

ВЛИЯНИЕ БЕНЗО[С]ФЕНАНТРИДИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ САНГВИНАРИНА И ХЕЛЕРИТРИНА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ 70% ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

И.В. Зверинский, к.биол.н, Н.Г. Мельниченко, И.П. Сутько, В.А. Поплавский, П.Г. Телегин, А.Г. Шляхтун

ГУ "НПЦ "Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси" лаборатория биохимической токсикологии и наркологии, г. Гродно, Республика Беларусь

РЕЗЮМЕ. Досліджували вплив композиції бензо[с]фенантридинових алкалоїдів, сангвінаріну та хелеритрину на процеси відновлення функціонального стану печінки щурів після 70% часткової гепатектомії. Встановлено, що на 6-у добу у тварин після операції спостерігалось збільшення в крові активності лактатдегідрогенази, лужної фосфатази і показників тимолової проби. У мікросомальній фракції печінки має місце падіння вмісту і активності монооксигеназ. Сумісне введення хелеритрину та сангвінаріну у співвідношенні 1:1,3 і в дозі 5 мг/кг, в/б протягом 4 днів (перша ін'єкція через 24 години після операції) призводило до 50% загибелі тварин та утворення обширних асцитів, різкого зростання концентрації загального білірубину в крові. На нашу думку, токсичний ефект алкалоїдів пов'язаний перш за все з інгібуванням процесів ангиогенезу в печінці. Ключові слова: алкалоїди чистотіла, токсичні ураження печінки, модель — гепатектомія 70%, відновлення функцій печінки.

РЕЗЮМЕ. Исследовали влияние композиции бензо[с]фенантридиновых алкалоидов, сангвинарина и хелеритрина на процессы восстановления функционального состояния печени крыс после 70% частичной гепатэктомии. Установлено, что к 6-м суткам у животных после операции отмечается увеличение в крови активности лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и показателей тимоловой пробы. В микросомальной фракции печени отмечается падение содержания и активности монооксигеназ. Совместное введение хелеритрина и сангвинарина в соотношении 1:1,3 и в дозе 5 мг/кг, в/б в течение 4 дней (первая инъекция через 24 часа после операции) приводило к 50% гибели животных и образованию обширных асцитов, резкому росту концентрации общего билирубина в крови. Предполагается, что токсический эффект алкалоидов связан прежде всего с ингибированием процессов ангиогенеза в печени. Ключевые слова: алкалоиды чистотела, токсические поражения печени, модель-гепатоектомия 70%, восстановление функции печени.

SUMMARY. Investigated the influence of the composition of benzo[c]phenanthridine alkaloids, sanguinarine and chelerythrine, on the recovery of the functional state of rat liver after 70% partial hepatectomy. It was established that to 6 day in the animals after the operation there is an increase in blood lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and indicators of thymol test. In the microsomal fraction of liver marked drop in the content and activity of monoxygenases. Coadministration chelerythrine and sanguinarine in a ratio of 1:1,3 and a dose of 5 mg / kg / w for 4 days (first injection 24 hours after surgery) led to a 50% death of animals and the formation of extensive ascites, and drastically increasing in the concentration of total bilirubin in the blood. It is assumed that the toxic effect of alkaloids is associated primary with the inhibition of angiogenesis in the liver. Key words: celandine alkaloids, liver toxic damage, model-hepatectomy 70%, liver functional recovery.

Фармакологическая активность чистотела большого (*Chelidonium Majus* L.) обусловлена, прежде всего, наличием в нем вторичных метаболитов алкалоидной природы. Алкалоиды чистотела подразделяются на три подгруппы изохинолиновых производных: протобербериновые — берберин, коптизин, стилопин; протопиновые — протопин, аллокриптопин и бензофенантридиновые — хелидонин, гомохелидонин, сангвинарин, хелеритрин [8]. В корневой части растения наибольшее содержание в алкалоидной фракции приходится на хелидонин, а в наземной на коптизин. Сангвинарин и хелеритрин как в траве, так и в корнях чистотела составляют не более 2% от общего содержания алкалоидов, которые, как показывает анализ литературы, обладают широким биологическим действием и в настоящее время рассматриваются в качестве перспективных соединений для разработки новых лекарственных препаратов противоопухолевого действия [5].

