

УДК615.252:593.96]:577.125.8

А.В. Кропотов, В.П. Челомин, Н.В. Плаксен,
Н.С. Хильченко

АНТИПЕРЕКИСНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТА ИЗ ТРЕПАНГА *STICHOPUS JAPONICUS*

Владивостокский государственный медицинский университет,
Тихоокеанский океанологический институт
им. В.И. Ильичева ДВО РАН (г. Владивосток)

Ключевые слова: трепанг, биологическая активность, перекисное окисление липидов, стресс.

Согласно концепции позитивного питания предпочтение отдается рационам, содержащим ингредиенты или биологически активные добавки, повышающие сопротивляемость организма при различных заболеваниях. В условиях постоянно возрастающей нагрузки на адаптивные механизмы человека особое внимание уделяется парафармацевтикам, обладающим антистрессорным действием [8]. Вместе с тем хорошо известно, что независимо от природы стресса происходит его активное вмешательство в окислительный метаболизм организма, сопряженное с усилением генерации радикалов кислорода. Эти высокореакционные промежуточные продукты одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода (O_2 , OH , H_2O_2) постоянно образуются в процессе жизнедеятельности всех аэробных организмов [12]. Под влиянием неблагоприятных факторов, например чужеродных химических веществ, концентрация оксирадикалов резко возрастает и, при определенных условиях, может превысить способность защитной антиоксидательной системы противостоять разрушительному действию этих молекул. Возникший дисбаланс между про- и антиоксидательными системами приводит к накоплению продуктов окисления основных классов макромолекул, включая липиды, белки и нуклеиновые кислоты, в результате чего в клетке может развиться патологический (деструктивный) процесс, получивший в литературе название окислительного стресса [13, 15]. Данный феномен рассматривается в качестве одного из фундаментальных механизмов патологии. Перспективным природным источником для создания лекарств или нутрицевтиков, обладающих антистрессорной и антиоксидательной активностью, могут стать биоресурсы Тихого океана. Так, в скрининговых исследованиях экстрактов, полученных из 70 видов морских беспозвоночных залива Петра Великого, у 30 из них была установлена стресс-протективная активность [5], в том числе у хлороформ-метанольных и этанольных извлечений из дальневосточного трепанга *Stichopus japonicus*, которые, как это было ранее показано в модельных экспериментах, проявляли и антиоксидательные свойства [1].

Трепанг в Юго-Восточной Азии издавна считается пищевым деликатесом, обладающим стимулирующим и общеукрепляющим действием. Трепанг содержит тритерпеновые гликозиды, липиды, гексозамины, метионин, органически связанный йод, различные микроэлементы, витамины, простагландины и другие компоненты [7]. Тритерпеновые гликозиды обладают сильным антифунгальным действием. Имеются сообщения о радиопротективных и антиоксидательных свойствах экстрактов трепанга, сопоставимых по активности с препаратами, полученными из женьшеня, элеутерококка и аралии маньчжурской [1,6]. Высокое содержание в экстрактах дальневосточного трепанга полиненасыщенных жирных кислот и фосфолипидов позволили предположить и экспериментально доказать возможность его антисклеротического действия [6]. Таким образом, экстракты трепанга обладают довольно широким спектром фармакологической активности, однако установленные по эритроцитарному тесту факты об их антиоксидательном действии нуждаются в дополнительной проверке в опытах на моделях патологических процессов *in vivo*, когда изучаемая субстанция вводится животным внутрь в дозах, эквивалентных рекомендуемым человеку.

