

**ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ КОНЦЕНТРАТІВ
З ВИНОГРАДУ ТА ЛІПОТРОПНИХ РЕЧОВИН НА МОДЕЛІ ХРОНІЧНОГО
ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТИТУ**

У даній експериментальній роботі було проведено порівняльне дослідження ліпотропної активності поліфенольних екстрактів з насіння винограду культурного сорту "Каберне" в комплексі з відомими ліпотропними речовинами метіоніном і холіном на стан метаболізму ліпідів, показники пероксидного окиснення ліпідів у печінці та сироватці крові щурів за умов хронічного токсичного ураження печінки, викликаного введенням тетрахлорметану. В печінці та сироватці крові визначали вміст загальних ліпідів, тріацилгліцеролів, вільних жирних кислот, холестеролу та загальний вміст фосфоліпідів. Отримані експериментальні дані свідчать про те, що серед субстанцій і препаратів, дію яких вивчали, більш виражений ліпотропний ефект продемонструвала комбінація, яка складалася з метіоніну та поліфенольного концентрату "Каберне", порівняно з дією його окремих компонентів. Цей ефект проявився зменшенням вираження процесів ліполізу, жирового гепатозу, значним зменшенням проявів гіперліпідемії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліфеноли, метіонін, холін, тетрахлорметан, фосфоліпіди, тріацилгліцероли.

ВСТУП. Хронічний гепатит – поліетіологічний запальний процес без порушення часточкової і судинної архітекτονіки печінки, що триває понад 6 місяців і проявляється астенодиспептичним синдромом, гепатомегалією та порушенням функції печінки [11]. Медикаментозна терапія спрямована на поліпшення процесів обміну, нормалізацію регенерації і підвищення резистентності гепатоцитів (базисна терапія) [2].

При лікуванні хронічних гепатитів рекомендується дотримання дієти, режиму, призначають гепатопротектори, зокрема широко використовують метіонін та холін. Слід зазначити, що ці сполуки відіграють важливу роль у функціонуванні печінки. Так, утримування щурів на раціоні, дефіцитному за метіоніном та холіном, призводить до розвитку неалкогольного стеатогепатиту [5]. Пероральне введення S-аденозил-L-метіоніну пацієнтам із хронічним алкогольним ураженням печінки зменшує рівень білірубину, активність амінотрансфераз у крові хворих [8].

При хронічних гепатитах, які не потребують гормональної терапії, можливе самостійне ефективне лікування настоями лікарських трав [2]. Завдання фітотерапії захворювань печінки досить широкі – необхідно зменшити

інтоксикацію, запалення, збільшити жовчовиділення, зняти спазми, стимулювати відведення жовчі, зменшити біль, скоротити число некротизованих гепатоцитів і відновити ті з них, які ще зберігають життєздатність.

Рослинні поліфеноли демонструють широкий спектр фармакологічних ефектів, вони, зокрема, проявляють антиоксидантну, мембраностабілізуючу, імуномодулюючу, проти-запальну активність [12]. Багатим джерелом рослинних поліфенолів є насіння винограду культурного. Встановлено, що введення екстракту поліфенолів винограду значно знижує рівень вільних жирних кислот у плазмі крові, зменшує активність печінкових ферментів та нормалізує обмін ліпідів у печінці мишей зі стеатогепатитом неалкогольного походження [3, 4].

Метою даної роботи було провести порівняльне дослідження ліпотропної активності поліфенольних екстрактів з насіння винограду культурного сорту "Каберне" в комплексі з відомими ліпотропними речовинами метіоніном і холіном на стан метаболізму ліпідів, показники пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у печінці та сироватці крові щурів за умов хронічного токсичного ураження печінки, спричиненого введенням тетрахлорметану.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проводили на самцях щурів масою 180–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Хронічне ураження печінки в щурів моделювали шляхом підшкірного введення 50 % олійного розчину тетрахлорметану в дозі 4 мл/кг 2 рази на тиждень протягом 60 днів [11].

