

УДК 615.322:612.354.1

КОРНИ МААКИИ АМУРСКОЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

¹Фоменко С.Е., ^{1,3}Кушнерова Н.Ф., ¹Спрыгин В.Г., ²Федореев С.А.

¹ФГБУН «Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН», Владивосток;

²ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии

им. Г.Б. Елякова ДВО РАН», Владивосток;

³Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета,

Владивосток, e-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Показано, что экстракт корней дальневосточного растения Маакии амурской (*Maackia amurensis* Rupr et Maxim.) содержит комплекс изофлавоноидов. В нем присутствуют гликозидные формы изофлавонов и птерокарпанов в количестве 78% от сухого остатка экстракта, что свидетельствует о перспективности создания на его основе фитопрепаратов. На модели токсического гепатита, вызванного интоксикацией крыс четыреххлористым углеродом, исследовано влияние спиртового экстракта из корней Маакии амурской на состояние липидного обмена печени крыс. Введение экстракта сопровождалось снижением удельной массы печени и снятием ее жировой инфильтрации за счет снижения количества общих липидов и триацилглицеринов, а также восстановлением этерифицирующей функции печени. Показано, что экстракт, содержащий комплекс изофлавоноидов, способствует нормализации показателей липидного обмена печени более эффективно, чем эталонный гепатопротектор «Легалон®». Экстракт корней Маакии амурской является перспективным источником для создания гепатопротекторных препаратов с высокой гиполлипидемической активностью.

Ключевые слова: четыреххлористый углерод, печень, липидный обмен, экстракт корней Маакии амурской

MAACKIA AMURENSIS ROOTS – PROMISING SOURCE FOR HEPATOPROTECTIVE PREPARATIONS

¹Fomenko S.E., ^{1,3}Kushnerova N.F., ¹Sprygin V.G., ²Fedoreev S.A.

¹V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute FEBRAS, Vladivostok;

²G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEBRAS, Vladivostok;

³Biomedicine school of Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

It is shown that extract of roots of a Far East plant of *Maackia amurensis* Rupr et Maxim contains complex of isoflavonoids. Glycosides forms of isoflavonov and pterkarpanov are present at it in number of 78% from the dry residue of extract that testifies to prospects of creation on its basis of phytopreparations. On the model of toxic hepatitis, induced by carbon tetrachloride damage, it was studied the influence of the *Maackia amurensis* roots extract on the lipids metabolism state in rat's. Administration of the extract resulted in reducing of the liver's specific weight and diminution of fatty infiltration because of decreasing of general lipids and triacylglycerols quantity and due to restoration of the liver's etherification function. It was shown, that extract, containing isoflavonoid complex, facilitate the normalizing of liver's lipids metabolism indexes more effective, than reference hepatoprotector «Legalon®». Extract of *Maackia amurensis* a promising source for development of hepatoprotective preparations with high hypolipidemic activity.

Keywords: carbon tetrachloride, liver, lipid metabolism, extract of *Maackia amurensis* Rupr et Maxim roots

Рациональное использование растительных ресурсов имеет существенное значение для жизнедеятельности человека. Из общего количества, заготавливаемого в нашей стране сырья, большая часть приходится на долю дикорастущих лекарственных растений. При этом объем выпускаемых лекарственных средств на основе растительного сырья удовлетворяет потребности населения в них всего лишь на 30–35% [1]. Разработка новых лекарственных средств из дальневосточных растений, в первую очередь, способных усиливать регенеративные процессы в печени, и внедрение их в широкую медицинскую практику, приобрели особую социальную значимость. Сегодня большинство зарегистрированных в Российской Федерации препаратов из группы гепатопротекторов являются зарубежными

и, соответственно, из-за высокой стоимости они практически малодоступны для большей части населения. С другой стороны, из-за интенсивного и нерегулируемого сбора растительного сырья его запасы постепенно истощаются. Для решения этой проблемы необходимо развивать безотходное производство, то есть по возможности комплексное использование всех частей растения в качестве источников сырья.

