

методов оказались сопоставимы (табл. 2). Сапонины надземной части патринии скабиозолистной ранее не исследовались. Обнаружено, что сырье травы содержит эти соединения, количество которых, определенное методом осаждения, близко к таковому в корнях (3,4 и 4,5 % соответственно). Надземная часть растения содержит 1,3 % олеаноловой кислоты.

Дубильные вещества в сырье патринии скабиозолистной обнаружены в надземной части в количестве 5,4 % (от абсолютно сухой массы). В корнях дубильных веществ не обнаружено.

Проведенные исследования показали, что основными экстрактивными веществами как надземной, так и корневой частей патринии скабиозолистной являются эфирные масла, фенолкарбоновые кислоты, сапонины и полисахариды.

Литература

1. Бабаш Т.А., Перельсон М.Е. Количественное определение агликона суммы патринозидов в корнях патринии средней // Химия природ. соед. 1982. № 5. С. 612–624.
2. Бухаров В.Г., Карлин В.В., Сидорович Т.Н. Тритерпеновые гликозиды *Patrinia scabiosifolia* // Химия природных соединений. 1970. № 1. С. 69–74.
3. Зорикова О.Г., Хасина Э.И. Седативная и стресс-протективная активность настоек *Patrinia scabiosifolia* (Valerianaceae) //

- Растительные ресурсы. 2006. Т.42, вып.3. С.150–155.
4. Ушкалова А.В., Илларионова Т.С. Эффективность и безопасность антидепрессивных и седативных средств растительного происхождения // Фармация. 2008. № 20. С. 10–14.
 5. Фурса Н.С., Доля В.С., Литвиненко В.И., Зайцев В.Г. Фітохімічне дослідження насіння валеріани високої та патринії скабіозолистної // Фармац. журн. 1984. № 3. С. 69–70.
 6. Harborne J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids // Progress in clinical and biological res. 1986. Vol. 213. P. 15–24.

Поступила в редакцию 18.12.2012.

CHEMICAL ANALYSIS OF PATRINIA SCABIOSIFOLIA

O.G. Zorikova¹, L.V. Yakimenko²

The V. L. Komarov Mountain-Taiga Station, FEB RAS (26

¹ Solnechnaya St. Gorno-Tayozhnoye village Primorsky Krai 692533

Russian Federation), ² Interdepartmental Research and Educational

Centre "Plant Resources" (The V. L. Komarov Mountain-Taiga

Station, FEB RAS – Vladivostok State University of Economics and

Service, 41 Gogolya St. Vladivostok 690014 Russian Federation)

Summary – The paper provides studies on chemical composition of root and above-ground parts of *Patrinia scabiosifolia*. The plant samples

have been collected and prepared during blossom time, then treated with solvents with increasing polarity. As reported, the main extractive substances from both above-ground and root parts of the plant are essential oils, phenolcarboxylic acids, saponins, and polysaccharides.

Key words: *Patriniascabiosifolia*, essential oils, phenolcarboxylic acids, saponins.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 2, p. 61–63.

УДК 611.36:577.213/.217:546.26:615.244/.3

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНА И ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ СИЛИБИНИНА И ХАУРАНТИНА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ В ПЕЧЕНИ КРЫС

А.В. Кропотов¹, В.П. Челомин², В.В. Слободскова², Е.Е. Солодова¹, А.О. Михайлов¹

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690050, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

² Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43)

Ключевые слова: четыреххлористый углерод, токсический гепатит, генотоксичность, гепатопротекция.

С помощью метода ДНК-комет (микроэлектрофорез ДНК единичной клетки) исследовали индуцированную тетрахлорметаном деградацию ДНК в клетках печени крыс. Показано, что гепатотоксичность, которую оценивали по профилю комет, обусловлена повреждением генома гепатоцитов. Препарат силибинин, полученный из растения расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. – и экстракт из туники асцидии пурпурной – *Halocynthia aurantium* – хаурантин, оказывали гепатопротективное действие. Рассматриваются основные механизмы деструктивного действия тетрахлорметана.

