметану. По закінченню експерименту тварин декапітували, збирали кров для отримання сироватки.

Печінку перфузували охолодженим фізіологічним розчином. Гомогенат готували у співвідношенні 1 частина печінки : 3 частини 0,1 М Трис-НСІ буферу (рН 7,5). У печінці та сироватці крові визначали вміст загальних ліпідів (ЗЛ), триацилгліцеринів (ТГ), вільних жирних кислот (ВЖК), холестеролу (ХС) та загальний вміст фосфоліпідів (ЗФЛ) за допомогою стандартних наборів реактивів фірми Seltiel (Італія). В сироватці крові активність ферментів-маркерів цитолізу гепатоцитів: аланін амінотрансферази (АЛАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та γ -глутамілтранспептидази (ГГТП) визначали за допомогою стандартних наборів реактивів фірми Felicit-Діагностика. Вміст ТВК-активних продуктів у гомогенаті печінки визначали колориметричним методом, який ґрунтується на здатності цієї суми сполук утворювати у кислому середовищі забарвлені триметинові комплекси з тіобарбітуровою кислотою, що мають максимум поглинання при довжині хвилі 532 нм [6]. Визначення вмісту відновленого глутатіону (ВГ) проводили за здатністю низькомолекулярних тіолових сполук утворювати, під час взаємодії з 5,5'-дитіо-біс-(2-нітробензоатом, забарвлену сполуку – тіо-2-нітробензойну кислоту, водний розчин якої має характерний максимум поглинання при довжині хвилі 412 нм [11]. Активність каталази визначали за зменшенням вмісту Гідро-гену пероксиду в інкубаційному середовищі.

Метод визначення активності каталази базується на здатності Гідрогену пероксиду утворювати із солями амонію стійкі забарвлені екстракти, які мають максимум поглинання при довжині хвилі 410 нм [5].

Статистичну обробку даних проводили з використанням варіаційної статистики (ANOVA). $P < 0,05$ – статистично достовірні результати.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Нами було встановлено, що в умовах гострого ураження печінки спостерігається порушення обміну ліпідів у печінці, що відображається на показниках у сироватці крові. Так, у тканині печінки зростає вміст загальних ліпідів на 52 %, за рахунок підвищення вмісту ТГ, ХС та деякого збільшення рівня ВЖК у клітинах печінки на 115, 83 та 67 %, відповідно (табл. 1). При цьому спостерігається достовірне зменшення вмісту ЗФЛ у тканині печінки на 41 %. Оскільки головним фосфоліпідом клітин печінки є фосфатидилхолін, який входить до складу плазматичної та внутрішньоклітинних мембран клітин, зниження вмісту фосфоліпідів може свідчити про ушкодження мембран, яке може призводити до порушення цілісності клітин та розвитку некротичних процесів. Ці припущення підтверджуються тим, що у сироватці крові, при даній патології, введення тетрахлорметану значно підвищує активність ферментів-маркерів цитолізу гепатоцитів: АЛАТ, ЛФ та ГГТП (табл. 2).

Таблиця 1

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ НА МЕТАБОЛІЗМ ЛІПІДІВ У ПЕЧІНЦІ Й СИРОВАТЦІ КРОВІ НА МОДЕЛІ ГОСТРОГО ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТИТУ (M±M, N=6)

Показник	Інтакт	Патологія	«Каберне»	Метіонін	«Каберне» + Метіонін	«Каберне» + Холін
У тканині печінки						
ЗЛ, мг/г тканини	171,71±7,88	289,76±13,39*	162,18±2,83**	209,69±4,91*,**	165,61±4,76**	199,67±5,93*,**
ХС, ммоль/г	17,78±2,05	32,67±2,62*	22,82±3,87*/**	29,98±2,62*/**	19,43±1,95**	27,63±3,02*/**
ТАГ, мг/г	6,17±0,17	13,29±1,21*	7,45±0,55*/**	8,68±0,87*/**	6,53±0,78**	7,99±0,88*/**
ВЖК, ммоль/г	4,13±0,57	6,93±0,45*	3,96±0,51**	5,38±0,47*/**	4,17±0,38**	5,69±0,57*/**
ЗФЛ, ммоль/г	42,67±2,05	17,78±2,62*	32,82±3,87*/**	25,98±2,62*/**	27,74±3,01*/**	27,78±2,67*/**
У сироватці крові						
ЗЛ, мг/мл	1,87±0,08	2,77±0,24*	1,93±0,43**	2,13±0,10*/**	1,95±0,09*/**	2,24±0,10*/**
ХС, ммоль/л	5,72±0,34	10,55±0,80*	7,75±0,48*/**	9,77±0,49*	6,68±0,38*	8,75±0,49*
ТАГ, мг/мл	0,51±0,17	1,89±0,13*	0,85±0,09**	1,19±0,98*	0,75±0,89*/**	1,28±0,98*
ВЖК, ммоль/л	1,30±0,14	2,80±0,19*	1,88*/**±0,06	2,05±0,49	1,65±0,37**	2,65±0,49
ЗФЛ, ммоль/л	12,93±0,53	7,24±0,53*	10,23±0,49*/**	9,43±0,69*/**	11,05±0,67**	8,93±0,69*/**

