

Гепатопротекторные свойства меланинов чаги

© Иванова¹⁺ Гузель Адгамовна, Сысоева^{1*} Мария Александровна
и Зобов² Владимир Васильевич

¹ Кафедра пищевой биотехнологии. Казанский национальный исследовательский технологический университет. Ул. К. Маркса, 68. г. Казань, 420015. Республика Татарстан. Россия.

Тел.: (843) 231-41-73. E-mail: guziva@rambler.ru

² Отдел биологически-активных препаратов. Лаборатория химико-биологических исследований.

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, КазНЦ РАН. Ул. Ак. Арбузова, 8.

г. Казань, 420088. Республика Татарстан. Россия. Тел.: (843)273-93-64 E-mail: zobov@iopc.knc.ru

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: меланин, чага, гиперразветвленный полимер, антиоксидантная активность, гепатопротекторная активность, четыреххлористый углерод.

Аннотация

На модели острого токсического гепатита крыс, вызванного четыреххлористым углеродом, изучены гепатопротекторные свойства меланинов чаги. Анализ их гепатопротекторной активности проведен на основании показателей сыворотки крови подопытных животных, таких как аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, общий белок, билирубин, холестерин, мочевины, а также срезов печени. Показана корреляция антиоксидантных свойств с гепатопротекторной активностью, проявляемых меланинами чаги.

Введение

Одним из перспективных природных объектов для разработки лекарственных препаратов, биологически активных добавок (БАД) и косметических средств различной направленности действия является березовый гриб чага. Чага (*Chaga*) или Берёзовый гриб (*Fungus betulinus*) по ботанической классификации: – Трутовик косотрубчатый – *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil; семейство – Трутовиковые (*Polyporaceae*) или Гименохетовые (*Gymenochaetaceae*, тип Базидиальные грибы (*Basidiomycetes*) [1].

На основе водных извлечений чаги фармацевтическая промышленность выпускает препарат «Бефунгин», который применяется для профилактики и терапии заболеваний желудочно-кишечного тракта и различных злокачественных новообразований.

БАД из чаги, такие как «Чаговит», «Литовит-Ч», эффективны в качестве антиоксидантов, иммуномодуляторов и адаптогенов [2]. В водном извлечении из чаги содержатся меланин, фенольные вещества, полисахариды и неорганические соединения. Меланин чаги проявляет высокую антиоксидантную активность (АОА) и является основным действующим компонентом, обеспечивающим терапевтическую активность препаратов на основе водных извлечений из чаги [3, 4].

Меланины эффективно подавляют перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот, предотвращают одноцепочные разрывы ДНК, повреждения биомембран, окисление SH групп белков и глутатиона. В результате они ускоряют процессы заживления хирургических ран, проявляют иммуномодулирующие, противовоспалительные, энтеросорбционные и противоопухолевые свойства на фоне низкой токсичности.

Меланины чаги отнесены к алломеланинам – чёрно-коричневые пигменты высших растений и грибов. Уникальным свойством меланинов чаги является устойчивое свободно-радикальное состояние и высокое содержание парамагнитных центров [2].

Установлено, что АОА меланинов чаги можно значительно повысить, применяя в экстракции сырья чаги комплексоны, изменяя рН экстрагента, обрабатывая водные извлечения из

чаги органическими растворителями [5-7]. При этом увеличение АОА меланина происходит, в среднем, в 2 раза. Применение гиперразветвленного полимера (ГРП) серии *Boltorn H40* при получении меланинов чаги позволяет повысить антиоксидантные свойства меланина чаги в 4 раза [8].

ГРП *Boltorn* представляет собой макромолекулу, состоящую из прогрессивно разветвляющихся цепей. Имея большой объем молекулы и большое количество гидроксильных групп на ее периферии ГРП способен взаимодействовать с веществами гидрофильной и гидрофобной природы, а также с катионами металлов [9]. ГРП *Boltorn H40* способствует изменению композиции частиц меланина и влияет на изменение его АОА.

