

УДК 577.115.3:616.36-002—019-085.322:582.998.2

І.М. ЯРЕМІЙ, Н.П. ГРИГОР'ЄВА, І.Ф. МЕЩИНЕН

ВПЛИВ НАСТОЙКИ АРНІКИ ГІРСЬКОЇ НА СТАН ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ТА ЗАХИСНОЇ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ

Изучали влияние настойки арники горной на состояние пероксидного окисления липидов и активность защитной глутатионовой системы печени крыс в условиях экспериментального токсического гепатита. Показано, что уже в ранние сроки после поражения организма четыреххлористым углеродом в печени происходят значительные биохимические изменения, связанные с нарушением структуры и функций клеточных мембран (резкое увеличение содержания всех молекулярных продуктов пероксидного окисления липидов, истощение запасов восстановленного глутатиона, изменение активности глутатионзависимых ферментов). Пероральное введение интоксцированным животным настойки арники горной в течение двух недель способствует нормализации исследуемых показателей в печени крыс.

Отруєння організму тетрахлорметаном супроводжується посиленням процесів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), що призводить до деструкції клітинних мембран і утворення токсичних метаболітів: радикалів ліпідів, гідропероксидів, дієнових кон'югатів, кетодієнів, спряжених триєнів та малонового діальдегіду [1, 2]. Ці продукти ПОЛ можуть вступати в реакції з новими молекулами ліпідів. Такий каскадоподібний механізм утворення шкідливих продуктів зумовлює порушення структури та функції клітинних мембран [3, 4, 5]. Стабілізації процесів ліпопероксидації за патологічного стану досягають шляхом введення в організм екзогенних антиоксидантів, зокрема рослинного походження [2, 6]. До них належать флавоноїди, β -каротин, вітаміни А, Е та С, есенціальні жирні кислоти, сесквітерпени. Значна кількість таких біологічно активних речовин міститься у настійці з суцвіть арніки гірської [7].

Враховуючи актуальність проблеми нами досліджено вплив спиртової настійки арніки гірської на ПОЛ та стан захисної глутатионові системи печінки білих щурів за умов експериментального токсичного гепатиту.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 64 білих безпородних щурах з масою тіла 160 ± 5 г, виведених в умовах і на раціоні віварію. Токсичний гепатит у тварин викликали шляхом дворазового введення їм через день внутрішньощлунково чотирьохлористого вуглецю (CCl_4) із розрахунку 0,25 мл 50%-го олійного (маслинового) розчину на 100 г маси тіла. Тваринам, яких лікували, перорально вводили настійку арніки гірської у дозі 20 мкл/100 г їхньої маси протягом 14 діб після останнього введення.

ня CCl_4 [7]. Дозу препарату розраховували на основі встановлених раніше *in vitro* даних [7, 8] про мембраностабілізуючу і антидотну властивості настойки. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 1, 3, 7 та 14 діб після початку експерименту. Печінку охолоджували і використовували для приготування 5%-го гомогенату на 0,05 М трис-НСІ-буфері (рН 7,4). Гомогенат центрифугували (3000 об/хв, 10 хв). В отриманому супернатанті визначали вміст сполук із ізольованими подвійними зв'язками (ІПЗ), дієнових кон'югатів (ДК), кетодієнів (КД) та спряжених трисенів (СТ) за методами, описаними в роботі [1]. Кількість малонового діальдегіду (МДА) оцінювали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [3], активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФД) та глутатіонредуктази (ГР) — за описаними раніше методами [9]. Активність глутатіон-S-трансферази (ГТ) визначали за кількістю кон'югату глутатіону (КГ) з 2, 4-динітрохлорбензолом [10], глутатіонпероксидази (ГП) — за кількістю окисленого глутатіону [11]. Визначення вмісту відновленого глутатіону (ВГ) проводили методами титрування KIO_3 [12], білка — біуретовим методом [13].

Отримані експериментальні дані обробляли на комп'ютері використовуючи *t*-критерій Стьюдента [14].

