

Роль процессов свободнорадикального окисления в механизме гепатопротекторного действия масла из семян амаранта

Г.Н. Блинецова, М.И. Рецкий, Н.Д. Полякова-Семенова, И.М. Коренская

*Всероссийский НИВИ патологии, фармакологии и терапии РАСХН, Воронеж
Воронежский государственный университет, Воронеж*

Профилактическое применение внутрь амарантового масла в дозе 0,5 мл на кг массы тела оказывает выраженное гепатопротекторное действие при токсическом гепатите, вызванным введением тетрахлорметана. Выдвинуто предположение о том, что механизм гепатопротекторной активности препарата обусловлен снижением интенсивности образования супероксиданиона и стабилизацией процессов пероксидного окисления липидов.

Ключевые слова: амарантовое масло, гепатопротектор, свободнорадикальное окисление, тетрахлорметан, токсическое повреждение печени.

Введение

В основе морфологических изменений, развивающихся в печени при её токсическом повреждении, лежит цитолиз гепатоцитов, инициирующий процесс прогрессирующего некролиза печеночных клеток [3]. Одним из универсальных механизмов повреждения и даже гибели клеток любых органов, тем более печени, является чрезмерная пероксидация мембранных структур, обусловленная усиленной выработкой активных форм кислорода [1, 19]. Повышение уровня продуктов пероксидного окисления в органах и тканях при интоксикации печени оказывает неблагоприятное влияние на структурно-функциональное состояние клеток, в том числе самих гепатоцитов, вызывая в них процессы аутолиза и самоокисления [16]. В связи с этим, при разработке средств лечения поражений печени различной этиологии внимание исследователей привлекают препараты, обладающие антиоксидантными свойствами [6], среди которых особое место занимают препараты на основе природного сырья [23].

Одним из таких препаратов является жирное масло из семян различных видов амаранта (*Amaranthus spp. L.*). В его состав

помимо витамина Е входят полиненасыщенные жирные кислоты, сквален, витамины группы Д, рибофлавин, холин, желчные кислоты и спирты, стероиды, фитостерины, фосфолипиды [11]. И хотя лекарственные препараты на основе амарантового масла применяют наружно при псориазе, экземах, нейродермитах, пролежнях, а внутрь — при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, онкозаболеваниях [7, 12], механизм гепатопротекторного действия амарантового масла остается не достаточно изученным, что и обусловило цель настоящей работы.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 80 половозрелых конвенциональных нелинейных крысах-самцах с массой тела 200–250 г, разведения вивария Всероссийского НИВИ патологии, фармакологии и терапии. Животные содержались в условиях вивария при 20–22 °С и влажности 40–60 % и получали без ограничения гранулированный корм КК-58-2218.00-316гр производства АОТ «Воронежский экспериментальный комбикормовый завод».

В качестве подстилочного материала использовали древесные опилки. На мо-

мент проведения исследований животные были клинически здоровы, без изменений в поведении, аппетита, режимов сна и бодрствования. За 12 часов до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды. Токсическое повреждение печени и получение биоматериала проводили в соответствии с существующими требованиями к экспериментам на животных.

Исследования проведены на 4 группах животных. Первая группа ($n = 20$) – интактные животные, которым внутривенно вводили физиологический раствор из расчета 0,5 мл/кг. У животных 2-й группы ($n = 20$) вызывали токсическое повреждение печени тетрахлорметаном (ТХМ, CCl_4). Крысам 3-й группы ($n = 20$) в течение 6 суток внутривенно с помощью специального зонда в утренние часы, до основного кормления, вводили амарантовое масло (АМ) из расчета 0,5 мл/кг. Животным 4-й группы ($n = 20$) в течение 6 дней внутривенно вводили амарантовое масло в дозе 0,5 мл/кг, и на 5 и 6 дни – внутривенно CCl_4 . Все исследования проводили через сутки после повторного введения CCl_4 . Токсическое повреждение печени вызывали путем двукратного внутривенного введения, один раз в сутки, тетрахлорметана в виде 40%-ного раствора в оливковом масле в дозе 0,2 мл/100 г массы тела [5].