В традиционной и народной медицине препараты чистотела часто применяют при заболеваниях печени и желчного пузыря [8]. В то же время описаны случаи острого поражения печени при назначении препаратов из чистотела [3].

Несмотря на большую метаболическую нагрузку, печень относится к митотически неактивным органам. Обширное токсическое повреждение печени или ее резекция приводит к ее массивной регенерации.

Общепринятой экспериментальной моделью для исследования регенерации печени и тестирования веществ на эти процессы служит 70% частичная гепатэктомия у крыс и мышей [13].

Биотрансформация ксенобиотиков представляет собой принципиальный механизм поддержания гомеостаза во время воздействия на организм чужеродных соединений. Метаболизм ксенобиотиков в организме протекает главным образом в печени. Показано, что в пе-

риод регенерации печени наблюдается снижение ее способности метаболизировать чужеродные соединения [16], что может быть причиной снижения устойчивости и адаптации организма к химическим веществам окружающей среды, изменения фармакотерапевтической эффективности лекарств, увеличения выраженности и частоты их побочного действия на органы и ткани организма человека и животных.

Сангвинарин и хелеритрин подвергаются ряду метаболических трансформаций в гепатоцитах для их дальнейшей элиминации из организма, в частности последовательному восстановлению, деалкилированию и конъюгации [18]. Ряд клеточных мембранных насосов могут транспортировать эти алкалоиды в неизменном виде, используя для этого восстановленный глутатион [7]. Метаболиты сангвинарина и хелеритрина не проявляют фармакологической активности [18].

Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния комбинации сангвинарина и хелеритрина на восстановление функционального состояния печени крыс после 70% частичной гепатэктомии.

Материалы и методы исследований

Опыты проведены на 42 крысах-самцах породы Wistar, массой 180 — 220 г. Частичную гепатэктомию (удаление $\approx 70\%$ массы печени) проводили согласно [11] под эфирным наркозом. Опытные животные были разбиты на две группы. Первой группе вводили 0,85 % раствор NaCl, второй — комбинацию сангвинарина и хелеритрина, в дозе 5 мг/кг, внутривентриально. Первую инъекцию проводили через 24 часа после операции, в последующем один раз в день, на протяжении 3 суток. Животные с ложной операцией служили в качестве контроля, которым назначали физиологический раствор. Через 24 часа после последней инъекции крыс декапитировали.

В плазме и сыворотке крови определяли активность АлАТ, АсАТ, ГГТП, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и содержание общего билирубина, липидов, холестерина, креатинина, альбумина, показателей тимоловой пробы с использованием аналитических наборов ООО "Анализ-Х" (Минск, Беларусь).

Микросомальную и цитозольную фракции печени выделяли методом дифференциального центрифугирования. Содержание цитохромов P450 и b5 определяли спектрофотометрическим методом Омура и Сато [9], содержание белка — по методу Лоури [15]. Активность изоформ цитохрома P450 исследовали по скорости окисления ряда алкоксирезорфуринов по методу Бурке и Майера по образованию резорфина [6] и наработке формальдегида из амина-

пирина и этилморфина [14]. Об активности микросомальных флавинодержущих монооксигеназ судили по скорости окисления НАДФН в присутствии их субстратов имипрамина (0,1 mM), тиамин (1 mM), триметиламина (0,1 mM) и N,N-диметиланилина (0,1 mM). Предварительно через инкубационную смесь в течение 1 минуты пропускали СО (для ингибирования цитохрома P450) [2]. Активность цитозольной и микросомальной глутатион-S-трансфераз определяли по связыванию глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) и сульфобромфталеином (СБФ) [10].