В ранее проведенных исследованиях из сухого экстракта ядровой древесины Маакии амурской (*Maackia amurensis* Rupr et Maxim.) сем. Fabaceae был выделен полифенольный комплекс, основными компонентами которого являлись изофлавоны, птерокарпаны, мономерные и димерные стильбены и др. [7]. На его основе был создан гепатопротекторный препарат

«Максар®» (Р N 003294/01). Для более эффективного использования ценного реликтового растения, эндемичного для Дальнего Востока, важно было оценить возможность применения корней в качестве альтернативного источника сырья и создания на его основе новых фармацевтических средств. Проведенный сравнительный химический анализ органов этого растения показал, что по составу метаболитов корни существенно отличаются от древесины. При этом экстракт корней содержал свыше 78% от сухого остатка дигликозидные производные изофлавонов и птерокарпанов (патент RU № 2454243 С1). Известно, что растительные полифенольные соединения подавляют основное звено патогенеза токсического гепатита, а именно перекисное окисление липидов, а также улучшают антиоксидантную и экскреторную функцию гепатоцитов [3, 5]. Это и определило перспективность создания новых гепатопротекторных и антиоксидантных препаратов на основе комплекса изофлавоноидов, выделенного из экстракта корней Маакии амурской.

В экспериментальных исследованиях в качестве гепатотоксического агента был использован четыреххлористый углерод (CCl_4), который метаболизируется в печени с образованием высокореактивных трихлорметильных радикалов (CCl_3^* , CCl_3OO^*). Эти радикалы иницируют цепь реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ), взаимодействуют с клеточными молекулами, ослабляя ключевые процессы, такие как липидный обмен с потенциальным исходом – жировой дегенерацией (стеатозом) [9].

Для фармакологической коррекции жирового перерождения и восстановления поврежденных участков печени перспективными являются растительные антиоксиданты полифенольной природы, которые, являясь ловушками свободных радикалов, подавляют процессы ПОЛ, препятствуют разрушению клеточных мембран. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния экстракта из корней Маакии амурской на состояние липидного обмена печени при интоксикации крыс четыреххлористым углеродом.

Материалы и методы исследования

Экстракт корней Маакии амурской получали путем экстракции измельченных корней этого растения 95%-м спиртом при 50–55°C в соотношении сырья к экстрагенту 1:5 (об/об). Экстракцию осуществляли методом реперколяции. Полученное спиртовое извлечение упаривали и высушивали в вакуумном эксикаторе до постоянного веса, затем растворяли в 30% этиловом спирте и экстрагировали гексаном для удаления неполярных компонен-

тов. С использованием колоночной хроматографии из спиртового экстракта корней Маакии амурской были выделены 7 изофлавоноидов, а их структуры установлены методами ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как даидзин (1), генистеин-7-*O*-гентиобиозид (2), псевдобаптегенин-7-*O*-гентиобиозид (3), формонетин-7-*O*-гентиобиозид (4), 5-*O*-метилгенистеин-7-*O*-гентиобиозид (5), (6aR,11aR)-маакиаин-3-*O*-гентиобиозид (6) и (6aR,11aR)-медикарпин-3-*O*-гентиобиозид (7) (патент RU № 2454243 С1). Выход экстракта, содержащий суммарную фракцию гликозидов изофлавонов и птерокарпанов (1-7) после упаривания составил 2,0% в пересчете на сухие корни и 78% от сухого остатка спиртового экстракта. Выделенный комплекс изофлавоноидов (1-7) обладал низкой токсичностью (ЛД₅₀ для крыс составляет 1000 мг/кг), не оказывал вредного действия при длительных введениях в желудок и парентерально. Среди биологически активных фракций экстракта корней доминирующими были изофлавоноиды, поэтому стандартизацию экстракта проводили по суммарному содержанию изофлавоноидов (1-7) и дозу вводимого вещества рассчитывали в мг суммы изофлавоноидов на 1 кг массы животного.