Амарантовое масло получали экстракционным способом по оригинальной технологии, разработанной в Воронежском государственном университете [13], из семян амаранта отечественных сортов «Ультра», «Харьковский 1», «Харьковский 2», отвечающих требованиям ГОСТ 28636-90.

О степени повреждения печеночной паренхимы судили по изменению активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови, которую определяли с использованием тест-системы «АлАТ-Им-пакт», и по изменениям гистоструктуры ткани печени. Об интенсивности процес-

сов пероксидного окисления и состоянии системы антиоксидантной защиты судили по изменению содержания в крови конъюгированных диенов (ДК), кетодиенов (КД), малонового диальдегида (МДА), активности каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) [4] и супероксиддисмутазы (СОД) [14], степени окислительной модификации белков плазмы крови [21]. Определение уровня супероксиданиона и источников его генерации в гомогенате печени проводили с использованием модифицированного НСТ-теста, позволяющего оценить суммарную (спонтанную), а также потенциальную преимущественную генерацию супероксиданиона в митохондриальной или микросомальной электронотранспортной цепи [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты

Установлено, что после двукратного внутривенного введения тетрахлорметана в сыворотке крови опытных животных активность АлАТ, являющаяся маркером цитолитических процессов клеток печени, возрастала в 3,51 раза (рис. 1).

Помимо этого при гистологическом исследовании печеночной ткани были обнаружены явные признаки токсического ге-

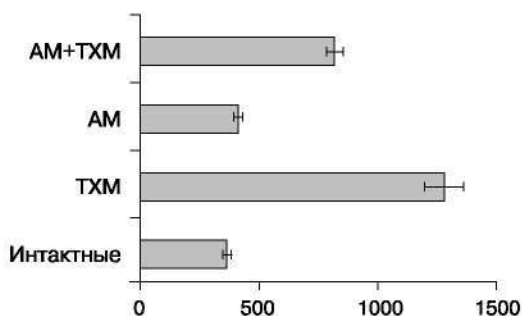
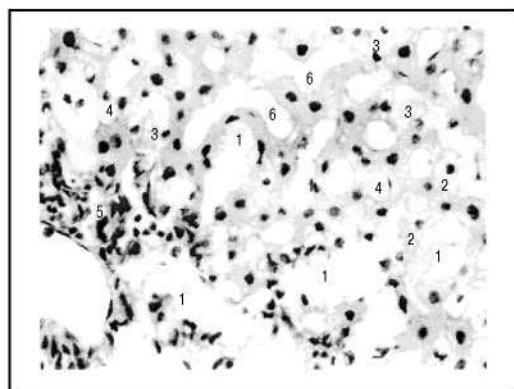
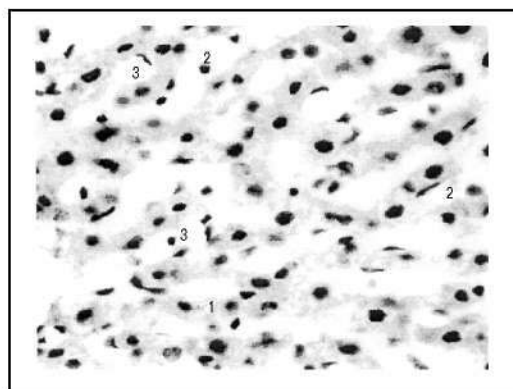


Рис. 1. Активность АлАТ (нМоль/сек × л) в сыворотке крови крыс при токсическом повреждении печени CCl_4 и применении амарантового масла



А

1 – некрозы; 2 – жировая дистрофия мелко- и среднекапельная; 3 – жировая дистрофия крупнокапельная; 4 – жировые кисты; 5 – периваскулярная инфильтрация; 6 – расширенные синусоиды



Б

1 – жировая дистрофия мелкокапельная; 2 – жировая дистрофия средне- и крупнокапельная; 3 – жировые кисты

Рис. 2. Гистоструктура печени после введения ТХМ (А) и интоксикации им на фоне применения АМ (Б). Окраска гематоксилином-эозином; увеличение: $\times 280$

патита: некрозы, различные формы жировой дистрофии, выраженная периваскулярная инфильтрация в окружности центральной вены, расширение синусоидов, характеризующее застойные явления (рис. 2А).

Характер установленных нарушений структуры печеночной ткани и повышение активности АЛАТ соответствуют изменениям, происходящим при развитии гепатозо-гепатита [10].

Внутрижелудочное введение амарантового масла в дозе 0,5 мл/кг перед введением тетрахлорметана оказывало достаточно выраженное гепатопротекторное действие, снижая активность АЛАТ в сыворотке крови на 36,1% по сравнению с её активностью у животных с токсическим гепатитом, вызванным введением тетрахлорметана.

Об ограничивающем влиянии профилактического применения АМ на проявление цитолитического синдрома свидетельствуют и результаты гистологического исследования. В печеночной паренхиме у животных 4-й группы (АМ+ТХМ) хотя и наблюдались явления жировой дистрофии, но отсутствовали некротические

поражения, и сохранялась балочная структура печеночной дольки (рис. 2Б). Для выяснения механизмов, обуславливающих проявление гепатопротекторной активности амарантового масла, было оценено его влияние на интенсивность свободнорадикального окисления и состояние антиоксидантной системы при тетрахлорметановой интоксикации.

Поскольку чрезмерное образование реактивных метаболитов является одним из универсальных механизмов повреждения клеток печени, представляло интерес не столько изменение интенсивности свободнорадикального окисления и генерации супероксиданионрадикала (что является вполне закономерным), сколько изучение субклеточной локализации образования $O_2^{\cdot -}$ в различных компартментах клетки.

Проведенные исследования показали, что токсическое повреждение печени сопровождается усилением на 66 % спонтанной генерации супероксида в гомогенате печени. При этом существовали различия в интенсивности образования $O_2^{\cdot -}$ в митохондриальной и микросомальной электронтранспортных цепях (табл. 1). Преиму-

существенно митохондриальная (НАДН-индуцированная) генерация $O_2^{\cdot-}$ возрастала в 2,3 раза, а НАДФН-стимулированная (преимущественно микросомальная) — в 2,8 раза.

Применение животным амарантового масла существенно понижало интенсивность генерации супероксиданиона при CCl_4 -индуцированном токсическом повреждении печени. Наиболее существенно снижались спонтанная и НАДН-стимулированная продукция $O_2^{\cdot-}$: соответственно на 21,7 % и 27,1% ($p < 0,05$) по сравнению с животными, которым вводили только один тетрахлорметан. При этом НАДФН-зависимое образование супероксида статистически достоверно уменьшалось всего на 8,5%.

Ограничивающее влияние превентивного применения амарантового масла на интенсивность образования активных форм кислорода в клетках печени при развитии токсического гепатита обусловило корректирующее действие препарата на интенсивность накопления в крови как начальных, так и вторичных (промежуточных) продуктов перексидного окисления липидов: уровень диеновых конъюгатов снижался на 24,9%, кетодиенов — на 32,0% и малонового диальдегида — на 34,7% по сравнению с животными, которым вводили только тетрахлорметан (табл. 2).

Оценивая уровень продуктов ПОЛ, характерный для животных, получавших амарантовое масло до введения гепатотоксина (4-я группа), по отношению к пока-

Таблица 1

Влияние амарантового масла на продукцию супероксида при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном

№	Группа животных	Продукция супероксида, нмоль/г × сек		
		Спонтанная	Стимулированная	
			НАДН	НАДФН
1	Интактные	0,50±0,021	6,3±0,08	7,2±0,09
2	CCl_4	0,83±0,024*	14,4±0,51*	20,0±0,10*
3	АМ	0,47±0,040 Δ	6,8±0,28 Δ	7,1±0,41 Δ
4	АМ + CCl_4	0,65±0,032* $\Delta\nabla$	10,5±0,52* $\Delta\nabla$	18,3±0,72* ∇

Примечание: * — $P_{1-2,3,4} < 0,05$; Δ — $P_{2,3,4} < 0,05$; ∇ — $P_{3-4} < 0,05$.

Таблица 2

Влияние применения амарантового масла на показатели перексидного окисления липидов в крови крыс при CCl_4 -индуцированном гепатите

№	Группа животных	Диеновые конъюгаты, D_{232} /мг липидов	Кетодиены, D_{278} /мг липидов	Малоновый диальдегид, мкМ/л
1	Интактные	0,122±0,010	0,030±0,021	1,39±0,015
2	CCl_4	0,305±0,024*	0,075±0,030*	2,22±0,041*
3	АМ	0,135±0,012*	0,031±0,015*	1,39±0,010*
4	АМ + CCl_4	0,229±0,036* Δ	0,051±0,034* Δ	1,45±0,057* Δ

Примечание: * — $P_{1-2,3,4} < 0,05$; Δ — $P_{2,4} < 0,05$.

зателям у интактных животных (1-я группа), видно, что концентрации начальных продуктов ПОЛ возрастали почти в 2 раза, в то время как содержание МДА увеличивалось незначительно. Такое отсутствие избыточного накопления в крови МДА по сравнению с интактными крысами также может свидетельствовать о выраженном антиоксидантном эффекте амарантового масла в условиях CCl_4 -индуцированного токсического гепатита.

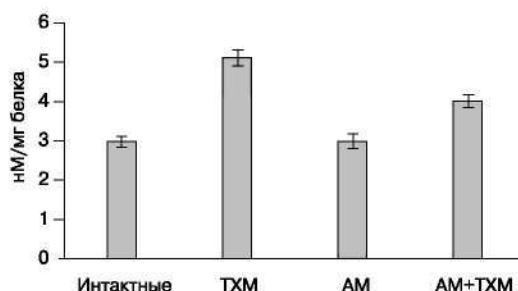


Рис. 3. Влияние амарантового масла на интенсивность окислительной модификации белков при токсическом повреждении печени CCl_4

Как видно из данных, представленных на рис. 3, токсическое повреждение печени тетрахлорметаном на фоне применения амарантового масла уменьшало интенсивность окислительной модификации белков. Применение препарата способствовало статистически достоверному снижению на

25% концентрации карбонильных групп в белках плазмы крови крыс 4-й группы, по сравнению с животными, которым вводили один CCl_4 .

Следует подчеркнуть, что введение животным амарантового масла не оказало существенного влияния на степень индукции активности антиоксидантных ферментов в крови крыс, наблюдаемую на начальных этапах развития токсического повреждения печени, так как статистически достоверных различий между активностью ферментов у животных 2-й и 4-й групп не установлено (табл. 3).

Обсуждение результатов

Феномен оксидативного стресса является одним из базисных механизмов патологии печени различной этиологии [8]. Механизм повреждающего действия CCl_4 на печень реализуется через активацию процессов пероксидации, поскольку тетрахлорметан, поступая в организм, превращается в радикал $\text{CCl}_3^{\cdot}$, инициирующий окисление свободнорадикального типа [24].

Как показали наши исследования, введение животным CCl_4 приводит к усилению генерации в клетках печени супероксиданиона. Увеличение НАДФН-стимулированной продукции супероксида связано с ведущей ролью цитохрома P_{450} мик-

Таблица 3

Влияние амарантового масла на состояние ферментативного звена антиоксидантной системы в крови крыс при токсическом повреждении печени

Фермент	Группы животных			
	1	2	3	4
	Интактные	CCl_4	АМ	АМ+ CCl_4
СОД (усл. ед./мг Нб)	1,49±0,01	1,85±0,02*	1,47±0,01 Δ	1,90±0,01* ∇
Каталаза (мкМ H_2O_2 /лхмин)	34,2±1,53	43,4±1,28*	36,1±1,70 Δ	43,9±2,13* ∇
ГПО (мМ G-SH/лхмин)	39,3±1,20	48,4±1,25*	39,4±2,10 Δ	46,5±2,29* ∇
ГР (мкМ G-SS/лхмин)	151,4±3,13	166,2±4,89	150,4±1,26	163,7±5,34

Примечание: * — $\text{P}_{1-2,3,4} < 0,05$; Δ — $\text{P}_{2-3,4} < 0,05$; ∇ — $\text{P}_{3-4} < 0,05$.

росомальной фракции в механизме биотрансформации тетрахлорметана.

Инициация свободнорадикального окисления, вызванная введением тетрахлорметана и сопровождающаяся усилением генерации супероксиданиона в клетках печени, разрушая клеточные мембраны, приводит к высвобождению негемового железа из отделов эндоплазматического ретикула [9]. Таким образом выполняется необходимое условие для протекания процессов пероксидного окисления — наличие в системе свободных радикалов (повышение концентрации $O_2^{\cdot-}$) и ионов железа. Концентрации этих компонентов определяют скорость зарождения цепи — лимитирующего звена всей цепной реакции, от скорости которого зависит интенсивность протекания процесса в целом.

Как показали проведенные исследования, токсическое повреждение печени тетрахлорметаном сопровождается активацией процесса пероксидного окисления липидов, о чем однозначно свидетельствовало накопление в крови начальных и вторичных продуктов ПОЛ. Эти данные в целом подтверждают результаты исследований большинства авторов, изучавших эти процессы при CCl_4 -интоксикации [17, 22, 24].

Помимо усиления процессов пероксидного окисления липидов, введение животным тетрахлорметана приводило к повышению уровня карбонильных групп в белках, что является маркером их окислительной модификации активными формами кислорода. Это может приводить к нарушению их многообразной функциональной активности (ферментативной, регуляторной и т.д.) и даже деградации [18]. При этом считается, что степень окислительной модификации белков отражает соотношение между про- и антиоксидантными процессами при действии экологических, генетических, пищевых и других экстремальных факторов [20].

Применение животным амарантового масла существенно снижает продукцию

супероксиданиона при токсическом повреждении печени. Наиболее выражен этот эффект в отношении спонтанной и НАДН-стимулированной (митохондриальной) продукции $O_2^{\cdot-}$. Такой эффект воздействия на характер субклеточной генерации супероксиданиона, вероятно, связан с тем, что амарантовое масло существенно не влияет на процессы метаболической детоксикации тетрахлорметана в системе микросомального окисления, а главным образом ограничивает образование и элиминацию активных форм кислорода, что может быть связано с достаточно высоким содержанием в нем α -токоферола ($\approx 2\%$), который обладает выраженными антиоксидантными свойствами, и сквалена ($\approx 8\%$), являющегося предшественником ряда стероидных гормонов и холестерина, у которых также установлено наличие антиоксидантных свойств [15].

Выведение избыточного количества супероксида из биофазы приводило к снижению интенсивности процессов пероксидного окисления, причем ограничивающее влияние амарантового масла в меньшей степени отражалось на изменении уровня первичных продуктов ПОЛ — конъюгированных диенов и в большей — на снижении концентрации малонового диальдегида. По-видимому, профилактическое применение амарантового масла способствует не только снижению образования активных форм кислорода, в частности супероксиданиона, но и ограничению пероксидного окисления липидов на более поздних этапах, предотвращая образование наиболее токсичных и стабильных продуктов пероксидации. Об этом также может свидетельствовать и то, что корректирующее действие амарантового масла на проявления оксидативного стресса не оказало существенного влияния на степень индукции антиоксидантных ферментов участвующих в обезвреживании супероксида (СОД) и гидроперекисей (ГПО и каталаза).

Выводы

Применение амарантового масла в дозе 0,5 мл/кг массы тела способствует более интенсивному течению репаративных процессов в печени при её токсическом поражении. Это обусловлено стабилизацией интенсивности свободнорадикального окисления липидов, что, в свою очередь, обеспечивается поддержанием функционального потенциала ферментативного звена системы антиоксидантной защиты, а также сохранением физиологического баланса образования и утилизации активных форм кислорода.

Литература

1. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992.
2. Близначева Г.Н., Цебржинский О.И., Нацвина А.К., Рецкий М.И. Метод определения субклеточной генерации супероксиданиона у здоровых животных и при токсическом повреждении печени. Вестник ВГУ. Серия химия, биология, 2004, № 2, с. 111-118.
3. Блюгер А.Ф., Майоре А.Я., Залцмане В.К. Роль нарушений функций мембран в патологии печени. В кн.: Биомембраны: Структура, функции, медицинские аспекты. Рига, 1981, с. 185-195.
4. Бузлама В.С., Рецкий М.И., Мещеряков Н.П., Рогачева Т.Е. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма животных. Воронеж, 1997, 35 с.
5. Венгеровский А.И., Марков И.В., Саратиков А.С. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Фисененко В.П., М.: Ремедиум, 2000, с. 228-231.
6. Губский Ю.И. Коррекция химического поражения печени. Киев: Здоров'я, 1989.
7. Десалень Т.Л., Моргунов А.А., Офицеров Е.Н. Изучение химических соединений, полученных из растений рода *Amaranthus*, на кардиотропную активность. II Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». М., 1995, с. 234-235.
8. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Оксидативный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001, 343 с.
9. Коваленко О.А., Тарасова Н.И., Микоян В.Д., Ванин А.Ф. CCl_4 как индуктор L-аргинин зависимого синтеза NO. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1996, № 4, с. 414-416.
10. Кутина С.Н., Зубахин А.А. Резистентность печени к повреждению CCl_4 при стимуляции макрофагов препаратами разных классов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2000, № 6, с. 620-622.
11. Макеев А.М., Коренская И.М., Кунин А.А. Амарантовое масло — уникальное природное лекарственное средство. IV международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», М.: Пушино, 2001, с. 255-265.
12. Макеев А.М., Мирошниченко Л.А., Суровцев И.С. Регенерационные и противоопухолевые свойства амарантового масла. Матер. III междунар. Симпоз. «Новые и нетрадиционные растения и перспектива их использования», М.: Пушино, 1999, с. 100-103.
13. Макеев А.М., Суровцев И.С., Левачев М.М. Способ получения масла из семян амаранта. Патент РФ № 2080360, приоритет от 22.12.1994.
14. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. Вопросы медицинской химии, 1999, Т. 45, № 3, с. 263-272.
15. Чиркова Т.В. Амарант — культура XXI века. Соросовский образовательный журнал, 1999, Т. 5, № 10, с. 22-27.
16. Alric L., Orfila C., Carrere N., Beraud M., Carrera G., Lepert J. C., Duffaut M., Pipy B., Vinel J. P. Reactive oxygen intermediates and eicosanoid production by kupffer cells and infiltrated macrophages in acute and chronic liver injury induced in rats by CCl_4 . *Inflamm. Res.*, 2000, V. 49, No 12, p. 700-707.
17. Campo G.M., Squadrito F., Ceccarelli S. Reduction of carbon tetrachloride-induced rat

- liver injury by IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. *Free Radic. Res.*, 2001, Vol. 34, № 4, p. 379-393.
18. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry J.* 1997, V. 324, No 1, p. 1-18.
 19. Kim K.Y., Choi I., Kim S.S. Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl₄-induced fibrogenesis. *Mol. Cells.*, 2000, Vol. 10, No 3, p. 289-300.
 20. Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino. Acids.*, 2003, Vol. 25, No 3-4, p. 221-226.
 21. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzimol.*, 1994, Vol. 233, p. 357-363.
 22. Sodergen E., Cederberg J., Vessby B., Basu S. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *Eur. J. Nutr.*, 2001, Vol. 40, No 1, p. 10-16.
 23. Yoshikawa M., Ninomiya K., Shimoda H., Nishida N., Matsuda H. Hepatoprotective and antioxidative properties of Salacia reticulata: preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. *Biol. Pharm.Bull.*, 2002, Vol. 25, No 1, p. 72-76.
 24. Zhu W., Fung P.C. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, Vol. 29, No 9, p. 870-880.

THE ROLE OF FREE RADICAL OXIDATION PROCESSES IN MECHANISMS OF AMARANTH OIL HEPATOPROTECTIVE ACTION

G.N. Bliznetsova, M.I. Retsky, N.D. Polyakova-Semenova, I.M. Korenskaya

*Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy RAAS, Voronezh
Voronezh State University, Voronezh*

Application of amaranth oil per os in dose of 0,5 ml per kg of body weight have a distinct hepatoprotective action on toxic hepatitis caused by administration of tetrachloromethane. It has been supposed that mechanism of hepatoprotective activity of preparation is conditioned by decrease of intensity of superoxide anion formation and stabilization of lipid peroxidation processes.

Key words: amaranth oil, hepatoprotector, free radical oxidation, tetrachloromethane, toxic damage of liver.