Примітки: * – відхилення достовірне відносно інтактного контролю; ** – відхилення достовірне відносно контрольної патології.

**ВИВЧЕННЯ ГЕПАТОЗАХИСНОЇ ДІЇ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З НАСІННЯ
ВИНОГРАДУ НА МОДЕЛІ ГОСТРОГО ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТИТУ, (N=6)**

Показник/ Група	Інтактний контроль	Контрольна патологія	«Каберне» 0,5мл/кг	Метіонін 25мг/кг	«Каберне» + Метіонін	«Каберне» + Холін
У тканині печінки						
ТБК-АП, мкмоль/г	63,03±4,80	85,74±4,41*	75,24±6,28**	78,97±5,13**	69,23±4,71**	78,97±5,13**
ВГ, ум. од.	44,85±4,38	28,73±2,63*	45,95±3,71**	43,76±1,73**	48,48±2,19**	43,76±1,73**
Каталаза, мкат/л	2,64±0,19	3,18±0,19	2,42±0,18**	3,11±0,26**	2,50±0,26	3,11±0,26**
У сироватці крові						
АЛАТ, ммоль/г,л	0,76±0,07	1,58±0,07*	1,26±0,09*/**	1,45±0,15*/**	0,99±0,08*/**	1,45±0,15*/**
ГГТП, ммоль/г,л	3,09±0,21	6,55±0,75*	4,72±0,25*/**	5,88±0,31*/**	3,99±0,28**	5,88±0,31*/**
ЛФ, мкат/л	3,25±0,24	4,63±0,32*	3,98±0,12**	4,12±0,23	3,53±0,19**	4,12±0,23

Примітки: * – відхилення достовірне відносно інтактного контролю; ** – відхилення достовірне відносно контрольної патології.

Причиною зменшення рівня ЗФЛ, ймовірно, є гальмування їх утворення за рахунок посилення синтезу ТГ, яке спостерігалось, або посилення їх гідролізу за участю фосфоліпаз [15, 16], про що свідчить підвищення вмісту ВЖК (табл. 1). Останні є головним субстратом ПОЛ [12], що може бути однією з причин підвищення даного процесу (табл. 2).

Фармакологічна корекція цього стану спрямована, перш за все, на нормалізацію обміну ліпідів і ХС в організмі, стимуляцію мобілізації жиру з печінки і його окислення, посилення синтезу фосфоліпідів в клітинах печінки. У якості препарату порівняння був використаний ліпотропний препарат Метіонін. Фармакологічний препарат Метіонін за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту виявляє ліпотропну активність, підвищує вміст лецитину та інших фосфоліпідів, в деякій мірі сприяє зниженню вмісту холестеролу в крові й нормалізації співвідношення фосфоліпід/холестерол, зменшує вміст ТГ та ЗЛ в печінці (табл. 1). Таким чином, Метіонін покращує функцію печінки, про що свідчить зменшення активності маркерних ферментів печінки: АЛАТ, ЛФ та ГГТП (табл. 2). Проте, слід зазначити, що важливим компонентом ураження печінки та розвитку стеатозу є збільшення кількості активних форм кисню та посилення ПОЛ [10]. Окислювальний стрес ініціює порушення, які пов'язані з кровопостачанням печінки (пошкодження ендотелію судин і синусоїдів печінки із зміною вироблення Нітроген оксиду, погіршення реологічних властивостей крові, стану мікроциркуляторного русла та ін.), що ускладнює перебіг патологічного процесу. Метіонін дещо знижував показники ПОЛ, зокрема вміст ТБК-реактивів та вміст (табл. 2).

Введення поліфенольного комплексу «Каберне» тваринам в умовах розвитку гострого

тетрахлорметанового гепатиту приводило до істотних змін у печінці та сироватці крові тварин. Було показано, що поліфенольний екстракт з насіння винограду сорту «Каберне» значно знижує вміст ТБК-активних продуктів, підвищує вміст ВГ, причому його ефект вірогідно більший ніж у препарату порівняння (табл. 2). Слід відзначити суттєвий вплив поліфенольного концентрату з насіння винограду сорту «Каберне» на показники обміну ліпідів в печінці (табл. 1). Так, вміст ЗФЛ зростає у 1,8 разу, вміст ВЖК знижується практично в 2 рази, порівняно з контрольною патологією (табл. 1).