Цель настоящего исследования: экспериментальное изучение влияния этанольного экстракта трепанга на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени при гиподинамическом стрессе, токсическом гепатите и фиброзе. Опыты были выполнены на белых беспородных мышах массой 22-25 г и крысах линии Вистар массой 160-220 г, которые находились на стандартном рационе вивария и содержались по 5-6 особей в специальных пластмассовых клетках со стружечной подстилкой. Стрессорную гиподинамию моделировали путем подвешивания животных за шейную складку на 22 часа [5]. Этанольный 40% экстракт, полученный из кожно-мускульного мешка трепанга (содержание экстрактивных веществ в 1 мл — 10 мг), предварительно освобожденный от спирта, в виде водной суспензии вводили мышам внутривентрально однократно за час до иммобилизации или многократно в течение 4 дней в суточной дозе 16 мг/кг. В последнем случае для усиления стрессорной реакции за сутки перед гипокинезией мышам не давали еду. Крысам препарат вводили профилактически в течение 10 дней в дозе 8 мг/кг в сутки до моделирования гипокинетического стресса. Расчет суточных доз для лабораторных животных производили, используя формулу, предложенную Т.А. Гусковой [4], исходя из оптимального объема экстракта трепанга 10 мл, рекомендованного производителем в качестве биологически активной добавки к пище для человека. Контрольные животные во всех опытах получали внутрь эквивалентные количества воды.

Острый гепатит вызывали у крыс введением под кожу 50% раствора тетрахлорметана в оливковом масле в объеме 4 мл/кг в сутки на протяжении 4 дней. Контрольным животным инъецировали оливковое

масло. Начиная с 3-го дня опыта в течение 5 дней подопытным крысам внутрь однократно вводили экстракт трепанга в суточной дозе 8 мг/кг или препарат сравнения — гепатозащитное средство с антиокислительными свойствами силибинин (Карсил®, Phrmachim Holding EAD, Болгария) в дозе 100 мг/кг. Экспериментальный фиброз в печени моделировали совместным введением крысам в течение месяца тетрахлорметана и этанола. Тетрахлорметан в дозе 0,1 мл/кг вводили животным внутрь один раз в три дня, этанол — в виде 5% раствора давали через поилки на протяжении всего опыта вместо воды [2]. Подопытной и контрольной группам ежедневно на протяжении всего опыта вводили внутрь экстракт трепанга или воду в суточной дозе 8 мг/кг массы тела.

В конце опытов под эфирным наркозом животных декапитировали, извлекали и взвешивали надпочечники, тимус, селезенку, печень и подсчитывали число изъязвлений в слизистой оболочке желудка. Критерием успешности моделирования гепатита или фиброза печени служили данные о морфологии печени, описанные на кафедре патологической анатомии ВГМУ, и изменения каталитической концентрации в сыворотке крови аланин-аминотрансферазы, аспартат-аминотрансферазы, общего и прямого билирубина, которые определяли с использованием наборов реактивов Био-Ла-Тест® (Чешская республика).

Первичные продукты пероксидации — диеновые конъюгаты (ДК) определяли в аликвотах липидных экстрактов, полученных по методу Блей-Дайера [9], после перерастворения их в метанол-пентановой смеси по поглощению в ультрафиолете ($\lambda=232$ нм) [3]. Содержание малонового диальдегида (МДА) — продукта окислительной деградации жирных кислот, определяли в гомогенатах печени по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [10]. Уровень флуоресцирующих продуктов типа оснований Шиффа определяли спектрофлуориметрически (Hitachi MPF-4, $\lambda_{\text{в}}=360$ нм и $\lambda_{\text{ф}}=430$ нм) [14]. Относительное содержание этих соединений выражали в условных единицах в расчете на 1 мг липидов (относительно флуоресценции раствора 1 мкмоль/мл хинин-сульфата в 0,1N

H₂SO₄). Для определения интегральной антирадикальной активности (ИАА) ткани печени использовали модифицированный метод Уинстона и Реголи. Значения МДА и ИАА нормировались на 1 мг белка, определяемого в гомогенатах печени [11]. Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

Независимо от модели стрессорного воздействия — длительной гиподинамии или токсического повреждения печени — во всех в контрольных группах наблюдались сходные классические, описанные Г. Селье изменения со стороны внутренних органов: гипертрофия надпочечников, инволюция лимфоидных органов (тимус, селезенка), кровоизлияния и изъязвления в слизистой оболочке желудка. Биохимические изменения заключались в увеличении продуктов ПОЛ в печени и снижении ИАА.

