

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2015
УДК 615.322:547.458].015.4:616.36

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ
ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА ЦВЕТКОВ ПИЖМЫ ОБЫКНОВЕННОЙ**

Е.Е. Енгальчева, Е.Н. Якушева, И.А. Сычев, А.В. Шулькин

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

Из цветков пижмы обыкновенной выделен полисахаридный комплекс, представляющий собой гликуроногликан типа пектиновых веществ. На модели острого токсического гепатита, вызванного введением 50%-ного раствора четыреххлористого углерода, проведена оценка его гепатопротекторной активности. По результатам исследования установлено, что полисахарид снижает активность аспартатаминотрансферазы, уменьшает уровень малонового диальдегида, повышает количество свободных сульфгидрильных групп и активность глутатион-S-трансферазы в лизате эритроцитов, то есть обладает выраженным гепатопротекторным и антиоксидантным действием.

Ключевые слова: полисахаридный комплекс, пижма обыкновенная, гепатопротекторная активность, антиоксидантная активность.

В настоящее время большое внимание уделяют поиску и разработке высокоэффективных гепатопротекторов среди лекарственного растительного сырья. Учитывая распространенность токсических поражений печени, целесообразным и обоснованным в их лечении считают использование гепатопротекторных лекарственных средств, которые проявляли бы антиоксидантное действие, повышали активность эндогенной антиоксидантной системы и корректировали нарушение метаболических процессов [2,9].

Весьма перспективную группу соединений в этом отношении представляют растительные полисахариды.

Материалы и методы

Полисахаридный комплекс цветков пижмы обыкновенной (ПСП) выделяли из воздушно-сухих цветков пижмы обыкновенной («Цветки пижмы», ООО «Здоровье», Россия) трехкратной экстракцией 1%-ным раствором оксалата аммония, осаждение и очистку проводили последовательным добавлением этанола, ацетона

и эфира. В предварительных исследованиях был изучен состав, физико-химические свойства и предложен метод стандартизации ПСП [5].

Для изучения гепатопротекторной активности использовали 3%-ный раствор ПСП в дозе 0,3 г/кг массы [5]. Исследование проводили на 28 аутбредных крысах линии CD (Sprague Dawley), массой 150-200г, полученных из питомника «Столбовая», содержащихся в стандартных условиях вивария. Исследования на животных выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ РФ 708н от 23.08.2010). Животные были разделены на 4 группы по 7 особей в каждой. Острый токсический гепатозогепатит моделировали введением 50% масляного раствора четыреххлористого углерода внутривенно в дозе 0,1 мл на 100 г массы животного двукратно через день (контроль патологии) [8].

Первой группе подопытных животных ежедневно в течение 7 суток (начи-

ная через 1 сутки после последнего введения CCl_4 вводили ПСП. Эффективность препарата оценивали через 24 часа после заключительного введения препарата (8-е сутки) по следующим показателям: активность АсАТ и АлАТ, щелочной фосфатазы (ЩФ), глутатион-S-трансферазы (GST), глутатионпероксидазы (GPx), а также по уровню малонового диальдегида (МДА) и свободных сульфгидрильных групп (GSH) в плазме крови и лизате эритроцитов, как маркеров состояния перекисного окисления липидов (ПОЛ). Исследуемые показатели определяли следующим образом: концентрацию МДА (нмоль/мг белка) по реакции с тиобарбитуровой кислотой (по методу Стальной Д.И., Горишвили Т.Г., 1977), уровень GSH (мкмоль/мг белка) по реакции восстановления дисульфид-5,5-дитиобис-2-нитробензоата (по методу Habeeb, 1972) на спектрофотометре Shimadzu UV-150-02, активность GPx (нмоль НАДФ/мин*мг белка) по реакции ферментативного восстановления глутатиона гидроперекисью третбутила (по методу Paglia D.E., Valentine W.N., 1967 в модификации Ланкина В.З.), активность GST (нмоль ХДБН/мин*мг белка) по методу J.N. Keen, W.B. Jakoby (1978) с использованием биохимического анализатора Humalyzer 2000.

Вторая группа животных получала препарат сравнения – расторопши пятнистой плодов экстракт («Карсил», «Софарма», Болгария) – эквивалент силимарина – в дозе 100 мг/кг [3] в режиме на-

значения полисахарида. Интактные животные и крысы контрольной группы получали воду очищенную в эквиваленте.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием прикладных программ MSEXel 2010 и Statsoft Statistica 8.0. Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего результата ($M \pm m$) при нормальном распределении данных и в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля – при распределении данных, отличном от нормального. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Наличие статистически достоверных межгрупповых различий определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), различия между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Выделенный полисахаридный комплекс цветков пижмы обыкновенной представляет собой аморфное вещество светло-серого цвета. Методом тонкослойной хроматографии был установлен моносакхаридный состав ПСП: глюкоза, галактоза, ксилоза и арабиноза. Высокое содержание уроновых кислот (84,70%) позволяет отнести выделенный комплекс к классу гликуроногликанов типа пектиновых веществ [3].