Як видно з даних, наведених у табл. 1 та 2, введення комплексу, що складається з Метіоніну та поліфенольного концентрату «Каберне» чинить найбільш виразний вплив на вміст різних класів ліпідів у сироватці крові та тканині печінки, у порівнянні з окремим введенням компонентів (табл. 1). Введення комбінації поліфенолів одночасно з метіоніном значно підвищувало вміст ФЛ, знижувало вміст ТАГ та ВЖК, пригнічувало процеси ПОЛ, про що свідчить зниження вмісту ТБК-реактивів у печінці, збільшення рівню ВГ. Про ефективність ліпотропної дії цього комплексу свідчить значне зниження у сироватці крові активності маркерних печінкових ферментів АЛАТ, ЛФ, ГГТП, у порівнянні з метіоніном та поліфенольним екстрактом «Каберне» (табл. 2). Значний ефект комбінованого введення може бути пов'язаний з тим, що дія окремих компонентів цього сполучення доповнює один одного. Так, метіонін посилює утворення головного фосфоліпиду плазматичних мембран – лецитину, а поліфенольні компоненти захищають молекули лецитину, зокрема його поліненасичені фрагменти, від процесів ПОЛ [7, 11]. Це прискорює відновлення структури біомембран.

Однчасне введення комплексу поліфенолів «Каберне» та холіну, який має виражені ліпотропні властивості, також покращувало показники ліпідного обміну, як у печінці, так і у сироватці крові (табл. 1), що також підтверджувалось позитивними змінами в активності маркерних ферментів печінки та зниженням інтенсивності процесів ПОЛ у клітинах печінки (табл. 2). Проте ці зміни були менш виразними, ніж при введенні у комплексі з поліфенолами метіоніну (табл. 2). Більш ефективна дія метіоніну пов'язано з тим, що метіонін – це незамінна амінокислота – донатор рухливих метильних груп, необхідна не тільки для синтезу холіну, з дефіцитом якого пов'язані порушення синтезу фосфоліпідів з жирів і відкладення в печінці нейтрального жиру [9], але й бере участь в обміні сульфурвмісних амінокислот, інших біологічно важливих сполук, активує дію гормонів, вітамінів (В₁₂, аскорбінової, фолієвої кислот), ферментів, білків, реакціях переметилування, дезамінування, декарбоксілювання амінокислот, що також відіграє важливу роль у відновленні метаболічних процесів у печінці після введення токсичного агенту.

Отримані дані свідчать, про те, що серед субстанцій та препаратів, дію яких вивчали, більш виразний ліпотропний ефект продемонструвало сполучення, яке складалося з метіоніну та поліфенольного концентрату «Каберне», порівняно з дією його окремих компонентів. Цей ефект проявився у зменшенні виразності процесів ліполізу, жирового гепатозу, значним зменшенням проявів гіперліпідемії.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що найбільш виразну ліпотропну активність на моделі гострого тетрахлорметанового ураження печінки продемонстрував комплекс, який складався з метіоніну та поліфенольного концентрату «Каберне».
2. Цей комплекс проявив більш виразний ліпотропний вплив, ніж препарат порівняння Метіонін та поліфенольний екстракт «Каберне» при окремому введенні.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Богомолов П.О. Неалкогольный стеатогепатит: патофизиология, патоморфология, клиника и подходы к лечению / П.О. Богомолов, Т.В. Павлова / Фарматека. — 2003. — № 10. — С. 31-39.
2. Вороніна Л.М. Дослідження деяких фармакологічних властивостей олії з кісточок