В соответствии с современными принципами лечения заболеваний печени программа комплексной терапии этой патологии включает два основных направления. Первое представляет собой этиотропную терапию, направленную на элиминацию возбудителя и санацию организма; второе направление соответствует патогенетической терапии, имеющей целью фармакологическую коррекцию универсальных, мультифакторных

и разнесенных во времени звеньев патогенеза [2, 10]. Среди патогенетических средств лечения заболеваний печени традиционно выделяют группу гепатопротекторов, преимущественно растительного происхождения, обладающих антиоксидантными свойствами, среди которых нашли широкое применение в клинической гепатологии препараты, созданные на основе расторопши пятнистой (силибинин, силибор, легалон), солянки холмовой (лохеин) и др. [8, 10, 11]. В последние годы на моделях токсического гепатита получены обнадеживающие данные о защитном действии экстрактивных веществ, выделенных из гидробионтов: трепанга японского, карбикулы японской, асцидии пурпурной и др. [4–7]. Прослеживается закономерность: препараты, обладающие стресс-протективной и антиокислительной активностью, как правило, оказывают и гепатозащитное действие [1, 4–7].

Асцидия пурпурная (*Halocynthia aurantium*) – один из пяти объектов, отобранных в процессе скрининга на стресс-модулирующую активность из спиртовых экстрактов 70 видов морских беспозвоночных,

обитающих в заливе Петра Великого Японского моря [3], и, как было установлено в дальнейшем, препараты из асцидии (хаурантин) оказывали мембранопротективное и антистрессовое действие, в том числе при CCl_4 -индуцированном и алкогольном гепатите [4, 5, 7]. Несмотря на обширные токсикологические исследования [5], отсутствуют данные о генотоксичности по отношению к печени как CCl_4 , так и хаурантина.

Цель нашего исследования состояла в экспериментальной оценке влияния четыреххлористого углерода и его комбинаций с силибинином или хаурантином на степень повреждения ДНК (по интенсивности миграции ДНК и длине формирующихся ДНК-комет в индивидуальных клетках) в печени крыс.

Материал и методы. Для эксперимента была выбрана тетрахлорметановая модель острого токсического гепатита, рекомендованная Фармакологическим комитетом РФ как основной тест при скрининге потенциальных гепатозащитных средств [1]. Четыреххлористый углерод является политропным химическим агентом, способным взаимодействовать с различными макромолекулами и структурами клетки, инициировать в печени оксидативный стресс, вызывать колликвационный некроз, белковую и жировую дистрофию гепатоцитов [1, 11]. Опыты были выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 280–320 г. В качестве гепатозащитных средств были изучены: препарат из расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), содержащий силибинин (суспензия, полученная из карсила, Pharmachim Holding EAD, Болгария) и жидкий экстракт из туники асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*), имеющий товарный знак «Хаурантин» (патент № 1522497, приоритет от 08.08.1985, свидетельство на товарный знак № 236689 от 24.05.2001).

Крысы были разделены на четыре группы по 6 особей в каждой:

1-я группа – контрольная; животным в течение 5 дней один раз в сутки подкожно вводили 0,4 мл оливкового масла;

2-я группа – животные, которым в течение 5 дней подкожно вводили 50 % масляный раствор четыреххлористого углерода в дозе 0,4 мл/кг/сут.;

3-я группа – животные, которым наряду с тетрахлорметаном вводили внутривентриально силибинин в дозе 100 мг/кг/сут.;

4-я группа – животные, которым наряду с тетрахлорметаном вводили внутривентриально хаурантин в дозе 0,4 мл/кг/сут.

Обе субстанции вводили крысам за 1 час до применения гепатотоксина. Моделирование CCl_4 -индуцированного гепатита и дозирование гепатозащитных средств осуществляли в соответствии с существующими рекомендациями [1, 4, 5, 11]. Для контроля состояния перекисного окисления липидов в гомогенатах печени с помощью реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой измеряли концентрацию малонового

диальдегида (МДА) – водорастворимого продукта окислительной дегградации жирных кислот [13].

Экспериментальную работу по изучению CCl_4 -индуцированных повреждений структуры молекулы ДНК выполняли на клетках печени крыс. Животных выводили из опыта в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, применяемых для экспериментальных и других научных целей (86/609 ЕЕС) и указом Минздрава СССР от 12.08.1974 г. № 755 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Печень для удаления крови трижды промывали холодным (4 °С) изотоническим раствором, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} (500 мМ NaCl, 12,5 мМ KCl, 5 мМ ЭДТА- Na_2 и 20 мМ Трис-HCl, pH 7,4), затем аккуратно разрезали ножницами на небольшие фрагменты и помещали в 4–5 мл изотонического раствора. Через 30–40 мин инкубации выделившиеся клетки отделяли от фрагментов печени фильтрованием через мельничный газ с диаметром ячеек 40 мкм. Клетки, находящиеся в фильтрате, осаждали центрифугированием и доводили в изотоническом растворе до концентрации 10^5 /мл.