В условиях стрессорной гипокинезии у мышей, находившихся на обычном рационе и на фоне суточного голодания, в печени возрастали продукты ПОЛ: ДК соответственно на 42 и 77%, МДА — на 82 и 138%, оснований Шиффа — на 108 и 185%, и при этом снижались показатели ИАА на 15 и 20%. Очевидно, что при алиментарном ограничении изменения в ПОЛ-антиокислительной системе у мышей были более выраженными. У крыс с гипокинезией наблюдали сходные с мышами и статистически достоверные биохимические изменения: увеличение в печени ДК на 74%, МДА — на 48%, оснований Шиффа — на 147% и снижение ИАА на 15% (табл. 1).

Однократное или многократное введение экстракта трепанга подопытным животным до их стрессорной иммобилизации оказывало защитное действие, которое проявилось в частичном предотвращении инволюции лимфоидных органов, уменьшении вдвое числа кровоизлияний и изъязвлений в слизистой оболочке желудка, незначительной нормализации биохимических показателей. Независимо от кратности введения, в группах животных, получавших экстракт трепанга, наблюдалось снижение продуктов ПОЛ: ДК на 12-15%, МДА на 13-17%, оснований Шиффа на 20-44% и незначительное повышение ИАА.

Таблица 1

Влияние экстракта трепанга на показатели ПОЛ в печени мышей и крыс, подвергнутых стрессорной гипокинезии ($M \pm m$)

Группы ЖИВОТНЫХ	ДК, нмоль/мг липидов	МДА, нмоль/мг белка	Основания Шиффа, усл. ед./мг липидов	ИАА, мгбелка
Мыши				
Контроль	2,91±0,15	1,20±0,16	1,44±0,13	874,2±16,0
Гипокинезия (контроль 2)	4,14±0,21*	2,18±0,10*	3,00±0,19*	745,5±25,0*
Гипокинезия + трепанг (одн.)	3,63±0,10**	1,60±0,17**	1,97±0,18**	803,3±17,0**
Гипокинезия (контроль 3)	5,16±0,28*	2,86±0,21*	4,11±0,31*	700,4±25,0*
Гипокинезия + трепанг (длит.)	4,50±0,15**	2,42±0,09**	3,29±0,10**	722,4±20,0
Крысы				
Контроль	3,30±0,25	2,49±0,23	1,93±0,17	672,3±26,0
Гипокинезия (контроль 2)	5,74±0,19*	3,68±0,32*	4,77±0,29*	573,5±25,0*
Гипокинезия + трепанг (длит.)	4,88±0,13**	3,19±0,12**	2,68±0,18**	617,3±17,3**

* Различие статистически достоверно по сравнению с контролем.

** Различие статистически достоверно по сравнению с контролем 2 или 3.

Таблица 1

Влияние экстракта трепанга на показатели ПОЛ в печени мышей и крыс, подвергнутых стрессорной гипокинезии ($M \pm m$)

Группа животных	ДК, нмоль/мг липидов	МДА, нмоль/мг белка	Основания Шиффа, усл. ед./мг липидов	ИАА, мгбелка
Гепатит				
Контроль	3,19±0,36	2,46±0,43	1,77±0,18	680,6±34,4
Тетрахлорметан (контроль 2)	6,71±0,22*	4,90±0,27*	4,34±0,20*	409,8±39,7*
Тетрахлорметан + трепанг	3,66±0,29**	2,58±0,20**	1,91±0,30**	671,3±42,4**
Тетрахлорметан + силибинин	3,87±0,44**	3,05±0,31**	2,07±0,34**	586,7±41,5
Фиброз				
Контроль	3,67±0,27	2,48±0,37	1,81±0,37	655,7±41,4
Фиброз (контроль 2)	5,47±0,35*	4,00±0,33*	4,68±0,31*	448,3±37,1*
Фиброз + трепанг	4,89±0,22**	3,52±0,29	3,15±0,22**	519,6±29,9**
Фиброз + силибинин	4,38±0,15**	3,02±0,20**	2,35±0,15**	675,0±43,0**

* Различия статистически достоверно по сравнению с контролем.