Показатели функционального состояния, ПОЛ и антиоксидантной защиты печени у интактных животных представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Влияние ПСП и силимарина на активность ферментов печени при экспериментальном гепатите

Группа / показатель	Интактные n=7	Контроль гепатита n=7	Лечение гепатита ПСП n=7	Лечение гепатита силимарином n=7
АСТ	81,03±6,02	123,50±24,66*	93,95±10,29**	90,18±8,82**
АЛТ	23,00±2,00	57,21±5,00*	49,96±7,55	38,75 (34,90:43,00)**
ЩФ	306,33±14,74	836,82±286,47*	875,17±255,08	857,70 (528,50:897,00)

В таблицах 1 и 2: * – сравнение с интактными животными ($p < 0,05$),

** – сравнение с контролем патологии ($p < 0,05$)

Таблица 2

Влияние ПСП и силимарина на состояние ПОЛ и антиоксидантной защиты при экспериментальном гепатите

Группа животных показатель	Интактные n=7	Контроль гепатита n=7	Лечение гепатита ПСП n=7	Лечение гепатита силимарином n=7
МДА	6,90±0,55	13,89±5,50	9,01±1,06	7,48±1,94
	29,12±1,97	45,41±8,57*	31,70 (28,27:39,83)**	33,84 (32,13:37,27)**
GSH	42,90 (42,74:43,06)	22,63±3,47*	45,18±8,25**	25,65±9,68
	40,99±5,35	26,20±3,92*	29,41±4,40	34,31±4,27**
GST	12,85±4,53	5,36±0,74*	7,67±2,12**	5,11 (4,46:23,24)
	257,85 (238,80:276,90)	210,95±41,30	176,83±31,10	219,63±67,43
GPx	1,22±0,41	0,50±0,17*	0,91±0,34	0,93±0,29
	36,05 (31,50:40,60)	22,18±15,43	19,00±4,57	27,07±2,11

Введение четыреххлористого углерода вызывало у крыс острое токсическое поражение печени, сопровождающееся активацией ПОЛ. Активность ферментов печени достоверно увеличивалась по сравнению с данными интактных животных: АсАТ – в 1,52 раза, АлАТ – в 2,48 раза, ЩФ – в 2,73 раза. Уровень МДА в плазме крови возрос в 1,56 раза ($p < 0,05$), уровень GSH в лизате эритроцитов и в плазме крови снизился в 1,90 и 1,56 раза соответственно ($p < 0,05$), уровень GST и GPx в гемолизате уменьшился в 2,40 и 2,44 раза соответственно ($p < 0,05$).

У животных с токсическим гепатитом, получавших ПСП курсом в 7 дней, уровень АсАТ и АлАТ снизился по сравнению с контролем патологии в 1,31 раза

($p < 0,05$) и на 12,67% ($p > 0,05$) соответственно (рис. 1).

В гемолизате эритроцитов у крыс с гепатитом, получавших ПСП, содержание МДА уменьшилось на 35,13% ($p > 0,05$), содержание безбелковых тиоловых групп увеличилось на 99,65% ($p < 0,05$), активность GST и GPx повысилась на 43,10% ($p < 0,05$) и 82,00% ($p > 0,05$) соответственно (рис. 2). В плазме крови наблюдалось снижение содержания МДА на 30,19% ($p < 0,05$). При сравнении полученных результатов с данными интактных животных выявлена нормализация уровней МДА и безбелковых тиоловых групп, активности GST и GPx, что можно расценивать как снижение выраженности процессов ПОЛ и стимуляцию системы антиоксидантной защиты клетки.

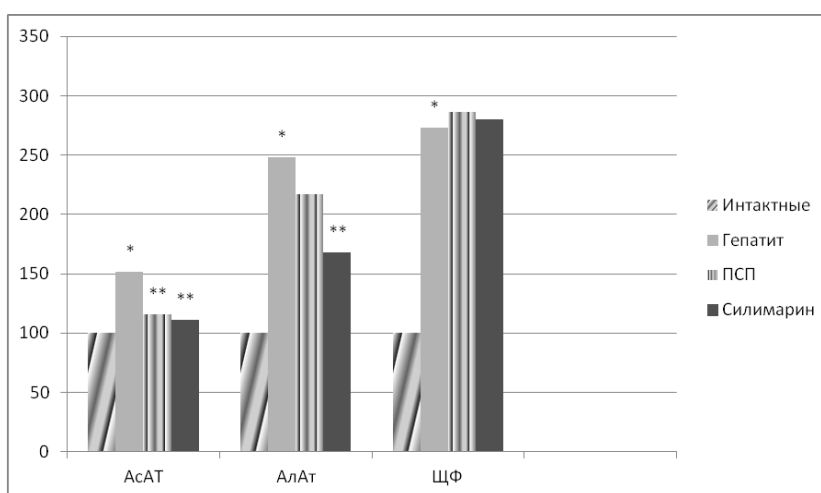


Рис. 1. Активность (в процентах от нормы) ферментов печени в плазме крови на 8-е сутки у крыс с гепатитом и на фоне его лечения ПСП и силимарином