Для оценки влияния CCl_4 на структуру ДНК применяли метод электрофореза единичной клетки (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE), известный в литературе как метод ДНК-комет (Comet Assay). В настоящее время этот метод получил широкое признание и является быстрым и чувствительным инструментом для демонстрации повреждающего действия химических веществ и физических факторов на ДНК на уровне клетки [9, 14]. Образующиеся при повреждении цепей ДНК фрагменты, активно мигрирующие в постоянном электрическом поле от ядра, образуют «хвост», напоминающий комету. По существу комета представляет собой клеточный геном, поскольку в щелочных условиях (при pH более 13) РНК распадается и флуоресцирует только комплекс «ДНК–краситель». В нашем эксперименте длина миграции указывала на присутствие клеток с одноцепочными разрывами в молекуле ДНК.

В работе использовали щелочной вариант кометного анализа [15]. Для этого 50 мкл суспензии клеток добавляли к 100 мкл 1 % легкоплавкой агарозы (LKB, Швеция) в 0,04 М фосфатном буфере (pH 7,4) при 37 °С, тщательно перемешивали, наносили на предметное стекло, предварительно покрытое для улучшения прилипания 1 % раствором агарозы, и накрывали покровным стеклом. Образец на 3 мин помещали в холодильник для образования геля. Покровное стекло осторожно снимали, каждый слайд погружали на 1 час в лизирующий раствор (2,5 М NaCl; 0,1 М ЭДТА- Na_2 ; 1 % Тритон X-100; 10 % ДМСО; 0,02 М трис, pH 10) и помещали в темное холодное место. После промывания холодной дистиллированной водой слайды переносили в электрофорезный буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА- Na_2) и выдерживали 40 мин. Электрофорез проводили при напряжении 2 В/см в течение 15 мин.

После нейтрализации (0,4 М трис-НCl, pH 7,4) слайды окрашивали этидиум бромидом (2 мкг/мл).

Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Для обработки цифровых изображений использовали компьютерную программу CometScore Freeware v. 1.5 (http://www.autocomet.com/products_cometscore.php), которая позволяет вычислить параметры комет, указывающие на степень повреждения клеточной ДНК. В каждой комете определяли три параметра: 1) долю ДНК в хвосте кометы (%DNAt); 2) длину хвоста кометы (Lt) и 3) момент хвоста кометы, который представляет собой произведение длины хвоста кометы (Lt) на долю ДНК в нем (%DNAt).

Во всех группах крыс анализировали по 5 слайдов на животное, на каждом из которых регистрировали не менее 50 комет. Статистическую оценку результатов проводили путем сравнения среднегрупповых показателей поврежденности ДНК с использованием непараметрического критерия Даннета.

Результаты исследования. При анализе картины, образуемой клетками печени после электрофореза, видно, что молекула ДНК клеток печени контрольных крыс формировала симметричное яркое ядро (полость в агарозе, заполненную ДНК) и окружавшего его «гало», представленное вышедшими в агарозу петлями высокополимерной ДНК (рис. 1, а). В то же время в клетках печени экспериментальных крыс, подвергшихся воздействию тетрахлорметана, молекула ДНК образовывала хорошо выраженные кометы, что, очевидно, обусловлено глубокой деградацией генома и миграцией низкополимерных фрагментов ДНК (рис. 1, б). Исходя из классификации, предложенной A.R. Collins et al. в 1995 г., клетки печени контрольных животных формировали кометы, которые можно отнести к двум классам: C0 и C1. Иногда визуально трудно различить кометы этих классов, поэтому их объединяют в одну группу (C0/C1)-комет,

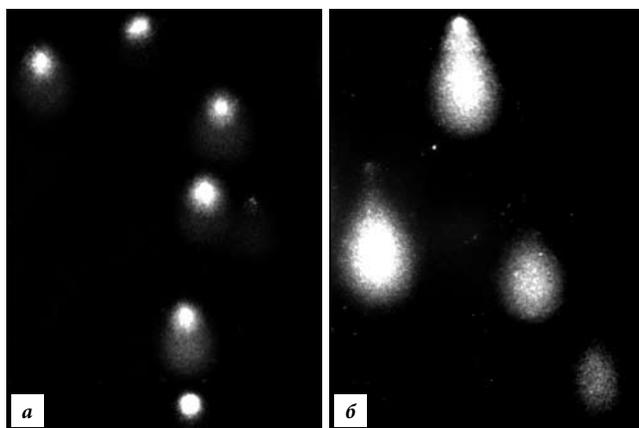


Рис. 1. Микрофотографии «комет», формируемых клетками печени в контрольных (а) и экспериментальных (б) условиях под воздействием CCl_4 .