В качестве эталонного препарата сравнения использовали «Легалон®140» (MADAUS AG, Германия). Лекарственная форма – капсулы (1 капсула Легалон-140 содержит 173–188,7 мг сухого экстракта из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum*), эквивалентно 140 мг силимарина).

Эксперимент проводили на белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при естественном освещении и постоянной температуре 20–22°C. Интоксикацию животных (крысы) четыреххлористым углеродом осуществляли согласно руководству для проведения доклинических испытаний [4]. Крысам внутрижелудочно вводили 50%-й масляный раствор CCl_4 из расчета 1,25 мл/кг в течение 4 суток. Контрольным животным вводили оливковое масло в сопоставимой дозе. Предварительно освобожденный от спирта экстракт корней маакии и легалон животным вводили внутрижелудочно через зонд в дозе 200 мг/кг в виде взвеси в 1% крахмальном клейстере [2]. В ходе эксперимента были выделены следующие группы животных по 10 крыс в каждой: 1-я – контроль; 2-я – внутрижелудочное введение через зонд CCl_4 в течение 4 дней; 3-я – введение CCl_4 в течение 4-х дней с последующей отменой (депривация) в течение 7 дней; 4-я – депривация и введение экстракта корней в течение 7 дней, 5-я – депривация и введение легалона в течение 7 дней. Крыс выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН.

Печень после извлечения промывали в физиологическом растворе и использовали для исследования. Экстракты общих липидов из ткани печени готовили по методу J. Folch et al. [8]. Количество общих липидов определяли весовым методом в мг на 1 г ткани. Хроматографическое распределение нейтральных липидов проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле

в системе растворителей гексан:серный эфир:уксусная кислота в соотношении 90:10:1 по объему. Идентификацию пятен липидов проводили с помощью очищенных препаратов. Количественное определение фракций нейтральных липидов выполняли по методу J.S. Amenta [6]. Результаты выражали в % от суммы всех фракций. Полученные данные обрабатывали с помощью статистической программы Instat (Graph Pad Software Inc. USA, 2005) со встроенной процедурой проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий в зависимости от параметров распределения использовали параметрический t-критерий Стьюдента или непараметрический U-критерий Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

В процессе эксперимента после 4-х дневного введения CCl_4 удельная масса печени повысилась на 20% ($p < 0,01$), что составляло $5,12 \pm 0,24$ по сравнению с $4,29 \pm 0,19$ г/100 г массы в контроле. При визуальном осмотре в печени была выражена зернистость жировых включений. Введение CCl_4 вызвало у животных типичную картину токсического гепатита с изменением биохимических показателей, характеризующих состояние липидного обмена печени (таблица).

Изменения в содержании нейтральных липидов в печени крыс после интоксикации четыреххлористым углеродом и введения растительных препаратов (M ± m)

Нейтральные липиды	1 группа Контроль	2 группа CCl_4	3 группа Депривация (отмена CCl_4)	4 группа Депривация + экс- тракт маакии	5 группа Депривация + легалон
ТАГ	$23,84 \pm 0,33$	$26,51 \pm 0,68^{**}$	$29,18 \pm 0,96^{***}$	$^{**}23,90 \pm 1,03$	$^{*}25,16 \pm 1,14$
СЖК	$14,26 \pm 0,44$	$16,55 \pm 0,53^{**}$	$17,90 \pm 0,54^{***}$	$13,42 \pm 0,61$	$14,66 \pm 0,63$
ЭЖК	$16,16 \pm 0,55$	$15,55 \pm 0,52$	$13,19 \pm 0,62^{**}$	$16,91 \pm 0,88$	$15,87 \pm 0,89$
ХС	$17,55 \pm 0,48$	$20,16 \pm 0,40^{***}$	$19,54 \pm 0,55^{*}$	$17,00 \pm 0,46$	$17,68 \pm 0,42$
ЭХС	$17,24 \pm 0,33$	$12,89 \pm 0,59^{***}$	$13,14 \pm 0,68^{***}$	$^{***}19,69 \pm 0,74^{**}$	$^{**}17,00 \pm 0,77$
Остаточная фракция	$10,95 \pm 0,23$	$8,34 \pm 0,51$	$7,05 \pm 0,89$	$9,08 \pm 0,70$	$9,63 \pm 0,84$