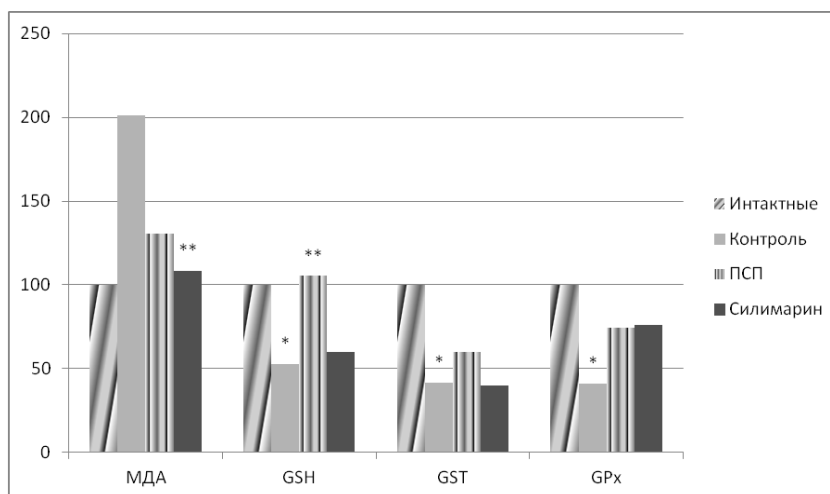


Рис. 2. Содержание (в процентах от нормы) МДА, тиоловых групп и антиоксидантных ферментов в гемолизате эритроцитов на 8-е сутки у крыс с гепатитом и на фоне его лечения ПСП и силимарином

У животных, получавших для лечения токсического гепатита силимарин, наблюдалось достоверное снижение активности АсАТ и АлАТ (в 2,56 и 1,48 раза соответственно) по сравнению с данными контроля патологии. Уровень МДА в гемолизате эритроцитов данной серии крыс

снизился на 46,14% ($p < 0,05$), в плазме крови – на 25,47% ($p < 0,05$). Содержание тиоловых групп в плазме крови увеличилось на 30,96% ($p < 0,05$), активность GST и GPx изменялась разнонаправленно и недостоверно по отношению к контролю патологии (рис. 3).

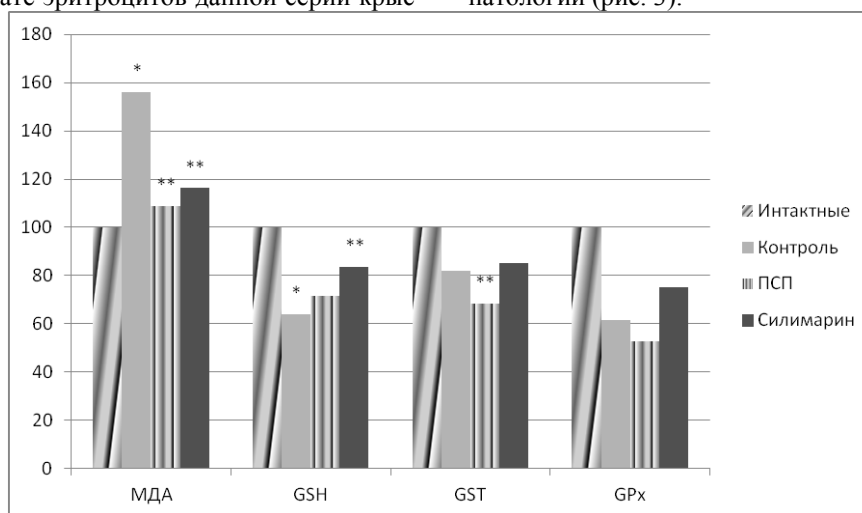


Рис. 3. Содержание (в процентах от нормы) МДА, тиоловых групп и антиоксидантных ферментов в плазме крови на 8-е сутки у крыс с гепатитом и на фоне его лечения ПСП и силимарином

На рисунках 1-3: $p < 0,05^*$ - сравнение с интактными животными, $p < 0,05^{**}$ - сравнение с контролем патологии

У крыс группы контроля патологии острый токсический гепатит приводил к повышению уровня аминотрансфераз и ЩФ, активации процессов ПОЛ, что согласуется с результатами других авторов [1, 3, 4].