Таблица

Влияние силимарина и хаурантина на CCl_4 -индуцируемую генотоксичность в печени крыс

Показатель	Группа животных			
	1-я	2-я	3-я	4-я
НАК*, %	7,0	60,0	48,5	47,5
Lt, px	75,4±16,4	232,9±45,4	164,1±49,1	160,2±43,1
%DNAt, %	26,2±11,3	74,8±16,7	60,4±20,7	53,3±18,5

* Некрозоапоптотические клетки.

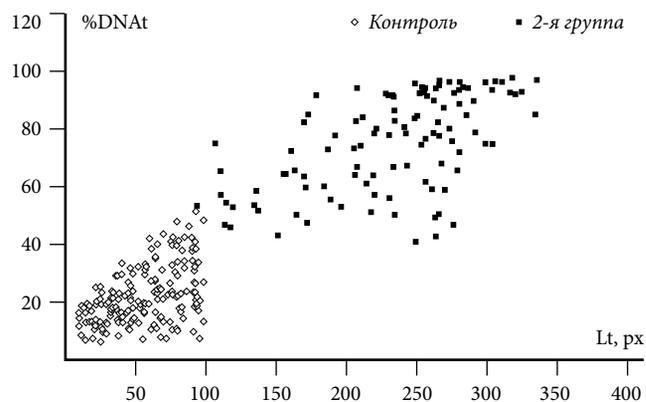


Рис. 2. Корреляция между долей мигрирующей ДНК и длиной хвоста у комет, формируемых клетками печени интактных (контрольных) и экспериментальных крыс, получавших CCl_4 .

характерных для неповрежденных и жизнеспособных клеток. При воздействии CCl_4 у крыс формировались кометы, относящиеся преимущественно к классу C3, что свидетельствовало о высоком уровне фрагментации ДНК.

Расчет параметров комет, отражающих степень повреждения ДНК клеток печени показал, что в клетках экспериментальной группы, которой вводили четыреххлористый углерод, все значения параметров были существенно выше, чем в контроле (табл.). Для наглядности полученные экспериментальные данные, из которых были рассчитаны усредненные значения, представлены в виде зависимости между процентом ДНК и длиной «хвоста» кометы (рис. 2).

В группах животных, которым в сочетании с CCl_4 вводили силибинин или хаурантин (табл. 1), по сравнению с контролем имело место снижение в печени на 16 % доли некрозоапоптотических клеток, уменьшение длины «хвоста кометы» на 71 % и ДНК в «хвосте кометы» на 18 и 28 % соответственно. Все это свидетельствует о генопротективных свойствах исследованных субстанций. Полученные результаты могут быть объяснены с трех позиций: 1) либо силимарин и хаурантин активируют токсикокинетику CCl_4 ; 2) либо индуцируют или защищают биохимические системы репарации ДНК, на подавление которых в группе крыс, получавших CCl_4 , указывает увеличение длины миграции ДНК как отражение числа одноцепочных разрывов; 3) или, что вызывает наибольший интерес,

защитное действие изученных природных соединений связано с их антиоксидантными свойствами.

Обсуждение полученных данных. Сопоставляя полученные результаты, можно говорить о высокой гетерогенности структуры ДНК клеток печени крыс, подвергнутых интоксикации тетрахлорметаном. Таким образом, полученные с помощью метода ДНК-комет экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при воздействии CCl_4 на организм молекула ДНК печени является одной из основных его мишеней.

При объяснении причин генотоксичности тетрахлорметана следует обратить внимание на его способность запускать процессы перекисного окисления липидов и снижать интегральную антирадикальную активность в печени [1, 6, 11]. По мнению некоторых исследователей, именно высокорекреационные оксиданты являются одной из основных причин окислительного повреждения ДНК, вызывая разрывы цепей и модифицируя основания [12]. Так, гидроксильный радикал ($\cdot OH$) способен замещать атомы водорода из остатков сахаров предпочтительно у 4-го углеродного атома.