винограду / Л.М. Вороніна, А.Л. Загайко, Л.В. Галузінська, Б.М. Назен / Клінічна фармація. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 50-53.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. реком.] / [за ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К. : Авіцена. – 2001. – 528 с.
4. Доркина Е.Г. Изучение гепатозащитного действия природных флавоноидных соединений / Е.Г. Доркина / Эксперим. и клинич. фармакология. – 2004. – Т. 67, № 6. – С. 41-45.
5. Дроговоз С.М. Методические рекомендации по экспериментальному изучению желчегонной, холеспазмолитической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных средств: [Издание официальное]. / С.М. Дроговоз, С.И. Сальникова, Н.П. Скакун, В.В. Слышков – К. : ФК МЗ Украины, 1994.
6. Клебанов Г.И., Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопропротеидов / Г.И. Клебанов, И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин, [и др.] // Лабораторное дело.– 1988. – №5. – С. 59-62.
7. Загайко А.Л., Порівняльний аналіз біологічної активності субстанцій, отриманих з винограду сорту «Каберне» / А.Л. Загайко, О.В. Файзуллін, Н.В. Шишкіна, [та ін.] / Фармацевтичний часопис. – 2008. – № 4. – С. 94-97.
8. Саратиков А.С. Гепатопротективные свойства полифенольных комплексов из древесины и клеточной культуры маакии амурской / А.С. Саратиков, В.С. Чучалин [и др.] / Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 1. – С. 51-55.
9. Фадеенко Г.Д. Жировая печень: этиопатогенез, диагностика, лечение / Г.Д. Фадеенко / Сучасна гастроентерологія. – 2003. – Т. 13, № 3. – С. 9-17.
10. Яковенко Э.П. Хронические заболевания печени: диагностика и лечение / Э.П. Яковенко, П.Я. Григорьев / Российский Медицинский Журнал. — 2003. — Т. 11, № 5. — С. 291-296.
11. Puri P. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease / P. Puri, R.A. Baillie, M.M. Wiest [et al.] / Hepatology. – 2007. – Vol. 46, N4. – P. 1081-1090.
12. Beutler E.D. Improved method for the determination of blood glutathione / Beutler E.D., Duron Q., Kelly B.M. // J. Lab. Clin. Med. – 1963. – Vol. 61, № 5. – P. 882.
13. Ježek J. Mitochondrial phospholipase A2 activated by reactive oxygen species in heart mitochondria induces mild uncoupling / J.

- Ježek, M. Jabůrek, J. Zelenka, P. Ježek / *Physiol. Res.* – 2010. – Vol. 59, № 5. – P. 737-747.
14. Moseley R. H. Liver and biliary tract / R. H. Moseley / *Curr. Opin. Gastroenterol.* — 2003. — Vol. 19. — P. 181-184.
15. Tijburg L. B. Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver / L. B. Tijburg, M. J. Geelen, L. M. van Golde / *Biochim Biophys Acta.* – 1989. – Vol. 1004, № 1. – P. 1-19.
16. Wilkins W. P. Group VI phospholipases A2: homeostatic phospholipases with significant potential as targets for novel therapeutics / W. P. Wilkins, S. E. Barbour / *Curr. Drug Targets.* – 2008. – Vol. 9, № 8. – P. 683-697.
17. Wu C.D. Grape products and oral health. / C.D. Wu // *J. Nutr.* – 2009. – Vol. 139, № 9. – P. 1818-1823.

УДК 577.126:57.042

А.Л. Загайко, О.А. Красильникова, С.В. Заика, И.В. Сенюк

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ И ЛИПОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТИТА

Проведено сравнительное исследование липотропной активности полифенольных экстрактов из семян Виноградов культурного сорта «Каберне» и липотропных препаратов метионина и холина на состояние метаболизма липидов, показатели перекисного окисления липидов в печени и сыворотке крови крыс в условиях острого токсического поражения печени, вызванного введением тетрахлорметана. Установлено, что наиболее выразительную липотропную активность на модели острого тетрахлорметанового поражения печени продемонстрировал комплекс, состоящий из метионина и полифенольного концентрата «Каберне».

Ключевые слова: полифенолы, метионин, холин, тетрахлорметан, фосфолипиды, триацилглицерины.

UDC 577.126:57.042

A.L. Zagayko, O.A. Krasilnikova, S.V. Zaika, I.V. Senyuk

A COMPARATIVE STUDY OF LIPOTROPIC ACTIVITY OF GRAPE SEEDS POLYPHENOLIC EXTRACTS AND LIPOTROPIC AGENTS UNDER CARBON TETRACHLORIDE ACUTE TOXIC LIVER INJURY

A comparative study of lipotropic activity of «Cabernet» grape seeds polyphenolic extracts and lipotropic agents methionine and choline on the state of lipid metabolism, lipid peroxidation in liver and serum of rats under carbon tetrachloride acute toxic liver injury was conducted. It was found that the co-administration of methionine and polyphenol concentrate «Cabernet» demonstrated the most expressive lipotropic activity under carbon tetrachloride acute liver injury

Key words: polyphenols, methionine, choline, carbon tetrachloride, phospholipids, triacylglycerols.

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12
Кафедра біологічної хімії
тел. (057)706-30-99

Надійшла до редакції:
11.01.2013