Выделение гидрохлоридов сангвинарина и хелеритрина проводили из препарата "Сангвиритрин®" (Российская Федерация, 0,2% водно-спиртовой раствор сангвинарина и хелеритрина). Для количественного содержания выделенных алкалоидов использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию. Анализ проводили на хроматографической системе высокого давления Agilent 1200 (Германия) с диодно-матричным детектором. Разделение компонентов смеси проводили на колонке Kromasil (100-5-C18, 4,6 x 150 мм, 5 мкм), подвижной фазой, состоящей 25 mM натрий-фосфатного буфера, pH 2,5 и ацетонитрила в объемном соотношении 70/30. Скорость подачи элюента 1,5 мл/мин, температура колонки 35°C. Длина волны детекции -285 нм. Продолжительность анализа -15 минут. Прием и обработка хроматограмм осуществлялись с помощью модуля обработки данных Agilent Chem Station B 03 01. Расчет содержания алкалоидов проводили по методу внешнего стандарта. В качестве стандартов использовали sanguinarine chloride и chelerythrine chloride (Sigma-Aldrich, США).

Хроматографический анализ показал, что соотношение хелеритрин:сангвинарин в выделенной фракции алкалоидов составило 1:1,3.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 4.00. Достоверность оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что на 6-е сутки в I группе, после частичной гепатэктомии у животных отмечается увеличение активности в сыворотке крови лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы на 39 и 65% соответственно. Показатели тимоловой пробы были увеличены в сравнении с ложнооперированными животными более чем в два раза. Также отмечено умеренное снижение содержания общих липидов в сыворотке крови (рисунк). В микросомальной фракции печени