Образующиеся радикалы нестабильны и в большинстве случаев конвертируются в разрывы цепей с помощью механизмов, хорошо описанных в литературе [14]. Силибинин и другие флаволигнаны обладают достаточно высокой активностью при экспериментальных отравлениях, которая объясняется их антиоксидантным эффектом и подавлением перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов мембран [1, 10, 11]. Так, в нашем опыте под воздействием CCl_4 в печени концентрация МДА увеличивалась по сравнению с контролем на 69 %, при этом силибинин и хаурантин проявляли по этому показателю антиоксидантные свойства, снижая МДА в сравнении с моделью на 34 и 30 % соответственно. Известно также, что хаурантин усиливает активность глутатионзависимых механизмов антиоксидантной защиты, которые при токсическом гепатите снижены [5, 6]. Полученные результаты дают основание полагать, что одним из ведущих механизмов генотоксичности CCl_4 является окислительный стресс, а выявленные повреждения ДНК следует отнести к наиболее важным проявлениям токсичности.

Метод ДНК-комет позволяет количественно оценивать степень повреждения генома и эффективность гепатозащитных средств. Сравнение фармакологического действия силимарина и биологически активной добавки хаурантина позволяет отнести их к слабым гепатозащитным средствам, оказывающим сходную гепопротективную активность.

Литература

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Ведомости Фармакологического комитета. 1999. № 2. С. 9–12.

2. Гепатиты. Рациональная диагностика и терапия / под ред. Михаэля Фукса. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 240 с.
3. Добряков Ю.И., Брехман И.И. Поиск природных источников физиологически активных веществ из морских организмов // Валеология: диагностика, средства и практика обеспечения здоровья. Владивосток: Дальнаука, 1996. Вып. 3. С. 83–89.
4. Добряков Ю.И., Пономарева Т.И., Добряков Е.Ю. К фармакологии хаурантина // Там же, 2000. Вып. 4. С. 140–151.
5. Добряков Е.Ю. Фармакологические эффекты экстракта из тунки асидии *Halocynthia aurantium*: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2004. 23 с.
6. Кропотов А.В., Челомин В.П., Плаксен Н.В. и др. Антиперекисные эффекты экстракта из трепанга *Stichopus japonicus* // Тихоокеанский медицинский журнал. 2004. № 3. С. 18–20.
7. Кушнерова Н.Ф., Лесникова Л.Н. Влияние хаурантина на процессы восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов после поражения этиловым спиртом // Наркология. 2003. № 5. С. 25–28.
8. Пастушенков Л.В., Лесиовская Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии. Часть II. СПб.: СПбХФИ, 1995. 250 с.
9. Тронов В.А., Полевина Т.А. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применение метода // Цитология. 1996. Т. 38, № 4/5. С. 427–439.
10. Скаун Н.П., Саратиков А.С., Охримович Л.М. Клиническая фармакология гепатопротекторов. Тернополь: Збруч, 1995. 272 с.
11. Шабанов П.Д., Султанов В.С., Лебедев В.А. и др. Эффекты полипропинольного препарата ропрен при токсическом поражении печени и головного мозга у крыс: изучение функционального состояния печени, поведения и метаболизма моноаминов в мозге // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2010. Т. 8, № 3. С. 7–30.
12. Almeida E.A., Bairy A.C.D., Loureiro A.P.M. et al. Oxidative stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage // Comp. Biochem. Physiol. A. 2007. Vol. 146. P. 588–600.
13. Buege J.L., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Methods in Enzymology. Academic Press, 1978. P. 302–310.
14. Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1997. Vol. 131. P. 1–87.
15. Jha A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay // Mitogenesis, 2008. Vol. 23, No. 3. P. 207–221.

Поступила в редакцию 19.04.2011.

ESTIMATING CARBON TETRACHLORIDE TOXICITY AND PROTECTIVE ACTION OF SILIBININ AND HAURANTIN USING DNA-COMET ASSAY IN RAT LIVER

A.V. Kropotov¹, V.P. Chelomin², V.V. Slobodskova², E.E. Solodova¹, A.O. Mikhailov¹

¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² Pacific Oceanological Institute, FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russian Federation)
 Summary – The authors have studied the carbon tetrachloride-induced DNA degradation in liver of rats with DNA-comet assay (microelectrophoresis of DNA in a single cell). As reported, the hepatotoxicity estimated by the comet profile arose from hepatocyte genome damage. Medication Silibinin derived from *Silibium marianum* (L.) Gaertn. and extraction of tunic of *Halocynthia aurantium* – Haurantin exhibited genoprotective action. The paper considers major mechanisms of destructive action of carbon tetrachloride.

Key words: carbon tetrachloride, toxic hepatitis, genotoxicity, liver protection.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 2, p. 63–66.