Примечание. Различия статистически достоверны при * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. Звездочки справа – сравнение с контрольной группой, звездочки слева – сравнение с 3-й группой (депривация); ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина.

Так, количество общих липидов возросло более чем в 3 раза ($137,12 \pm 5,38$ по сравнению с $43,67 \pm 3,52$ мг/г ткани в контроле, $p < 0,001$). При этом количество триацилглицеринов (ТАГ) увеличилось на 11% ($p < 0,01$), холестерина (ХС) на 15% ($p < 0,001$), свободных жирных кислот (СЖК) на 16% ($p < 0,01$). Механизм данных нарушений обусловлен распадом ТАГ в жировой ткани (химический стресс), выходом жирных кислот и глицерина в кровь и их ресинтезом в ТАГ в печени. Так как синтез фосфолипидов из ТАГ нарушен, то жирные кислоты и ТАГ накапливаются в гепатоцитах, что обуславливает развитие жировой инфильтрации. Из-за активации реакций липолиза под действием CCl_4 происходит интенсивное окисление жирных кислот до ацетил-КоА, который конденсируется в печени с образованием избытка ХС. Снижение уровня эфиров холестерина (ЭХС) (на 25%, $p < 0,001$) свидетельствует о нарушении этерифицирующей функции печени в связи с ингибированием фермента АХАТ (ацил-КоА: холестерин-ацилтрансфераза).

Через 7 дней после отмены CCl_4 (период депривации) в печени подопытных живот-

ных (3-я группа) большинство изученных физиологических и биохимических параметров не нормализовалось, более того, отмечалось еще большее отклонение от нормы ряда показателей, что свидетельствует о продолжающемся токсическом стрессе и недостаточности собственных защитных сил организма противостоять развитию токсической патологии. Удельная масса печени стала еще выше, чем таковая во 2-й группе и составляла $5,79 \pm 0,19$ г/100 г массы, что на 35% было выше контрольных величин. В ткани печени сохранилась зернистость жировых включений. Период депривации (3-я группа) сопровождался сохранением повышенного содержания ТАГ, СЖК и ХС (таблица). Также отмечалось достоверно низкое содержание ЭХС и эфиров жирных кислот (ЭЖК). То есть этерифицирующая функция печени не восстановилась и процесс развития жировой инфильтрации продолжился.

Введение экстракта из корней маакии в период отмены CCl_4 (4 группа) восстановило удельную массу печени животных и фракционное содержание липидов до контрольных значений. При введении

легалона (5 группа) удельная масса печени превышала контроль на 8% ($p < 0,05$), что обусловлено увеличением количества общих липидов на 34% ($p < 0,001$). При сравнении показателей липидного обмена в обеих группах с таковыми в группе депривации (3 группа) отмечалось выраженное снижение количества общих липидов и отдельных фракций нейтральных липидов (ТАГ, СЖК и ХС). Обращает на себя внимание повышенное содержание ЭХС (на 14%; $p < 0,01$) по сравнению с контролем при введении экстракта из корней маакии. Это положительный фактор, так как предполагает влияние препарата на выведение из мембран холестерина, который поступает в печень в виде эфиров. То есть препараты эффективно восстанавливали этерифицирующую функцию печени и снимали жировую инфильтрацию.