Результати та обговорення

Як свідчать результати проведених досліджень (табл. 1), вже через 24 год після введення тваринам CCl_4 у печінці відбувається істотне збільшення кількості первинних та проміжних молекулярних продуктів ПОЛ. Отже, в ранні строки отруєння організму в печінці щурів спостерігаються суттєві біохімічні зміни, пов'язані з порушенням структури та функції клітинних мембран. Через 3 доби після введення щурам CCl_4 вміст всіх молекулярних продуктів ПОЛ підвищується максимально, якщо порівняти з інтактними тваринами: кількість продуктів ІПЗ, ДК, КД, СТ та МДА зростає в 1,5, 1,6, 1,6 1,6 та 2,4 раза відповідно. Під впливом настойки арніки гірської у печінці лікованих тварин дещо зменшується кількість проміжних продуктів ПОЛ у порівнянні з нелікованими та намічається чітка тенденція до нормалізації досліджуваних показників.

На 7-у добу експерименту в печінці нелікованих тварин зменшується вміст всіх молекулярних продуктів ПОЛ, тобто спостерігаються процеси самоодуження. Введення тваринам на фоні інтоксикації організму досліджуваного препарату протягом трьох днів, значно зменшує вміст продуктів ПОЛ у печінці. Настойка арніки гірської повністю нормалізує кількість ДК, КД та СТ в організмі (табл. 1).

Через 14 діб основні показники стану процесів пероксидного окислення ліпідів у печінці інтоксикованих CCl_4 тварин знизилися в порівнянні з попередніми строками досліджень, проте вірогідно відрізнялися від таких у тварин контрольної групи (табл. 1). Лікування тварин настойкою арніки гірської сприяє повній нормалізації у печінці кількості молекулярних продуктів ПОЛ в цей період.

Важливу роль у гальмуванні вільнорадикальних процесів в організмі відіграє система глутатіону, яка включає ВГ, а також ферменти, які регенерують глутатіон із окисленої форми у відновну (Г-6-ФД,

Т а б л и ц я 1. Вплив настойки арніки гірської на стан пероксидного окислення ліпідів печінки білих щурів за умов експериментального токсичного гепатиту ($M \pm m$; $n=8$)

Показники	Контроль (інтактні тварини)	Кількість днів після інтоксикації тварин							
		1	3		7		14		
			Н**	Г+А***	Н	Г+А	Н	Г+А	
ПЗ (A_{325})/г тварини	38,29±2,14	44,9±4,23*	58,52±5,31*	51,14±2,17*	50,77±3,61*	45,20±3,01*	44,00±4,15*	37,42±2,73	
ДК (A_{325})/г тварини	22,37±1,9	26,2±1,01*	35,19±2,73*	30,12±2,64*	30,37±1,94*	26,31±1,98	26,28±2,67*	21,57±2,71	
КД, СТ, (A_{325})/г тварини	12,8±0,90	10,9±0,94*	21,28±0,72*	18,53±0,63*	15,24±0,72*	12,92±1,02	12,26±1,15	10,65±0,89	
МДА мкмоль/г тварини	39,8±4,12	40,6±5,70	93,13±6,17*	92,72±7,12*	65,81±7,16*	60,13±5,35*	45,64±4,36*	38,06±5,12	

* Різниця між контролем і дослідними групами вірогідна, $p < 0,05$;

** Н (неліковані тварини); ***Г+А (тварини, ліковані настояшкою арніки гірської)

ГР) або виконують захисні функції (ГП, ГТ). Глутатионова система захищає організм від шкідливої дії пероксиду водню та ліпопероксидів, вона бере участь в інактивації найрізноманітніших за хімічною природою ксенобіотиків [15–18].

На ранніх етапах отруєння тварин (перша доба після інтоксикації CCl_4) спостерігається значне використання ВГ у печінці щурів і гальмування активності ферментів його регенерації. Так, вміст ВГ на 1-у добу експерименту у печінці тварин після інтоксикації зменшується у порівнянні з контролем у 1,8 раза, активність ГР, Г-6-ФД, ГТ знижується на 70, 48 та 50% відповідно (табл. 2).