Цель работы – выявление связи антиоксидантных и гепатопротекторных свойств меланинов чаги, полученных различными способами.

Экспериментальная часть

Меланин чаги (МК) получали из водного извлечения чаги осаждением хлористоводородной кислотой согласно [5]. Меланин, полученный с применением ГРП *Boltorn H40 (M40)*, выделяли также из водного извлечения чаги согласно [10].

Исследования гепатозащитной активности образцов проводили согласно [10] на модели острого токсического гепатита. В качестве препарата сравнения использовали гепатопротектор карсил (*Sopharma*).

Эксперименты проведены в летне-осенний период на 50 беспородных белых крысах обоего пола массой 200-240 г. Животные были разделены на 5 групп: 1 группа – интактные крысы ($n = 10$); 2 группа – крысы, которым ежедневно в течение 4-х дней один раз в сутки подкожно вводили 50% масляный раствор четыреххлористого углерода (CCl_4) из расчета 2 мл CCl_4 на кг массы тела (CCl_4 – гепатит, $n = 10$); 3 группа – крысы, получавшие внутрижелудочно МК в дозе 100 мг/кг в форме суспензии на 1% крахмальном клейстере за 2 часа до введения четыреххлористого углерода ($n = 10$); 4 группа – крысы, получавшие за 2 часа внутрижелудочно М40 в дозе 100 мг/кг в форме суспензии на 1% крахмальном клейстере до введения четыреххлористого углерода ($n = 10$); 5 группа – крысы, получавшие в качестве сравнения гепатопротектор карсил в дозе 100 мг/кг в форме суспензии на 1% крахмальном клейстере.

Животным 1 и 2 групп вводили эквивалентное количество 1% крахмального клейстера. Забор образцов крови и печени осуществляли после декапитации животных под эфирным наркозом через сутки после последнего введения препаратов. Кусочки печени фиксировали в формалине и заливали в парафин.

Содержание лабораторных животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных. Животные содержались на стандартном лабораторном рационе в условиях свободного доступа к пище и воде. Экспериментальные исследования проведены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005 г.) [11]»

В сыворотке крови определяли активность печеночноспецифических ферментов – аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание билирубина, холестерина, белка по общепринятым методам, используя стандартные наборы *ЗАО «ДИАКОН-ДС»* (Пушино), на полуавтоматическом биохимическом анализаторе *RAL Clima MC-15*.

При обработке результатов исследований использовали параметрический (t-критерий Стьюдента) и непараметрические (U-критерий Манна-Уитни, W-критерий Вилкоксона и χ^2 -критерий) методы с определением средней арифметической (\bar{X}) и ее стандартной ошибки (Δx). Значимость различий считали достоверной при $P_t, P_u < 0.05$. Расчёты проводили с использованием программы *Statistica 6.0* для Windows.

Результаты и их обсуждение

Ранее показано, что АОА меланина, полученного с использованием *Boltorn H40–M40*, составляет 121 кКл/100 г меланина [8], что превышает АОА меланина водного извлечения чаги (МК) в 4 раза, а карсила в 11 раз [12]. Определение острой токсичности показало, что меланин М40 имеет LD_{50} (per os, млекопитающие) 7063 мг/кг и относится к категории нетоксичных веществ.

Четыреххлористый углерод широко используется в качестве токсиканта при моделировании тяжелых заболеваний печени у млекопитающих [13, 14].

При лечении отравлений четыреххлористым углеродом рекомендуется патогенетическая терапия, включающая в себя прием липотропных средств, унитиола, глутамина, комплекса коэнзимов, антипротеазных препаратов, а в 1-2 сутки отравления – антиоксидантов.

Токсическое действие его связано с поражением центральной нервной системы, печени и почек.

Наиболее ранним признаком токсического действия четыреххлористого углерода является изменение активности индикаторных ферментов, отражающих нарушение проницаемости клеточных мембран: аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ).