Тварин було поділено на шість дослідних груп: 1-ша – інтактний контроль; 2-га – контрольна патологія; 3-тя – одночасно з тетрахлорметаном вводили поліфенольний екстракт “Каберне” в дозі 9 мг/100 г маси тіла (в перерахунку на поліфеноли); 4-та – на тлі тетрахлорметанового ураження печінки вводили метіонін у дозі 2 г/кг; 5-та – одночасно з тетрахлорметаном вводили поліфенольний екстракт “Каберне” в дозі 9 мг/100 г маси тіла (в перерахунку на поліфеноли) та метіонін у дозі 2 г/кг; 6-та – одночасно з тетрахлорметаном вводили поліфенольний екстракт “Каберне” в дозі 9 мг/100 г маси тіла (в перерахунку на поліфеноли) та холіну хлорид у дозі 2 г/кг. Досліджувані поліфенольні комплекси, метіонін та холін вводили за годину до введення тетрахлорметану.

Після закінчення експерименту тварин декапітували, збирали кров для отримання сироватки.

Печінку перфузували охолодженим фізіологічним розчином. Гомогенат готували у співвідношенні 1 частина печінки : 3 частини 0,1 М Трис-НСІ буфера (рН 7,5). В печінці та сироватці крові визначали вміст загальних ліпідів (ЗЛ), триацилгліцеролів (ТГ), вільних жирних кислот (ВЖК), холестеролу (ХС) і загальний вміст фосфоліпідів (ЗФЛ) за допомогою стандартних наборів реактивів фірми “Seltiel” (Італія). В сироватці крові активність ферментів-маркерів цитолізу гепатоцитів аланінамінотрансферази (АлАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та γ -глутамілтранспептидази (ГГТП) визначали, використовуючи стандартні набори реактивів фірми “Felicite-Діагностика”. Вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) у гомогенаті печінки визначали колориметричним методом, який ґрунтується на здатності цієї суми сполук утворювати в кислому середовищі забарвлені триметинові комплекси з тіобарбітуровою кислотою, що мають максимум поглинання при довжині хвилі 532 нм [9]. Вміст відновленого глутатіону (ВГ) визначали за здатністю низькомолекулярних тіолових сполук утворювати під час взаємодії з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензоатом забарвлену сполуку – тіо-2-нітробензойну кислоту, водний розчин якої має характерний максимум поглинання при довжині хвилі 412 нм

[7]. Активність каталази визначали за зменшенням вмісту гідрогену пероксиду в інкубаційному середовищі. Метод визначення активності каталази базується на здатності гідрогену пероксиду утворювати із солями амоніаку стійкі забарвлені екстракти, які мають максимум поглинання при довжині хвилі 410 нм [6].

Статистичну обробку даних проводили за використанням варіаційної статистики (ANOVA). $P < 0,05$ – статистично достовірні результати.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За умов гострого ураження печінки спостерігали порушення обміну ліпідів у печінці, що відобразилось на показниках у сироватці крові. Так, у тканині печінки зростав вміст загальних ліпідів (на 86 %) за рахунок підвищення вмісту ТГ, ХС та деякого збільшення рівня ВЖК у клітинах печінки (на 148, 151 і 81 % відповідно) (табл. 1). При цьому відзначали достовірне зменшення вмісту ЗФЛ у тканині печінки (на 46 %). Зниження вмісту фосфоліпідів може свідчити про пошкодження мембран, яке може призводити до порушення цілості клітин та розвитку некротичних процесів. Зазначені припущення підтверджуються значним підвищенням у сироватці активності печінкових ферментів: АлАТ, ЛФ та ГГТП (табл. 2). Окрім того, в тканині печінки зменшувався вміст ВГ та зростав рівень ТБК-АП, що свідчило про посилення процесів ПОЛ за даних експериментальних умов.

Введення експериментальним тваринам метіоніну значно покращувало функціональний стан печінки. Так, у печінці щурів збільшувався вміст ЗФЛ та, відповідно, зменшувалася кількість ТГ, ВЖК та ХС (табл. 1). При введенні метіоніну тваринам спостерігали зниження активності печінкових ферментів у крові та значне підвищення рівня ВГ у печінці (табл. 1, 2).

Відомо, що метіонін проявляє гепатопротекторну та ліпотропну активність у декількох напрямках: є донором метильних груп, необхідних у синтезі головного фосфоліпиду плазматичних мембран – фосфатидилхоліну [7], і важливим джерелом синтезу глутатіону.

Таким чином, під дією метіоніну спостерігали підвищення ЗФЛ, зменшення процесів ПОЛ та ВРО у клітинах, що призводило до покращення стану мембран гепатоцитів, про що свідчило зниження активності печінкових ферментів у сироватці крові тварин (табл. 2).

Введення поліфенольного комплексу “Каберне” тваринам за умов розвитку хронічного тетрахлорметанового гепатиту призводило до істотних позитивних змін у печінці та сироватці крові. Було показано, що поліфенольний

екстракт з насіння винограду сорту “Каберне” знижував вміст ТБК-АП, підвищував вміст ВГ у печінці (табл. 2). Слід також відзначити суттєвий вплив поліфенольного концентрату з насіння винограду сорту “Каберне” на показники обміну ліпідів у печінці (табл. 1). Так, вміст ЗФЛ зростав у 1,4 раза, вміст ВЖК зменшувався в 1,2 раза порівняно з контрольною патологією (табл. 1).

Аналіз експериментальних даних, наведених у таблицях 1 та 2, показав, що введення комплексу, який складався з метіоніну та поліфенольного концентрату “Каберне”, чинило найбільш виражений вплив на вміст різних класів ліпідів у сироватці крові та тканині печінки порівняно з окремим введенням компонентів (табл. 1). Введення комбінації поліфенолів одночасно з метіоніном значно підвищувало вміст ФЛ, знижувало вміст ТГ та ВЖК, пригнічувало процеси ПОЛ, про що свідчили зменшення вмісту ТБК-реактивів у печінці, збільшення рівня ВГ. На ефективність ліпотропної дії цього комплексу вказувало значне зниження у сироватці крові активності маркерних печінкових ферментів АлАТ, ЛФ, ГГТП порівняно з метіоніном та поліфенольним екстрактом “Каберне” (табл. 2). Значний ефект комбінованого введення може бути пов’язаний з тим, що окремі компоненти цього комп-

лексу потенціюють дію один одного. Так, метіонін посилює утворення головного фосфоліпиду плазматичних мембран – лецитину, а поліфенольні компоненти захищають молекули лецитину, зокрема його поліненасичені фрагменти, від пошкодження внаслідок ПОЛ [10]. Це прискорює відновлення структури біомембран.

Одночасне введення комплексу поліфенолів “Каберне” та холіну, який мав виражені ліпотропні властивості, також покращувало показники ліпідного обміну як у печінці, так і в сироватці крові (табл. 1), що також підтверджувалося позитивними змінами активності маркерних ферментів печінки та зниженням інтенсивності процесів ПОЛ у клітинах печінки (табл. 2). Проте ці зміни були менш вираженими, ніж при введенні у комплексі з поліфенолами метіоніну (табл. 2). Більш ефективна дія метіоніну може бути пов’язана з тим, що метіонін не тільки необхідний для синтезу холіну, з дефіцитом якого пов’язані порушення синтезу фосфоліпідів з жирів і відкладення в печінці нейтрального жиру [2, 7], але й активує дію гормонів, вітамінів (В₁₂, аскорбінової, фолієвої кислот), ферментів, білків, бере участь в обміні сульфуровмісних амінокислот, інших біологічно важливих сполук, реакціях переметилування, дезамінування, декарбоксилу-

Таблиця 1 – Вивчення впливу поліфенольних екстрактів з насіння винограду на метаболізм ліпідів у печінці й сироватці крові на моделі хронічного тетрахлорметанового гепатиту (n=6)

Показник	Група					
	інтактний контроль	контрольна патологія	“Каберне” 0,5 мг/кг	метіонін 25 мг/кг	“Каберне”+ метіонін	“Каберне”+ холін
У тканині печінки						
ЗЛ, мг/г тканини	158,25±6,35	294,71±12,14*	201,14±9,59**	193,03±7,16*,**	179,67±8,41*/**	201,45±9,73*,**
ХС, ммоль/г	15,56±1,97	39,51±3,84*	31,56±3,31*/**	28,79±3,42*/**	20,01±3,35**	25,74±3,88*/**
ТГ, мг/г	5,69±0,21	14,12±1,32*	10,83±0,45*/**	9,46±0,49*/**	7,75±0,56**	8,53±0,64*/**
ВЖК, ммоль/г	3,97±0,21	7,21±0,53*	6,06±0,45**	5,95±0,31*/**	4,95±0,57**	5,31±0,31*/**
ЗФЛ, ммоль/г	39,53±1,99	18,23±1,67*	24,97±2,21*/**	28,35±2,93*/**	34,53±3,57*/**	31,53±3,26*/**
У сироватці крові						
ЗЛ, мг/мл	1,98±0,11	3,11±0,19*	2,68±0,17**	2,43±0,09*/**	2,12±0,11*/**	2,45±0,19*/**
ХС, ммоль/л	6,13±0,28	13,47±0,91*	11,89±0,56*/**	9,45±0,37*	7,97±0,26*	9,01±0,35*
ТГ, мг/мл	0,55±0,09	2,03±0,15*	1,71±0,09**	1,43±0,11*	0,95±0,16*/**	1,31±0,08*
ВЖК, ммоль/л	1,51±0,09	4,37±0,21*	3,48±0,19*/**	2,83±0,21	2,34±0,19**	2,75±0,22
ЗФЛ, ммоль/л	13,51±0,43	7,31±0,32*	9,49±0,63*/**	10,54±0,35*/**	11,97±0,54**	9,72±0,38*/**

Примітки. У цій і наступній таблицях:

- 1) * – відхилення достовірне відносно інтактного контролю;
- 2) ** – відхилення достовірне відносно контрольної патології.

Таблиця 2 – Вивчення гепатозахисної дії поліфенольних екстрактів з насіння винограду на моделі хронічного тетрахлорметанового гепатиту (n=6)

Показник	Група					
	інтактний контроль	контрольна патологія	“Каберне” 0,5 мл/кг	метіонін 25 мг/кг	“Каберне”+ метіонін	“Каберне”+ холін
У тканині печінки						
ТБК-АП, мкмоль/г	57,77±3,11	115,31±5,67*	81,35±5,39**	98,43±7,11**	71,45±4,98**	88,57±6,33**
ВГ, ум. од.	39,16±3,65	17,84±1,89**	25,84±2,98**	33,01±2,04**	35,07±2,22**	26,51±2,38**
Каталаза, мкат/л	2,87±0,16	3,48±0,17	2,42±0,15**	3,23±0,19**	2,60±0,15	3,19±0,21**
У сироватці крові						
АлАТ, ммоль/г-л	0,76±0,07	1,96±0,09*	1,26±0,09**	1,25±0,11**	0,97±0,09**	1,47±0,16**
ГГТП, ммоль/г-л	2,99±0,19	7,05±0,63*	4,63±0,22**	4,38±0,29**	3,55±0,23**	5,93±0,36**
ЛФ, мкат/л	3,31±0,24	5,52±0,33*	4,58±0,24**	4,21±0,23	3,72±0,22**	4,91±0,27

вання амінокислот, що також відіграє важливу роль у відновленні метаболічних процесів у печінці після введення токсичного агента.

ВИСНОВКИ. Серед субстанцій та препаратів, дію яких вивчали, більш виражений ліпотропний ефект продемонструвала ком-

бінація, яка складалася з метіоніну та поліфенольного концентрату “Каберне”, порівняно з дією його окремих компонентів. Цей ефект проявився зменшенням вираження процесів ліполізу, жирового гепатозу, значним зменшенням проявів гіперліпідемії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов пищеварения / под общ. ред. В. Т. Ивашкина. – М. : Литтерра, 2003. – 251 с.
3. Grape seed extract improves liver function in patients with nonalcoholic fatty liver change / M. Khoshbaten, A. Aliasgarzadeh, K. Masnadi [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2010. – **16**, № 3. – P. 194–197.
4. Improvement of high-fat diet-induced obesity by a mixture of red grape extract, soy isoflavone and L-carnitine: implications in cardiovascular and non-alcoholic fatty liver diseases / J. S. Kang, W. K. Lee, C. W. Lee [et al.] // *Food Chem Toxicol.* – 2011. – **49**, № 9. – P. 2453–2458.
5. Karahan N. Effects of probiotics on methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in rats / N. Karahan // *Turk. J. Gastroenterol.* – 2012. – **23**, № 2. – P. 110–121.
6. Levels of hemoglobin and lipid peroxidation metabolites in blood, catalase activity in erythrocytes and peak expiratory flow rate in subjects with passive exposure to tobacco smoke / M. Zawadzki, P. Gac, R. Poreba [et al.] // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2008. – **118**, № 12. – P. 705–712.
7. N-Acetylcysteine inhibits platelet-monocyte conjugation in patients with type 2 diabetes with depleted intraplatelet glutathione: a randomized controlled trial / A. T. Treweeke, T. J. Winterburn, I. Mackenzie [et al.] // *Diabetologia.* – 2012. – **55**, № 11. – P. 2920–2928.
8. S-adenosyl-L-methionine treatment for alcoholic liver disease: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial / V. Medici, M. C. Virata, J. M. Pearson [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2011. – **35**, № 11. – P. 1960–1965.
9. Serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances are associated with risk of coronary heart disease / S. Tanaka, T. Miki, S. Sha [et al.] // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2011. – **18**, № 7. – P. 584–591.
10. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione / F. Caballero, A. Fernandez, N. Matias [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – **285**, № 24. – P. 18528–18536.
11. Treatment for restless legs syndrome secondary to chronic liver disease: a case report / T. Oguri, H. Sugiyama, T. Hamano, N. Tachibana // *Intern. Med.* – 2012. – **51**, № 8. – P. 933–934.
12. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols / R. Tsao // *Nutrients.* – 2010. – **2**, № 12. – P. 1231–1246.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ИЗ ВИНОГРАДА И ЛИПОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТИТА

Резюме

В данной экспериментальной работе было проведено сравнительное исследование липотропной активности полифенольных экстрактов из семян винограда культурного сорта "Каберне" в комплексе с известными липотропными веществами метионином и холином на состояние метаболизма липидов, показатели пероксидного окисления липидов в печени и сыворотке крови крыс в условиях хронического токсического поражения печени, вызванного введением тетрахлорметана. В печени и сыворотке крови определяли содержание общих липидов, триацилглицеролов, свободных жирных кислот, холестерина и общее содержание фосфолипидов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что среди субстанций и препаратов, действие которых изучали, более выраженный липотропный эффект продемонстрировала комбинация, состоящая из метионина и полифенольного концентрата "Каберне", по сравнению с действием его отдельных компонентов. Этот эффект проявился уменьшением выраженности процессов липолиза, жирового гепатоза, значительным уменьшением проявлений гиперлипидемии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифенолы, метионин, холин, тетрахлорметан, фосфолипиды, триацилглицеролы.

A. L. Zahayko, S. V. Zaika, I. V. Senyuk
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

A COMPARATIVE STUDY OF LIPOTROPIC ACTIVITY OF GRAPE POLYPHENOLIC EXTRACTS AND LIPOTROPIC AGENTS UNDER CARBON TETRACHLORIDE CHRONIC TOXIC LIVER INJURY

Summary

A comparative study of lipotropic activity of "Cabernet" grape seeds polyphenolic extracts and lipotropic agents methionine and choline on the state of lipid metabolism, lipid peroxidation in liver and serum of rats under carbon tetrachloride chronic toxic liver injury was conducted. Chronic toxic liver injury was induced by administration of carbon tetrachloride. In the liver and blood serum content of total lipids, triacylglycerols, free fatty acids, cholesterol and total phospholipids were measured. It was found that among the substances and preparations were studied, more lipotropic effect demonstrated by a combination of a polyphenol concentrate "Cabernet" and methionine, compared to the effect of its isolated components. This effect is manifested in the reduction of the lipolysis and a significant reduction of hyperlipidemia symptoms.

KEY WORDS: liver, carbon tetrachloride, triacylglycerol, cholesterol, grape, polyphenols.

Отримано 25.04.13

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна, e-mail: biochem@ukrfa.kharkov.ua.