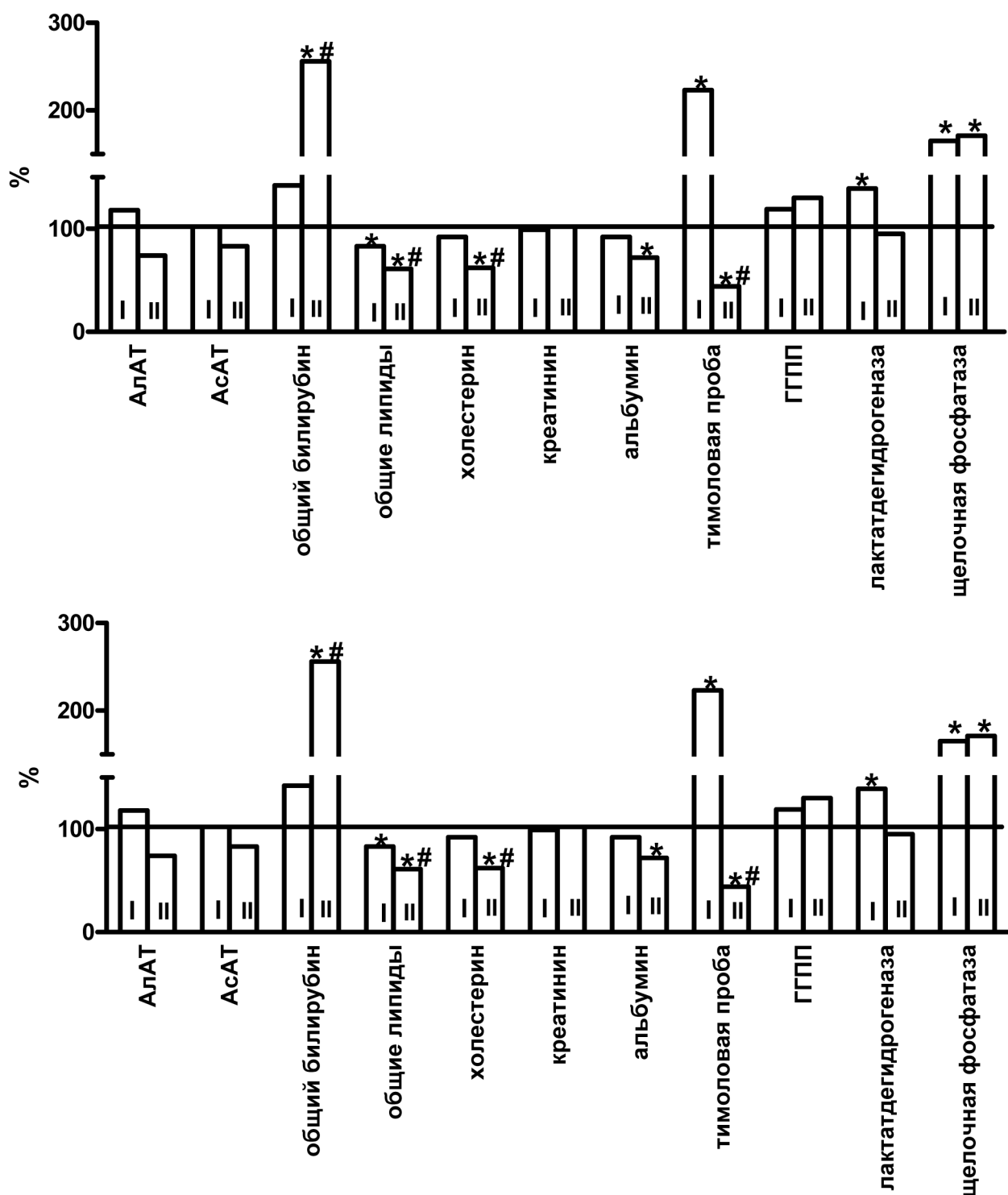


Рис. Некоторые биохимические показатели крови животных в процентах к группе контроля на 6-ые сутки после 70% частичной гепатэктомии без (I) и на фоне введения композиции двух алкалоидов сангвинарина и хелеритрина (II) в дозе 5 мг/кг, внутрибрюшинно.
Примечание. * – $p < 0,05$ к контролю, # – $p < 0,05$ к I группе.

было зарегистрировано снижение как содержания, так и активности микросомальных монооксигеназ. Так, содержание цитохромов P450 и b5 снижаются на 60 и 30% соответственно. Отмечается снижение каталитической активности метоксирезорифин-О-деэтилазы (цитохром P450 1A2-зависимая реакция) и этилморфин-N-деметилазы (цитохром P450

3A-зависимая реакция) на 69 и 38% (таблица). Активность микросомальных флавиноидсодержащих монооксигеназ была снижена на 33-22%. Активность цитозольных глутатион-S-трансфераз также были снижены в сравнении с группой контроля (таблица).

Таким образом, к 6-м суткам после 70% частичной гепатэктомии в печени крыс наблюда-

ются признаки холестаза и гепатита, а также умеренное снижение способности печени метаболизировать чужеродные соединения, что, по-видимому, связано с внутривнутрипеченочной холангиостомией и участием иммунной системы в регенерации печени. Подобные биохимические изменения в период компенсаторного роста печени после частичной гепатэктомии были получены и другими исследователями [1,16].

Назначение суммы алкалоидов сангвинарина и хелеритрина в дозе 5 мг/кг, приводит к 50% гибели животных. У выживших крыс наблюдались обширные асциты. Анализ крови показал резкое увеличение содержания общего билирубина в 2,6 и 1,8 раза в сравнении с контрольной и I группой соответственно (таблица). Назначение комбинации бензофенантридиновых алкалоидов сангвинарина и хелеритрина в период регенерации печени приводит к статистически достоверному снижению показателей тимоловой пробы, содержания

общих липидов и холестерина в сыворотке крови, а также скорости O-деалкилирования этоксирезорифина (цитохром P450 1A1-зависимая реакция), а также к флавинозависимому окислению НАДФН (субстрат тиамин) в микросомальной фракции печени крыс как по отношению к контрольной, так и первой группам. Остальные исследуемые биохимические показатели были на уровне первой группы.

Регенерация печени характеризуется высокой гемодинамической нагрузкой, которая снижается по мере восстановления массы органа и сосудистой структуры печени [13]. Пик синтеза эндотелиальных клеток печени наблюдается через 36 и 98 часов после частичной гепатэктомии. Ведущими хемотаксическими и митогенными стимулами для этих клеток служат ангиопоэтины [4]. Считается, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) — это наиболее мощный ангиогенный фактор, увеличение продукции которого пролиферирующими ге-

Таблица

Содержание и активность цитохром P450-зависимых, флавиносодержащих монооксигеназ и глутатион-S-трансфераз печени крыс на 6-е сутки после 70% частичной гепатэктомии без (I группа) и на фоне введения суммы алкалоидов сангвинарина и хелеритрина (II группа) в дозе 5 мг/кг, в/б, в течение 4 дней (M±m).

Показатели	Контроль	I группа	II группа
Цитохром P450, нмоль/мг	0,62 ± 0,11	0,25 ± 0,05*	0,31 ± 0,07*
Цитохром b5, нмоль/мг белка	0,36 ± 0,02	0,26 ± 0,03*	0,24 ± 0,03*
7-этоксирезорифин-O-деэтилаза, рмоль резорифина/мин/мг	39,79 ± 4,80	28,91 ± 6,27	10,43 ± 2,83*#
7-Метоксирезорифин -O-деэтилаза, рмоль резорифина/мин/мг	40,52 ± 5,99	12,36 ± 2,62*	20,19 ± 4,67*
7-пентоксирезорифин-O-деэтилаза, рмоль резорифина/мин/мг	7,26 ± 0,73	7,59 ± 1,53	4,73 ± 0,71*
Этилморфин N-деметилаза, нмоль/мин/мг	3,41 ± 0,53	2,13 ± 0,20*	1,64 ± 0,29*
Амидопирин N-деметилаза, нмоль/мин/мг	1,49 ± 0,15	1,51 ± 0,08	0,98 ± 0,24
Окисление НАДФН (субстрат имипрамин), нмоль/мин/мг	1,65 ± 0,16	1,11 ± 0,07*	1,14 ± 0,13*
Окисление НАДФН (субстрат ТМА), нмоль/мин/мг	1,74 ± 0,14	1,29 ± 0,07*	1,16 ± 0,14*
Окисление НАДФН (субстрат ДМА), нмоль/мин/мг	1,53 ± 0,11	1,19 ± 0,09*	0,98 ± 0,06*
Окисление НАДФН (субстрат тиамин), нмоль/мин/мг	1,41 ± 0,13	1,10 ± 0,06*	0,87 ± 0,08*#
Цитозольная глутатион S-трансфераза, мкмоль ХДНБ/мг	0,43 ± 0,03	0,31 ± 0,04*	0,29 ± 0,03*
Цитозольная глутатион S-трансфераза, нмоль СБФ/мин/мг	4,67 ± 0,18	3,52 ± 0,39*	3,80 ± 0,75
Микросомальная глутатион S-трансфераза, нмоль ХДНБ/мин/мг	40,19 ± 4,64	34,40 ± 3,77	46,42 ± 4,89

Примечание. * — p<0,05 к контролю, # — p<0,05 к I группе.

ТМА — N-триметиламин, ДМА — диметиланилин, ХДНБ — 1-хлор-2,4-динитробензол; СБФ — сульфобромфталейн.

патоцитами после частичной гепатэктомии коррелирует с повышенной экспрессией его рецепторов на поверхности эндотелиальных клеток [20, 19].

Как показывает анализ литературы, сангвинарин способен тормозить как ангиогенез на уровне синтеза VEGF, так и непосредственную рецепторную активацию эндотелиальных клеток VEGF [17]. Супрессивными свойствами в отношении ангиогенеза обладает и хелеритрин [12].

Проведенные исследования показали, что введение композиции алкалоидов сангвинарина и хелеритрина в период регенерации печени сопровождается портальной гипертензией (об-