** Различия статистически достоверно по сравнению с контролем 2.

У крыс с острым гепатитом наблюдалось значительное накопление в печени продуктов ПОЛ: увеличение уровней ДК на 110%, МДА на 99%, оснований Шиффа на 145% и снижение ИАА на 40%. Под влиянием экстракта трепанга регистрировали снижение в печени продуктов пероксидации: ДК на 46%, МДА на 47%, оснований Шиффа на 56% и увеличение ИАА на 64%. У животных, которым вводили силибинин, происходили сходные изменения в показателях ПОЛ: антирадикальная система в сторону нормализации, однако ни под влиянием экстракта трепанга, ни под влиянием эталонного гепатопротектора они не достигали физиологических значений (табл. 2).

Развитие экспериментального фиброза печени сопровождалось накоплением продуктов ПОЛ: уровень ДК в печени увеличился на 49%, МДА — на 39%, оснований Шиффа — на 158%, а ИАА снизилась на 32%. Введение экстракта трепанга повышало резистентность организма к токсикантам, что выразилось в умеренной нормализации изучаемых показателей. Однако на данной модели антиоксидантные свойства силибинина были более выраженными.

Таким образом, на основании изучения состояния ПОЛ и ИАА в печени животных, подвергнутых стрессорной гиподинамией или воздействию гепатотоксических агентов, было установлено наличие антиперекисной активности у экстракта трепанга, которая была сопоставима с гепатозащитным действием силибинина. Полученные результаты позволяют рассматривать рационы, включающие трепанг как фактор лечебного питания и саму голотурию *Stichopus japonicus* в качестве природного источника для создания перспективных биологически активных добавок к пище.

Литература

1. Брехман И.И., Гоненко В.А. // Биол. науки. — 1969. — Вып. 7. — С. 51-53.
2. Венгеровский А.И., Саратиков А.С. // Ведомости Фарм. комитета. — 1999. — №2. — С. 9-12.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972.

4. Гуськова Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. — 2001. — Т.35, № 10. — С. 3-8.

5. Добряков Ю.И., Брехман И.И. // Валеология: Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья. — Владивосток: Дальнаука, 1996. — Вып. 3. — С. 83-89.

6. Левин В.С. Дальневосточный трепанг: Биология, промысел, воспроизводство. — СПб.: Голанд, 2000.

7. Рисман М. Биологически активные пищевые добавки: Неизвестное об известном. — М.: Арт-Бизнес Центр, 1998.

8. Тутельян В.А. // Вopr. питания. — 1996. — № 6 — С. 3-11.

9. Bligh J.L., Dyer W.J. // Can. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37. — P. 911-917.

10. Buege J.A., Aust S.D. // Methods in Enzymology. — Academic Press, 1978. — P. 302-310.

11. Greenberg C.S., Gaddock P.R. // Anal. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 1725-1726.

12. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // Archiv. Biochem. Biophys. — 1986. — Vol. 246. — P. 501-514.

13. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. — London: Academic Press, 1991.

14. Shimasaki H., Hirai N., Ueta N. // J. Biochem. — 1988. — Vol. 104. — P. 761-766.

15. Storey K.B. // Brazilian J. Med. Biol. Res. — 1996. — Vol. 29. — P. 1715-1733.

Поступила в редакцию 24.11.04.

A.V. Kropotov, V.P. Chelomin, N.V. Plaksen, N.S. Khilchenko
ANTIPEROXID EFFECTS OF EXTRACT
FROM STICHOPUS JAPONICUS

Vladivostok State Medical University, Pacific Oceanological
Institute Far East Branch of Russian Academy of Sciences
(Vladivostok)

Summary — Increased content of the lipid peroxidation products and reduced integral antiradical activity in liver tissue were found in experimental mice and rats with induced stress hypodynamia as well as in pilot rats with modeled acute carbon tetrachloride-induced hepatitis or liver fibrosis which were caused by combined administration of carbon tetrachloride and ethanol for one month. Preventive administration of an ethanol extract of stichopus to rats exerted antistress and antioxidant effects similar to the preparation of comparison silibinin.

Pacific Medical Journal, 2004, No. 3, p. 18-20.