На 3-ю добу експерименту, коли активність процесів вільнорадикального окислення у печінці набуває максимального рівня, проявляються захисні властивості глутатионової системи. У нелікованих тварин вміст ВГ у печінці щурів на цей період зростає порівняно з контролем у 1,65 раза, активність ГР — на 25%, Г-6-ФД — на 36%.

Першою на отруєння організму реагує ГП — вже на 1-у добу після інтоксикації тварин її активність у печінці підвищується у порівнянні з контролем на 24%, продовжуючи зростати до 3-ї доби; різниця з контролем становить 29% (табл. 2). Можливо, вміст ВГ у печінці щурів на 1-у добу експерименту зменшується відносно контролю внаслідок підвищення активності ГП, яка використовує його як косубстрат.

Вміст ВГ у печінці на 3-ю добу після отруєння тварин CCl_4 зростає у порівнянні з такими показниками на 1-у добу майже в 3 рази. Це може бути зумовлено його відновленням із окисленої форми, а також з процесами біосинтезу ВГ, оскільки в цей період активність Г-6-ФД та ГР збільшується тільки в 2 рази.

Використання ВГ у процесах знешкодження ксенобіотиків в умовах інтоксикації тварин чотирихлористим вуглецем обмежене. Так, активність ГТ у печінці щурів різко знижується вже на 1-у добу експерименту (в 2 рази) і повільно відновлюється у процесі одужання тварин без лікування — на 14-у добу експерименту вона залишається нижче контролю на 26% (табл. 2).

Т а б л и ц я 2. Вплив настойки арніки гірської на стан глутатіонової системи печінки білих щурів за умов експериментального токсичного гепатиту ($M \pm m$; $n=8$)

Показники	Контроль (інтактні тварини)	Кількість діб після інтоксикації тварин						
		1	3		7		14	
			Н**	Г+А***	Н	Г+А	Н	Г+А
ВГ, ммоль/г тканини	7,23±0,31	4,03±0,36*	11,96±0,44*	12,56±0,33*	9,13±0,29*	8,44±0,34*	6,16±0,21*	7,40±0,28
Г-6-ФД, нмоль NADPH'/хв на 1 мг білка	5,49±0,45	6,43±0,54*	12,93±0,46*	12,04±0,21*	11,24±0,42*	10,02±0,35	9,42±0,44	9,21±0,46
ГР, нмоль NADPH'/хв на 1 мг білка	3,96±0,28	2,33±0,16*	4,97±0,21*	5,15±0,19*	4,54±0,28*	4,40±0,36*	4,26±0,14*	4,01±0,18
ГП, ім окислювального глутатіону/хв на 1 мг білка	475±26	592±44*	615±38*	615±44*	617±36*	484±18	513±18	481±34
ГТ, нмоль КГ/хв на 1 мг білка	57,43±2,68	27,97±1,74*	41,13±1,86*	46,35±1,07*	42,28±2,12*	49,02±1,19*	45,56±2,68*	55,94±1,47

* Різниця між контролем і дослідними групами вірогідна, $p < 0,05$; ** Н (неліковані тварини); *** Г+А (тварини, ліковані настойкою арніки гірської)

Отже, токсичний гепатит супроводжується глибокими змінами оксидантно-антиоксидантного статусу організму. Інтоксикація тварин CCl_4 призводить до посилення вільнорадикальних процесів в організмі, що зумовлює накопичення у печінці молекулярних продуктів ПОЛ, різке пригнічення активності ферментів глутатіонової системи в ранні строки захворювання та часткове відновлення їхньої активності у віддалені строки. Проведені нами дослідження показали, що у разі експериментального токсичного гепатиту настойка арніки гірської гальмує швидкість утворення продуктів ПОЛ у печінці тварин та нормалізує активність ферментів глутатіонової системи.

На лікувальні властивості екстрактів арніки гірської за токсичних уражень печінки вказує Марчишин [19], який спостерігав відновлення активності амінотрансфераз та лужної фосфатази у разі дії препарату на інтоксикованих тварин. Гепатопротекторну дію поліфенольних препаратів, відмічено також у дослідях Венгеровського та ін. [20].