При отравлении четыреххлористым углеродом поражается синтетическая функция печени: нарушается синтез глюкоуринов, билирубина и белков сыворотки крови. Патолого-анатомическое исследование обнаруживает паренхиматозное и жировое перерождение печени, а также многочисленные некрозы в ней [15].

В ранних исследованиях гепатопротекторных свойств чаги *in vivo* показано, что пероральное введение концентрата из чаги белым мышам приводит к уменьшению дистрофических изменений в печени, вызванных четырёххлористым углеродом.

Токсикант вводили в виде 40% масляного раствора перорально в количестве 0.1 мл 2 раза в неделю, концентрат из чаги вводили по 0.5 мл 1.5% раствора, что составляло 400-500 мг сухого вещества чаги на 1 кг веса животного. При сочетании введения четыреххлористого углерода и концентрата чаги в ранние сроки опытов (на 4-6 введение четыреххлористого углерода) внимание авторов обратило полнокровие печеночной ткани.

Увеличение размеров клеток, постоянно наблюдавшееся при введении токсина, было менее выражено в условиях сочетания введения четыреххлористого углерода и концентрата чаги. Уже в начале опыта дистрофические изменения печеночных клеток были выражены слабо и отличались по своей интенсивности от изменений, полученных в те же сроки введения токсина, но без концентрата чаги.

Журавлева Т.Б. и Спалва Е.А. показали, что пероральное введение концентрата из чаги в опыте острого гепатита, вызванного введением четыреххлористого углерода, приводит к уменьшению дистрофических изменений печени подопытных животных [16].

Исследование меланинов чаги и препарата карсил проведено в дозах 100 мг/кг массы животного на фоне острого ССl₄-гепатита. Схемы применения меланинов чаги и карсила отличаются от приведенной в литературе [15] более коротким сроком проведения опыта и снижением количества исследуемого гепатопротектора. Как показано в таблице, исследуемые образцы в разной степени повлияли на восстановление биохимических показателей основных патологических синдромов поражения печени четыреххлористым углеродом.

Таблица. Биохимические показатели сыворотки крови животных ($X \pm \Delta x$; n = 10)

Группы животных	В сыворотке крови						
	ЩФ*, Е/л	АсАТ*, Е/л	АлАТ*, Е/л	Белок, г/л	Билирубин общий, мкмоль/л	Холестерин, ммоль/л	Мочевина, моль/л
Интактные	92.00±28.1	59.36±5.47	39.36±2.25	67.30± 5.02	3.74±0.17	4.87±0.16	4.28±0.13
CCl ₄	458.00±35.41	138.64±16.40	68.54±6.79	42.94± 3.43	14.22±0.14	10.50±0.86	7.35±0.14
МК + ССl ₄	187.00±15.16	79.00±6.18	55.46±2.78	50.73± 2.45	8.72±0.32	6.78±0.93	5.63±0.19
М40 + ССl ₄	167.00±22.65	65.46±7.54	48.45±3.33	55.10± 4.01	6.94±0.19	6.12±0.24	5.39±0.02
Карсил + ССl ₄	196.00±18.74	93.18±9.17	61.47±8.33	51.37± 4.36	9.41±0.23	7.66±0.31	6.37±0.17

* ЩФ – щелочная фосфатаза; АсАТ – аспартатаминотрансфераза; АлАТ – аланинаминотрансфераза

При интоксикации четыреххлористым углеродом повышается количество АсАТ, АлАТ и щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови животных, что свидетельствует о нарушении проницаемости клеточных мембран. Щелочная фосфатаза – фермент, который присутствует во многих тканях млекопитающих, преимущественно в клетках печени и желчевыводящих путей, костях, плаценте и является катализатором биохимических реакций в этих клетках. В основном, щелочная фосфатаза находится в клеточной мембране. В кровеносном русле этот

фермент не работает. При разрушении клеток их содержимое попадает в кровь. В норме часть клеток обновляется, поэтому в крови обнаруживается определенное количество щелочной фосфатазы.

При разрушении большого количества клеток уровень щелочной фосфатазы может повышаться очень значительно, о чем свидетельствует увеличение в 5 раз количества этого фермента в сыворотке крови 2 группы животных по сравнению с интактными. При пероральном введении меланинов чаги и карсила также наблюдается повышение уровня фермента, однако не так значительно. Причем, при введении М40 уровень ЩФ ниже на 12% по сравнению с МК и карсилом.

Аспаратаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза синтезируются внутриклеточно и в норме в крови содержатся лишь в небольшом количестве. В медицинской практике уровень АлАт является широкоприменяемым индикатором при повреждении клеток печени. Повреждение клеток печени влечет повышение уровня этих ферментов в сыворотке крови.

В опытных группах животных, принимавших меланины чаги и препарат Карсил количество ферментов АлАТ и АсАТ сравнимо со значениями этих показателей в группе интактных животных. В группе животных, принимавших меланин, полученный с использованием ГРП (М40), уровень этих ферментов в сыворотке крови максимально приближен к показателям контрольной группы.

Общий белок сыворотки крови – лабораторный показатель, который отражает состояние гомеостаза. Содержание общего белка является очень важным диагностическим параметром при целом ряде заболеваний, особенно связанных с выраженными нарушениями метаболизма.

Абсолютное снижение концентрации общего белка в сыворотке крови чаще всего происходит за счет уменьшения количества альбуминов. Этот процесс наблюдается при недоедании, заболеваниях желудочно-кишечного тракта и трудностях усвоения пищи, хронических интоксикациях.

Уменьшение количества альбуминов в крови связывают также со снижением синтеза белка в печени вследствие нарушения работы печени. Уровень белка сыворотки крови во всех исследуемых группах колеблется незначительно, однако показатели животных, принимавших меланины чаги и Карсил близки к показателям интактных животных. Анализируя данные, можно сказать, что введение меланина, обладающего большей антиоксидантной активностью, способствует большему синтезу белка в печени и составляет 82% от контроля (интактные животные).

Известно, что повышение уровня билирубина в крови связано с нарушением работы клеток печени. Такой процесс наблюдается при гепатитах различного происхождения, циррозах, раке печени. Повышенный уровень холестерина также наблюдается при некоторых заболеваниях печени и почек, связанных с интоксикацией организма.

Как видно из экспериментальных данных, интоксикация четыреххлористым углеродом влечет повышение уровня билирубина и холестерина в 3.8 и 2.2 раза соответственно, тогда как применение меланинов чаги и препарата карсил способствуют значительному снижению этих индикаторов в сыворотке крови.

Очевидно, что образцы, обладающие максимальной АОА, способствуют нормализации функции печени при интоксикации четыреххлористым углеродом и уровень билирубина и холестерина в сыворотке крови при введении М40 имеют более близкие значения к показателям интактной группы.

При очень тяжелых поражениях печени наблюдается снижение концентрации мочевины по сравнению с контролем, чего не происходит в данном случае.

Повышение уровня мочевины в сыворотке крови, по-видимому, больше связано с почечной недостаточностью, поскольку интоксикация четыреххлористым углеродом также нарушает работу выделительной системы. Однако пероральное введение меланинов чаги и Карсила способствует установлению уровня мочевины близкому к контрольному значению.

Наиболее близкими к контролю обладают показатели сыворотки крови животных, принимавших М40.

В целом, по биохимическим показателям сыворотки крови животных, принимавших меланины чаги и Карсил, можно судить о значительном снижении интенсивности процессов

Полная исследовательская публикация _____ Иванова Г.А., Сысоева М.А. и Зобов В.В. липопероксидации, что происходит при разрушении мембран гепатоцитов, что подтверждено микрофотографиями срезов печени подопытных животных (рисунок).

На фотографиях клеток печени интактного животного отчетливо просматривается структура печеночных долек, желчных протоков. При интоксикации четыреххлористым углеродом происходит нарушение характерной структуры, появляется зернистость, что свидетельствует о поражении печени токсикантом (рис. б).

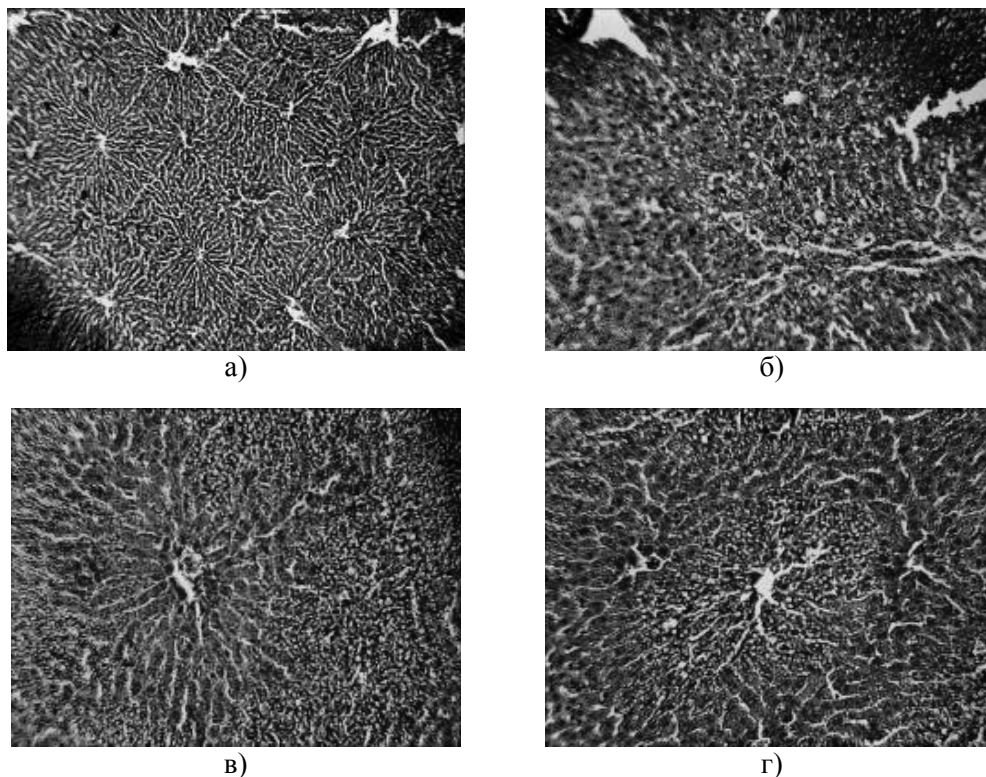


Рисунок. Микрофотографии срезов печени: а) интактного животного (увеличение в 100 раз); б) с интоксикацией четыреххлористым углеродом (увеличение в 200 раз); в) при терапии меланином чаги М40 (увеличение в 200 раз); г) при терапии препаратом Карсил (увеличение в 200 раз)

Пероральное введение меланинов чаги и препарата карсил (рисунок в, г) несмотря на появление незначительной зернистости, в целом, способствует сохранению структуры печеночных долек и желчных протоков. Причем увеличение размера ядер гепатоцитов при приеме меланинов чаги выражено меньше в сравнении с препаратом Карсил.

Заключение

Использование в качестве гепатопротекторов меланинов чаги более эффективно, чем широко применяемого препарата Карсил. При этом, меланин чаги, полученный с применением *ГРП Boltorn H40*, обладает более высокими свойствами гепатопротектора по сравнению с меланином водного извлечения чаги, полученного по традиционной технологии. Следовательно, более высокая АОА меланина способствует интенсификации его гепатопротекторных свойств. Проведенные исследования показали более эффективное применение в качестве гепатопротекторов меланинов по сравнению с концентратом, полученным из чаги по [16]. Полученные данные позволяют рекомендовать полученные меланины для разработки БАД и лекарственных препаратов, обладающих гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами.

Выводы

Установлено, что гепатопротекторные свойства меланинов, полученных разными способами, коррелируют с проявленными ими антиоксидантными свойствами и превышают соответствующие свойства широко применяемого гепатопротектора Карсил.