Снижение уровня АсАт в сыворотке крови животных с токсическим гепатозо-гепатитом при лечении ПСП свидетельствует об уменьшении цитолиза и повреждения клеточных мембран гепатоцитов. Однако активность ЩФ при лечении ССІ₄-гепатита ПСП и силимарином не уменьшалась, что характерно для сохраняющегося холестаза и/или жировой дистрофии печени. Таким образом, полисахаридный комплекс цветков пижмы обыкновенной, применявшийся для лечения гепатита, оказывает мембраностабилизирующее, гепатопротекторное и антиоксидантное действие, что подтверждается снижением уровня МДА и увеличением содержания безбелковых тиоловых групп в гемолизате эритроцитов и плазме крови. Механизм антиоксидантного действия ПСП может быть обусловлен как способностью прямо взаимодействовать со свободными радикалами за счет наличия в структуре молекулы полисахарида карбоксильных и гидроксильных групп, так и активацией ферментов, отвечающих за распад перекисных соединений [6], что подтверждают полученные нами данные. Кроме того, полисахаридный комплекс является поверхностно-активным веществом и способен образовывать защитный слой на поверхности молекул, взаимодействуя с гликопротеинами и протеогликанами гликокаликса [7], видимо, препятствуя их окислительной модификации.

Выводы

1. Гепатит, вызванный у крыс введением четыреххлористого углерода, сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов, снижением содержания безбелковых тиоловых групп, активности глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы в гемолизате и плазме крови.

2. Полисахаридный комплекс цветков пижмы обыкновенной оказывает ге-

патопротекторное действие за счет уменьшения цитолиза, снижает активность АсАТ в плазме крови, а также проявляет выраженное антиоксидантное действие, характеризующееся уменьшением концентрации МДА в плазме крови, повышением содержания безбелковых тиоловых групп и активности глутатион-S-трансферазы в гемолизате.

3. Полисахарид цветков пижмы обыкновенной уступает силимарину по гепатопротекторной активности, однако превосходит его по антиоксидантному действию.

Литература

1. Антиоксидантные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном / В.И. Смольякова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №5. – С. 98-101.
2. Гепатопротекторная активность 2-дезметоксикарбонил-2-этоксикарбонил-11-дезоксимизопростола / Т.А. Сапожникова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70, № 4. – С. 30-31.
3. Иванова В.В. Изучение гепатопротекторного действия растительного экстракта коры березы при экспериментальном гепатите, вызванном четыреххлористым углеродом // Фундаментальные исследования. – 2013. – №3. – С. 277-279.
4. Изучение гепатозащитных свойств сухого экстракта из листьев абрикоса обыкновенного на модели поражения печени тетрахлорметаном / А.Л. Штробля [и др.] // Вестник РАМН. – 2013. – №3. – С. 68-72.
5. Кириченко Е.Е., Сычев И.А., Чекулаева Г.Ю. Выделение, физико-химическое исследование и определение солубилизирующей активности полисахаридов цветков пижмы обыкновенной // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2012. – №4. – С. 146-150.
6. Коленченко Е.А. Сравнительная оценка антиоксидантной активности некрахмальных полисахаридов: автореф.

- дис. ... канд. биол. наук / Е.А. Коленченко. – Влад, 2004. – 28 с.
7. Лаксаева Е.А., Сычев И.А. Влияние полисахарида ирги обыкновенной на резистентность мембран эритроцитов // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С. 65-68.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под общ. ред. А.М. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
9. Сравнительная оценка гепатопотекторной активности экстракта кукурузы с рыльцами сухого и его смесей с энтеросорбентами / Л.Г. Дворникова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 10-12. – С. 393-396.

STUDY OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF FLOWERS TANSY POLYSACCHARIDE COMPLEX

E.E. Engalycheva, E.N. Yakusheva, I.A. Sychov, A.V. Shchulkin

Polysaccharide complex extracted from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) flowers is pectines type glucuronolactone. Its hepatoprotective activity was assessed on the model of acute toxic hepatitis caused by introduction of carbon tetrachloride 50% solution. It was found that the polysaccharide reduced the aspartate aminotransferase activity, decreases the level of malondialdehyde, increases the amount of free SH-groups and glutathiontransferase activity in lysate of erythrocytes, i.e. polysaccharide complex has a pronounced hepatoprotective and antioxidant properties.

Keywords: polysaccharide complex, tansy (*Tanacetum vulgare* L.), hepatoprotective activity, antioxidant activity.

Енгальчева Е.Е. – ассист. кафедры общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: obschhim@mail.ru

Якушева Е.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Сычев И.А. – д.б.н., зав. кафедрой общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: obschhim@mail.ru

Шулькин А.В. – к.м.н., ассист. кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru