ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОТРАВЛЕНИЙ

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ОРЕГОНИНА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ АЦЕТАМИНОФЕНОМ У КРЫС

В. М. Шейбак[1]

Диарилгептаноид орегонин при курсовом (5-кратном) внутрижелудочном введении крысам в дозе 20 мг/кг предупреждает развитие ацетаминофен-индуцированных изменений лейкоцитарной формулы крови и гепатототоксическое действие. Одновременное введение животным ацетаминофена и орегонина уменьшает развитие аминокислотного дисбаланса и оптимизирует метаболизм серусодержащих соединений.

Ключевые слова: диарилгептаноиды; орегонин; ацетаминофен; аминокислоты; гепатотоксичность; лейкоцитарная формула.

ВВЕДЕНИЕ

Диарилгептаноиды относятся к классу природных соединений на основе 1,7-дифенилгептана, которые существуют в 2 формах — линейной и циклической [6, 9, 13]. Известно около 300 естественных диарилгептаноидов, выделенных из 46 растений [11]. Как правило, они обладают высокой биологической активностью и являются компонентами коры и листьев различных видов ольхи (*Alnus hirsute Turcz*, *Alnus japonica*, *Alnus formosana*, *Pinus flexilis*), корня имбиря или куркумы (*Curcuma comosa*). Диарилгептаноиды обладают противовоспалительной, антиоксидантной, антимикробной, противоопухолевой, гепатопротекторной и нейропротекторной активностью [7, 10, 12]. Одним из наиболее известных диарилгептаноидов является орегонин (1,7-бис-(3,4-дигидроксифенил)гептан-3-ОН-5-О-β-D-ксилопиранозид), получаемый из коры различных видов ольхи [4].

Характерным признаком токсических поражений печени является развитие аминокислотного дисбаланса, который является одновременно причиной и следствием нарушения многих метаболических процессов в организме. Аминокислотный дисбаланс характеризуется снижением содержания незаменимых аминокислот — метионина, лизина и тирозина, а также уровней глицина и таурина в плазме крови. В свою очередь, низкие концентрации глицина и таурина могут лимитировать синтез глутатиона [3, 4].

Известно, что предварительная обработка *in vitro* гепатоцитов крыс экстрактом коры ольхи (*Alnus japonica*) (50, 100, 150 и 200 мкг/мл инкубационной среды) значительно снижает цитотоксичность ацетаминофена [8]. Однако исследование протекторных свойств орегонина при интоксикации ацетаминофеном *in vivo* не проводилось.

Целью исследования явилось изучение протекторных свойств диарилгептаноида орегонина при токсическом повреждении печени животных ацетаминофеном.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 21 беспородных белых крысах-самках массой 140 – 160 г (виварий УО ГрГМУ), которые находились на стандартном рационе вивария [2].

Животные были разделены на 3 группы ($n = 7$): 1-я – контрольная группа – получала внутрижелудочно 2 % слизь крахмала; 2-я группа получала 5-кратно через 1 день ацетаминофен (“Sigma”) в гепатотоксической дозе 1500 мг/кг в 2 % растворе крахмала внутрижелудочно [4]; 3-я группа получала 5-кратно через 1 день ацетаминофен в дозе 1500 мг/кг внутрижелудочно и орегонин (выделен и очищен из коры ольхи серой — *Alnus incana* – в лаборатории химии лигнина Латвийского государственного института химии древесины, в сухом веществе содержится около 60 % действующего вещества) в дозе 20 мг/кг в виде 2 % раствора ежедневно в течение 10 сут. Животных декапитировали через 24 ч после последнего введения препаратов. Кровь отбирали в пробирки с гепарином (25 ЕД/мл) для отделения плазмы и определения лейкоцитарной формулы. В плазме крови животных количество общего белка, глюкозы и активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) и щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли кинетическим методом, используя наборы фирмы Анализ Х (РБ). Определение свободных аминокислот в плазме крови производили методом обращенно-фазной ВЭЖХ с *о*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и определением по флуоресценции (231/445 нм). Ароматические аминокислоты (тирозин и триптофан) определяли методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм для триптофана). Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, обработку

[1] УО “Гродненский государственный медицинский университет”, Беларусь, 230015, Гродно, ул. Горького 80, УО ГрГМУ.

© 2015 Коллектив авторов

данных — с помощью программы Agilent ChemStation A10.01.

Анализ данных выполнен с использованием пакета программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2002. Вычисляли среднюю арифметическую (M) и стандартную ошибку средней арифметической (m). Достоверность различий значений определяли по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После введения ацетаминофена животным наблюдали изменения лейкоцитарной формулы: снижение общего количества (на 43 %) и перераспределение классов лейкоцитов — уменьшалось абсолютное и относительное количество лимфоцитов и повышалось относительное содержание сегментоядерных нейтрофилов ($p < 0,05$, табл. 1). Данные изменения лейкоцитарной формулы, возможно, являются следствием возникающего после введения ацетаминофена некроза клеток печени, при котором высвобождаются печеночные факторы, которые опосредуют развитие иммунотоксичности [15]. Одним из таких факторов является трансформирующий фактор роста-β1 (TGF-β1), снижающий активность субпопуляции Т-хелперов [13]. При курсовом введении орегонина данные изменения в лейкоцитарной формуле отсутствовали, хотя имело место снижение абсолютного и относительного количества моноцитов ($p < 0,05$, табл. 1), что может отражать активацию и ускорение миграции их в ткань печени [1].

Курсовое введение ацетаминофена уменьшало концентрацию общего белка в плазме крови, увеличивало активность АЛТ в 2,4 раза ($p < 0,05$), АСТ — в 2 раза ($p < 0,05$), ГГТП — в 1,3 раза ($p < 0,05$) и щелочной фосфатазы — в 2 раза ($p < 0,05$). Одновременное введение орегонина препятствовало снижению количества общего белка в плазме, уменьшало цитолиз клеток печени, регистрируемый по уровням активности АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы (табл. 2).

В плазме крови животных, получавших ацетаминофен, увеличивалось общее содержание заменимых (с (1458 ± 72) до $(1758 \pm 76,62)$ мкмоль/л, $p < 0,05$) и снижалось количество незаменимых аминокислот (с (1154 ± 40) до $(941 \pm 41,40)$ мкмоль/л, $p < 0,05$), что привело к преобладанию в циркуляции заменимых аминокислот. Введение орегонина животным, получавшим ацетаминофен, препятствовало уменьшению

Таблица 1. **Лейкоцитарная формула крови крыс, получавших ацетаминофен (1,5 г/кг 5 раз, через 48 ч внутрижелудочно), орегонин (20 мг/кг внутрижелудочно ежедневно десятикратно) ($M + m$)**

Изучаемый показатель	Единицы измерения	Контроль	Ацетаминофен	
			– отрицательный контроль	+ орегонин
Общее количество лейкоцитов	$\cdot 10^9$/л	10,1 ± 1,34	5,8 ± 1,01*	6,9 ± 1,06
Лимфоциты	% ($\cdot 10^9$/л)	76,8 ± 3,42 (7,6 ± 1,44)	64 ± 1,73* (3,6 ± 0,92)*	66,8 ± 4,83 (4,6 ± 1,22)
Моноциты	% ($\cdot 10^9$/л)	2,6 ± 0,87 (0,2 ± 0,05)	2,2 ± 0,73 (0,13 ± 0,05)	0,6 ± 0,24* (0,05 ± 0,02)*
Палочкоядерные нейтрофилы	% ($\cdot 10^9$/л)	1,4 ± 0,68 (0,15 ± 0,07)	1,8 ± 0,2 (0,11 ± 0,03)	1,4 ± 0,5 (0,1 ± 0,06)
Сегментоядерные нейтрофилы	% ($\cdot 10^9$/л)	18 ± 3,03 (1,9 ± 0,58)	28,4 ± 2,38* (1,6 ± 0,32)	29,2 ± 4,9 (2,0 ± 0,57)
Эозинофилы	% ($\cdot 10^9$/л)	1,2 ± 0,8 (0,2 ± 0,11)	3,6 ± 1,29 (0,23 ± 0,098)	2 ± 0,45 (0,1 ± 0,06)

* Достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$).

Таблица 2. **Биохимические показатели плазмы крови крыс, получавших ацетаминофен (1,5 г/кг 5 раз через 48 ч внутрижелудочно), орегонин (20 мг/кг внутрижелудочно ежедневно десятикратно) ($M + m$)**

Изучаемый показатель	Единицы измерения	Контроль	Ацетаминофен	
			– отрицательный контроль	+ орегонин
Общий белок	г/л	56,2 ± 1,91	49,8 ± 0,78*	51,4 ± 1,30
АЛТ	Ед/л	25,8 ± 1,16	60,6 ± 6,72*	42 ± 3,75*#
АСТ	Ед/л	83,8 ± 5,24	159,3 ± 6,97*	134,8 ± 6,70*#
ГГТП	Ед/л	4,9 ± 0,29	6,5 ± 0,31*	6,5 ± 0,19*
Щелочная фосфатаза	Ед/л	204,1 ± 19,0	405,5 ± 57,87*	295,1 ± 35,51*
Глюкоза	Ммоль/л	4,7 ± 0,16	4,7 ± 0,04	4,8 ± 0,14

* Достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$);
\# достоверно относительно группы животных, получавших ацетаминофен ($p < 0,05$).

пула незаменимых аминокислот, однако сохранялось повышенным количество заменимых аминокислот в плазме. Одновременно у животных, получавших орегонин, наблюдали увеличение общего количества аминокислот и их азотсодержащих производных, общее количество аминокислот с разветвленной углеродной

Таблица 3. **Структура пула свободных аминокислот в плазме крови крыс, получавших ацетаминофен (1,5 г/кг 5 раз через 48 ч внутрижелудочно) и орегонин (20 мг/кг внутрижелудочно ежедневно десятикратно) (приведены только статистически значимые различия, $M \pm m$)**

Показатель	Единицы измерения	Контроль	Ацетаминофен	
			– отрицательный контроль	+ орегонин
Общее количество аминокислот и их азотсодержащих производных	мкмоль/л	2802 ± 97	2892 ± 107	3192 ± 82,7*#
Общее количество протеиногенных аминокислот	мкмоль/л	2611 ± 93	2698 ± 102	2975 ± 83,0*
Общее количество заменимых аминокислот	мкмоль/л	1458 ± 72	1758 ± 76,6*	1832,2 ± 57,9*
Общее количество незаменимых аминокислот	мкмоль/л	1154 ± 40	941 ± 41,4*	1143 ± 56,2#
Общее количество азотсодержащих производных аминокислот	мкмоль/л	190 ± 6,1	194 ± 6,5	216,4 ± 3,1*#
Общее количество АРУЦ	мкмоль/л	311 ± 14,4	302 ± 13,9	378,6 ± 17,9*#
Заменимые/незаменимые аминокислоты	мкмоль/л	1,3 ± 0,06	1,9 ± 0,09*	1,6 ± 0,1*
Общее количество АРУЦ	%	27,0 ± 0,8	32,4 ± 1,5*	33,4 ± 1,2*
АРУЦ/Ароматические аминокислоты	–	3,5 ± 0,19	3,0 ± 0,07*	2,9 ± 0,08*

* Достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$);
\# — достоверно относительно группы животных, получавших ацетаминофен ($p < 0,05$).

Таблица 4. **Содержание протеиногенных аминокислот и их азотсодержащих производных в плазме крови крыс, получавших ацетаминофен (1,5 г/кг 5 раз через 48 ч внутрижелудочно) и орегонин (20 мг/кг внутрижелудочно ежедневно десятикратно) (мкмоль/л; приведены только статистически значимые различия, $M \pm m$)**

Аминокислота	Контроль	Ацетаминофен	
		– отрицательный контроль	+ орегонин
Цистеиновая кислота	0,4 ± 0,162	1,5 ± 0,18*	0,78 ± 0,11#
Аспартат	22,5 ± 1,51	27,4 ± 1,19*	31,0 ± 2,01*
Глутамат	85,5 ± 4,01	99,9 ± 3,39*	108 ± 5,47*
Аспарагин	41,0 ± 1,75	43,4 ± 2,86	50,5 ± 1,98*
Серин	170 ± 11	220 ± 14*	225 ± 14*
α-Аминоадипиновая кислота	0,56 ± 0,09	1,1 ± 0,17*	0,82 ± 0,059*
Гистидин	29,6 ± 1,93	33,8 ± 3,67	40,5 ± 3,89*
3-Метилгистидин	2,1 ± 0,14	3,2 ± 0,18*	2,7 ± 0,16*
Глицин	124 ± 6,85	145 ± 12	175 ± 8,80*
Фосфоэтаноламин	1,8 ± 0,26	2,8 ± 0,25*	3,2 ± 0,23*
1-Метилгистидин	0,81 ± 0,09	1,3 ± 0,06*	1,4 ± 0,07*
Аргинин	73,3 ± 4,21	94,3 ± 5,34*	105 ± 4,18*
Аланин	346 ± 24	433 ± 28*	440 ± 21*
Таурин	70,2 ± 3,58	55,0 ± 3,58*	80,6 ± 5,54#
Тирозин	54,8 ± 4,89	64,0 ± 3,36	81,0 ± 5,94*#
α-Аминомасляная кислота	8,8 ± 1,88	16,6 ± 1,87*	10,1 ± 1,89#
Валин	159 ± 6,99	150 ± 6,8	189 ± 9,17*#
Триптофан	57,0 ± 2,37	50,4 ± 2,12	63,3 ± 3,34#
Фенилаланин	36,1 ± 2,04	35,8 ± 2,13	49,4 ± 2,09*#
Изолейцин	70,9 ± 3,65	72,2 ± 3,52	94,2 ± 5,45*#
Лейцин	81,1 ± 4,68	80,1 ± 3,96	94,9 ± 3,91*#
Лизин	414 ± 16	278 ± 24*	302 ± 27*

* Достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$);
\# достоверно относительно группы животных, получавших ацетаминофен ($p < 0,05$).

цепью (лейцин, изолейцин, валин — АРУЦ), как относительно контрольной группы, так и относительно группы, получавшей только ацетаминофен. При этом индекс Фишера (АРУЦ/ароматические аминокислоты) существенно не отличался от показателя, регистрируемого у животных, получавших только ацетаминофен (табл. 3). В клинике низкий индекс Фишера ассоциируется с заболеваниями печени. Дисбаланс свободных аминокислот отражает прогрессирование поражения печени и используется для оценки прогноза у пациентов с циррозом печени [5].

Анализ индивидуальных концентраций свободных аминокислот показал, что введение ацетаминофена увеличивало по сравнению с группой контрольных животных концентрации аспартата (в 1,2 раза), глутамата (в 1,2 раза), серина (в 1,3 раза), аргинина (в 1,3 раза), аланина (в 1,3 раза), α-аминоадипиновой кислоты (в 2 раза), 1-метилгистидина (в 1,6 раза), 3-метилгистидина (в 1,5 раза), фосфоэтаноламина (в 1,6 раза), α-аминомасляной кислоты (в 2 раза), цистеиновой кислоты (в 4 раза) и снижало уровни таурина (на 22 %) и лизина (на 33 %) (табл. 4). Введение орегонина на фоне введения животным ацетаминофена препятствовало изменению концентраций цистеиновой кислоты, α-аминоадипиновой кислоты, 3-метилгистидина и таурина, способствовало увеличению содержания незаменимых аминокислот, уровни которых не изменялись в группе крыс, получавших только ацетаминофен, — тирозина, валина, фенилаланина, изолейцина, лейцина и триптофана. Стабилизация уровня таурина может свидетельствовать об оптимизации процессов синтеза глутатиона, ключевого соединения, уменьшающего цитотоксичность метаболитов ацетаминофена [12, 14]. Совместное поступление в организм ацетаминофена и орегонина существенно увеличивало по сравнению с контрольной группой животных уровни заменимых аминокислот аспартата (в 1,4 раза), глутамата (в 1,3 раза), аспарагина (в 1,2 раза), серина (в 1,3 раза), глицина (в 1,4 раза), гистидина (в 1,4 раза), аргинина (в 1,4 раза), аланина (в 1,3 раза) и азотсодержащих производных аминокислот: α-аминоадипиновой кислоты (в 1,5 раза), 3-метилгистидина (в 1,3 раза), фосфоэтаноламина (в 1,8 раза), 1-метилгистидина (в 1,7 раза) (табл. 4). Оптимизация аминокислотного баланса введением орегонина, вероятно, связана с его выраженным антиоксидантным действием, способствуя снижению выраженности оксидативного стресса и препятствующего некрозу гепатоцитов [5].