Выводы

1. Введение экстракта из корней Маакии амурской при экспериментальном СС₄-гепатите у крыс сопровождалось выраженным гепатозащитным действием, что проявлялось в восстановлении показателей липидного обмена печени и ее удельной массы.

2. Показано, что экстракт корней, содержащий комплекс изофлавоноидов, не уступает эталонному препарату сравнения «Легалон®» по выраженности гепатозащитных свойств, а по ряду показателей (статистически достоверно более низкая величина удельной массы печени, общих липидов, триацилглицеринов) превосходит его гепатопротекторный эффект.

3. Экстракт корней Маакии амурской является перспективным источником для создания гепатопротекторных препаратов с высокой гиполлипидемической активностью.

4. Полученные результаты позволяют обосновать возможность создания безотходной технологии, повышающей рациональность использования растительного сырья, путем реализации всех частей растения Маакии амурской для получения высокоактивных фитопрепаратов.

Список литературы

1. Васильев А.В., Полоз Т.П., Соколов Н.Н. Лекарственные растения России – неиссякаемый источник для создания новых высокоэффективных лечебно-профилактических препаратов и биологически активных пищевых добавок // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 108–109.

2. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Вестник фарм. комитета. – 1999. – № 2. – С. 9–12.

3. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Гордейчук Т.Н. Эффективность применения растительного препарата диприм для восстановления функционального состояния печени после поражения этиловым спиртом // Гигиена и санитария. – 2002. – № 1. – С. 56–59.

4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Р.У. Хабриев (ред). – М.: Медицина, 2005. – 829 с.

5. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. Отходы от переработки дальневосточных дикоросов – перспективные источники пищевых антиоксидантов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1(3). – С. 812–815.

6. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. – 1964. – Vol. 5. – P. 270–272.

7. Fedoreev S.A., Kulish N.I., Glebko L.I., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Saratikov A.S., Vengerovskii A.I., Chuchalin V.S.. Maksar: A preparation based on Amur maackia // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2004. – Vol. 38, № 11. – P. 22–26.

8. Folch J., Less M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.

9. Weber L.M., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model // Crit. Rev. Toxicol. – 2003. – Vol. 33, № 2. – P. 105–136.

References

1. Vasil'ev A.V., Poloz T.P., Sokolov N.N. Voprosy medicinskoj himii, 2000, T. 46, no. 2. pp. 108–109.

2. Vengerovskij A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. Vedomosti farm. Komiteta, 1999, no 2, pp. 9–12.

3. Kushnerova N.F., Sprygina V.G., Fomenko S.E., Gordejchuk T.N. Gigena i sanitarija, 2002, no 1, pp. 56–59.

4. Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv, R.U. Habriev (red). Moskva.: Medicina, 2005, 829 p.

5. Sprygina V.G., Kushnerova N.F., Fomenko S.E. Izvestija Samarskogo nauchnogo centra RAN, 2010, T. 12, no. 1(3), pp. 812–815.

6. Amenta J.S. J. Lipid Res. 1964, Vol. 5. pp. 270–272.

7. Fedoreev S.A., Kulesh N.I., Glebko L.I., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Saratikov A.S., Vengerovskii A.I., Chuchalin V.S. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2004, Vol. 38, no 11, pp. 22–26.

8. Folch J., Less M., Sloane Stanley G.H. J. Biol. Chem., 1957. Vol. 226, pp. 497–509.

9. Weber L.M., Boll M., Stampfl A. Crit. Rev. Toxicol., 2003. Vol. 33, no 2, pp. 105–136.

Рецензенты:

Богданович Л.Н., д.б.н., заведующая лабораторией инновационных медико-биологических исследований и технологий, ФГБУЗ Медицинского объединения ДВО РАН, г. Владивосток;

Палагина М.В., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией фундаментальных и прикладных проблем товароведения, Школа экономики и менеджмента Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 01.04.2014.