Благодарности

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Наноматериалы и нанотехнологии» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» по госконтракту №_01201252915 от 28.02.2012 г тема: "Разработка биологически активных добавок на основе супрамолекулярных бионаносистем".

Литература

- [1] Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Химические и медико-биологические свойства чаги. *Хим.-фарм. журнал*. **2006**. Т.40. №10. С.37-44.
- [2] Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В., Горяйнова Л.К. Чага, чаговит, чагалюкс в лечебной и профилактической практике. *ГУ Российский онкологический центр им. Н. Н. Блохина*. **2008**. 64с.
- [3] Сысоева М.А. Высокоактивные антиоксиданты на основе гриба *Inonotus obliquus*: *Дис. на соиск. уч. степ. док. хим. наук. Казань*. **2009**. 293с.
- [4] Сысоева М. А., Носов А. И. Получение водных экстрактов трутовых грибов. *Бутлеровские сообщения*. **2012**. Т.30. №4. С.147-152.
- [5] Кузнецова О.Ю., Сысоева М.А., Гамаюрова В.С. Исследование золя водных извлечений чаги. IV. Антиоксидантная активность. Влияние способа извлечения и применение комплексонов, гидроокиси натрия. *Химия растительного сырья*. **2005**. №1. С.41-47.
- [6] Хабибрахманова В.Р. Состав и свойства дисперсной фазы золя водных извлечений чаги: *автореф. дис. канд. хим. наук. Казань*. **2008**. 18с.
- [7] Сысоева М. А., Хабибрахманова В. Р., Гамаюрова В. С., Муллина Д. В., Кузнецова О. Ю., Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Применение гидролазосодержащих ферментных препаратов при получении водных извлечений чаги. Часть I. Использование гидролаз некрахмалистых полисахаридов. Антиоксидантная активность полученных извлечений. *Бутлеровские сообщения*. **2005**. Т.7. №4. С.36-39.
- [8] Иванова Г.А., Сысоева М.А., Гамаюрова В.С. Зиятдинова Г.Х., Будников Г.К., Захарова Л.Я., Воронин М.А. Повышение антиоксидантной активности водных извлечений и меланинов чаги. I. Обработка водных извлечений чаги водными растворами гиперразветвленных полимеров. *Химия растительного сырья*. **2010**. №2. С.105-108.
- [9] Королев Г.В., Бубнова М.Л. Гиперразветвленные полимеры – новый мощный стимул дальнейшего развития области трехмерной полимеризации и революция в полимерном материаловедении. *Институт проблем химической физики Российской Академии Наук. М.* **2007**. 100с.
- [10] Иванова Г.А., Сысоева М.А., Гамаюрова В.С., Кутырев Г.А. Способ получения осажденного препарата из березового гриба чага. Патент РФ № 2366439. 10.09.2009.
- [11] Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. *М.: Бионт*. **2000**. 398с.
- [12] Иванова Г.А. Состав и свойства дисперсной фазы золя водных извлечений чаги: *Дис. канд. хим. наук. Казань*. **2008**. 135с.
- [13] Кравченко Л.В., Трусов Н.В., Ускова М.А., Аксенов И.В., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Васильева М.А., Селифанов А.В., Тутельян В.А. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса. *Токсикологический вестник*. **2009**. №1. С.12-17.
- [14] Иванова В.В., Лигостаева Ю.В., Потеряева О.Н., Русских Г.С., Грек О.Р., Шарапов В.И., Геворгян М.М. Изучение гепатопротекторного действия растительного экстракта коры березы при экспериментальном гепатите, вызванном четыреххлористым углеродом. *Фундаментальные исследования*. **2013**. №3. С.277-279.
- [15] Чиркова Е.М., Измеров Н.Ф. Четыреххлористый углерод. *М.: Центр международных проектов ГКНТ*. **1983**. 20с.
- [16] Журавлева Т.Б., Спалва Е.А. Влияние чаги на дистрофические изменения в печени, вызванные четыреххлористым углеродом. *Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии. Л.: Медгиз*. **1959**. С.133-140.