ВЫВОДЫ

1. Орегонин (внутрижелудочно 20 мг/кг, 5-кратно) препятствует развитию эффектов ацетаминофена (1500 мг/кг) у крыс — изменениям лейкоцитарной формулы крови и гепатотоксическому действию.

2. Одновременное введение животным ацетаминофена и орегонина уменьшает развитие аминокислотного дисбаланса, оптимизирует метаболизм серусодержащих соединений (цистеиновой кислоты, таурина), но не оказывает существенного влияния на индекс Фишера, характеризующего степень выраженности цирротических изменений в ткани печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Горецкая, В. М. Шейбак, *Иммуногепатология: роль печени в иммунной системе*, Пальмир, Москва (2010).
2. О. Э. Старовойтова, *Мед. право*, № 1, 24 – 31 (2005).
3. В. М. Шейбак, В. Ю. Смирнов, Р. И. Кравчук и др., *Журн. ГрГМУ*, № 3, 51 – 54 (2006).
4. В. М. Шейбак, В. Ю. Смирнов, М. В. Горецкая и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **70**(3), 40 – 42 (2007).
5. В. М. Шейбак, *Лейцин*, *изолейцин*, *валин: биохимические основы разработки новых лекарственных средств*, ГрГМУ, Гродно (2014).
6. N. R. Guz, P. Lorenz, J.-P. Metraux, *Biochem. Syst. Ecol.*, **30**, 471 – 474 (2002).
7. M. J. Kang, J. Y. Eum, M. S. Jeong., *Biol. Pharm. Bul.*, **33**(1), 100 – 106 (2010).
8. S. T. Kim, J. D. Kim, S. H. Ahn, et al., *Phytother Res.*, **18**(12), 971 – 975 (2004).
9. H. J. Kim, K. H. Kim, S. H. Yeom, *Chin. Chem. Let.*, **16**, 1337 – 1340 (2005).
10. M. W. Lee, N. Y. Kim, M. S. Park, *Planta Med.*, **66**(6), 551 – 553 (2000).
11. H. Lv, G. She, *Nat. Prod. Commun.*, **5**(10), 1687 – 1708 (2010).
12. H. Lv, G. She, *Rec. Nat. Prod.*, **6**(4), 321 – 333 (2012).
13. L. Roze, O. Bikovens, G. Telysheva, *Technology. Resources*, **1**, 329 – 332 (2011).
14. E. Waters, J. H. Wang, H. P. Redmond, et al., *Am. J. Physiol.*, **280**, 1274 – 1279 (2001).
15. K. Yamaura, K. Ogawa, T. Yonekawa, et al., *Pharm. Bul.*, **25**(2), 201 – 205 (2002).

Поступила 08.05.15

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF OREGONIN UNDER CONDITIONS OF ACETAMINOPHEN INTOXICATION IN RATS

V. M. Sheibak

Grodno State Medical University, Ministry of Public Health of the Republic of Belarus, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230015 Belarus

Intragastric administration of diarylheptanoid oregonin (20 mg/kg, in the form of 0.2% solution) to rats in 10-day course prevents acetaminophen-induced changes in the leukocyte blood formula and other cytotoxic effects. Simultaneous administration of acetaminophen and oregonin reduces the development of amino acid imbalance and optimizes metabolism of sulfur-containing compounds.

Keywords: diarylheptanoids; oregonin; acetaminophen; amino acids; hepatotoxicity; white blood cell count.