ширные асциты) и признаками обтурационной желтухи (высокий уровень билирубина, снижение тимоловой пробы), что, вероятно, связано с процессами торможения образования новых эндотелиальных клеток желчных протоков и синусоидов, вследствие резкого снижения общей ксенобиотикометаболической емкости печени в результате массивной хирургической резекции и последующим компенсаторным ростом, который сопровождается ингибированием основных ферментных систем детоксикации и элиминации ксенобиотиков, что приводит к значительному увеличению экспозиции алкалоидов к эндотелиальным клеткам и ингибированию их роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Изучение активности ферментов в процессе регенерации печени крыс после частичной гепатэктомии нормальной и пораженной дезоксихолевой кислотой печени / Л.Л. Громашевская, М.Г. Касаткина, О.С. Шкурова [и др.] // Укр. биохим. журн. — 1978. — Т.50, №3 — С. 345—251.
2. Мельниченко Н.Г. Активность цитохром Р450-зависимых и флавинодержащих монооксигеназ печени крыс после введения тиамин и его производных / Н.Г. Мельниченко // Весті НАН Беларусі сер. мед. нав. — 2007. — №4. — С. 86—89.
3. Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus*) / E. Hardeman, L. Van Overbeke, S. Ilegems [et al.] // Acta. Gastroenterol. Belg. — 2008. — Vol.71, №2. — P. 281—282.
4. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells / H. Langer, A.E. May, K. Daub [et al.] // Circ. Res. — 2006. — Vol. 98. — P. 2—10.
5. Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status / J. Hammerova, S. Uldrijan, E. Taborska [et al.] // J. Dermatol. Sci. — 2001. — Vol.62, №1, — P. 22—35.
6. Burke M.D. 3-methylcholanthrene-induced monooxygenase (O-deethylation) activity of human lymphocytes / M.D. Burke, R.T. Mayer, R.E. Kouri // Cancer Res. — 1977. — Vol.37, №2. — P. 460—463.
7. Chelerythrine stimulates GSH transports by rat Mrp2 (Abcc2) expressed in canine kidney cells / H. Lou, M. Ookhhens, A. Stolz [et al.] // Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. — 2003. — Vol. 285. — P. G13335—G1344.
8. Colombo M.L. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L (Papaveraceae) / M.L. Colombo, E. Bosisio // Pharmacol. Res. — Vol.33, №2. — P. 127—134.
9. Function of cytochrome P-450 of microsomes / T. Omura, R. Sato, D.Y. Cooper [et al.] // Fed. Proc. — 1965. — Vol. 24. — P. 1181—1187.
10. Habig W.H. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // J. Biol. Chem. — 1974. -Vol.249, № 22. — P. 7130—7139.
11. Higgins G.M. Experimental pathology of the liver / G.M. Higgins, R.M. Anderson // Arch. Pathol. — 1931. — Vol. 12, №2. — P. 186—202.
12. Lane T. Chelerythrine inhibits the secretory response of human blood platelets without specifically inhibiting protein kinase C / T. Lane, P. Novales-Li // Tokai. J. Exp. Clin. Med. — 1996. — Vol.21, №2. — P. 61—67
13. Martins P.N.A. Rodent models of partial hepatectomies / P.N.A. Martins, T.P. Theruvath, P. Neuhans // Liver. International. — 2007. — Vol.28, №1. — P. 3—11.
14. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction / T. Nash // Biochem. J. — 1953. — Vol.55, №3. — P. 416—421.
15. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol.193. — P. 265—275.
16. The microsomal monooxygenase system of regenerating liver / M.J.J. Ronis, C.K. Lumpkin, P.E. Thomas [et al.] // Biochem. Pharmacol. -1992. — Vol.43. — P. 567—573.
17. The plant alkaloid sanguinarine is a potential inhibitor of follicular angiogenesis / G. Basini, S.E. Santini, S. Bussolati [et al.] // Reprod. and develop. — 2007. — Vol.53, №3. — P. 573—579
18. Ulrichova J. Toxicology of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids / J. Ulrichova // Biomed. Papers. — 2005. — Vol.149, Suppl.1. — P. 9—10.
19. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats / H. Shimizu, N. Mitsuhahashi, M. Ohtsura [et al.] // World. J. Gasrtroenterol. — 2005. — Vol.11, №46. — P. 7254—7260.
20. Zachary I. VEGF signaling: integration and multitasking in endothelial cell biology / I. Zachary // Biochem. Soc. Trans. — 2003. — Vol.31. — P. 1171—1177.

Надійшла до редакції 20.05.2011 р.