У дослідях, проведених нами в умовах *in vitro* [7, 8], було встановлено антиоксидантні властивості настойки арніки гірської та її здатність стабілізувати стан мембран. Мембраностабілізуюча та антиоксидантна дія її, ймовірно, залежить від наявності в складі настойки значної кількості антиоксидантів прямої дії, зокрема флавоноїдів, які здатні зв'язувати вільні радикали, а також від впливу її компонентів на підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту організму.

I.M. Yaremy, N.P. Grygorieva, I.F. Meshchishen

EFFECT OF *ARNICA MONTANA* ON THE STATE OF LIPIDS PEROXIDATION AND PROTECTIVE GLUTATHIONE SYSTEM OF RAT LIVER IN CASE OF EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS

S u m m a r y

Effects of Tinctura Arnica on lipids peroxidation and on the protective glutathions system of liver in rats in case of experimental toxic hepatitis have been studied. Toxic hepatitis is accompanied by deep alterations of the oxidant-antioxidant status of the body. Intoxication of the body by CCl_4 results in intensification of the free radicals formation particularly in liver: accumulation of lipids peroxidation molecular products, glutathione system enzyme activity inhibition in early terms and its partial restoration in remote terms has been seen. Our studies revealed that *Arnica montana* infusion inhibits the rate of lipids peroxidation products formation, affects the glutathione system enzymes activity.

Bukovinien State Medical Academy, Chernivtsi

1. Печенюк И.В., Мешишен И.Ф., Григорьева Н.Ф. // Хим. фарм. журн. — 1994. — 28, № 7. — С.21-29.
2. Скакун Г.Т., Писько И.П., Мосейчук В.М. / Поражение печени четыреххлористым углеродом. Обзорн. инф. М.: НИИТЭХИМ, 1989. — 105 с.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах — М.: Наука. — 1972. — 252 с.
4. Губский Ю.И. Молекулярные механизмы повреждения мембран гепатоцитов при экспериментальном поражении печени: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — Киев, 1983. — 38 с.
5. Логинков А.С., Матюшин В.Н. // Архив патологии. — 1991. — 53, № 6. — С.75-79.
6. Halliwell B., Gutteridge J.M. // Lancet. — 1984. — № 1. — P.1396-1397.
7. Мешишен И.Ф., Волошин О.Г., Яремій І.М. // Ден. у ДНТБ України 25.11.95, № 2467—Ук95, Чернівці, 1995. — 16 с.
8. Яремій І.М., Мешишен И.Ф., Волошин О.Г. *in*. // Фарм. журн. — 1997. — № 2. — С.90-93.
9. Мешишен И.Ф. // Укр. биохим. журн. — 1982. — 54, N 4. — С.452-454.
10. Habig W.H., Pabst M.L., Jakoby W.B. // J. Biol. Chem. — 1974. — 249, N 22. — P.7130-7139.
11. Власова С.Н., Шабукина Е.И., Пересизина И.А. // Лаб. дело. — 1990. — № 8. — С.19-21.
12. Мешишен И.Ф., Петрова И.В. // Укр. биохим. журн. — 1983. — 55, № 5. — С.571-573.
13. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высш. школа, 1980. — 272 с.
14. Проданчук Н.Г., Дейнека С.Е., Вильшанский Е.А. // Актуальные проблемы лекарственной токсикологии. — 1990. — 42. — С.236.
15. Meister A., Anderson M.E. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — 52. P.711-760.
16. Quintilliani M. // Sulfur—Cent. React Intermediates Chem. and Biol. — New York, London, 1990. — P.435-443.
17. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Успехи биол. химии. — 1990. — 31, вып. 1. — С.157-179.
18. Мешишен И.Ф. Механизм действия четвертичных аммониевых соединений (этония, тиония, додекония и их производных) на обмен веществ в норме и патологии: Автореф. дис... д-ра биол. наук. — К., 1991. — 37 с.,
19. Марчишин С.М. // Фармокология и токсикология. — 1983. — 46, № 2. — С.102-106.
20. Венгеровский А.И., Батурина Н.О. Чучалин В.С. и др. // Хим.-фармацевт. журн. — 1996. — 30, № 1. — С.3-4.

Буковинська державна медична академія, Чернівці

Одержано 19.06.1997