

Levitsky A. P., Makarenko O. A., Khodakov I. V., Lukanin A. S., Lukanina M. A. Гепатопротекторные свойства полифенольных веществ экстракта «Дубовый» = Hepatoprotective properties of polyphenols substances of Oak extract. Journal of Education, Health and Sport. 2016;6(11):537-547. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.192393>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4039>
<https://pbn.nauka.gov.pl/sedno-webapp/works/762135>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 755 (23.12.2015).
755 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2016;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 02.11.2016. Revised 22.11.2016. Accepted: 30.11.2016.

УДК 615.07+615.015+616.98

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ЭКСТРАКТА «ДУБОВЫЙ»

А. П. Левицкий¹, О. А. Макаренко¹, И. В. Ходаков¹,

А. С. Луканин², М. А. Луканина³

¹ГУ «Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной академии медицинских наук Украины» (г. Одесса) E-mail: flavan@mail.ru

²Лаборатория мониторинга сырьевых ресурсов для виноделия (г. Киев)

³ГП «Государственный центр сертификации и экспертизы сельскохозяйственной продукции Минагрополитики Украины» (г. Киев)

Резюме

Экстракт «Дубовый» обладает гепатопротекторным действием при токсическом гепатите.

Ключевые слова: гепатит, полифенолы дуба, гепатопротектор, ферменты, липиды.

HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF POLYPHENOLS SUBSTANCES OF OAK EXTRACT

A. P. Levitsky, O. A. Makarenko, I. V. Khodakov, A. S. Lukanin, M. A. Lukanina

¹SE «The Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery of the NAMS of Ukraine»
(Odessa, Ukraine) flavan@mail.ru

²The Laboratory of monitoring of raw materials for wine-making (Kiev, Ukraine)

³The state of certification and expertise agriculture products of Ministry of
agropolitics (Kiev, Ukraine)

Summary

Purpose of work: To determine of hepatoprotective properties of oak extract.

Materials and methods: The oak extract, wich contained 1,3 % polyphenols, was used. The hepatoprotective properties were determined using rats with hydrazine hepatitis. The oak extract was introduced in dose of 10 ml/kg from the first day of the experiment during 13 days. The liver state was estimated by inflammation indices (elastase, MDA) index of microbe sowing (urease), index of non-specific immunity (lysozyme), index of cholestasis (alkaline phosphotase, ALPh). The liver markers (bilirubine, ALT, ALPh) were determined into serum. The levels of triglycerides and total cholesterine were determined into liver and serum.

Results: The oak extract reduced of inflammation indices, the activaties of urease, ALPh into liver and the degree of dysbiosis into liver and serum.

The conclusion: The oak extract has hepatoprotective action.

Key words: **hepatite, polyphenols of oak, hepatoprotectore, enzymes, lipids.**

Введение

Экстракт «Дубовый» представляет собой раствор, содержащий фенольные соединения, извлеченные из древесины дуба по особой технологии [1]. На него оформлена техническая документация (ТУ У 15.8-19412998.004:2011) и получено разрешение Минздрава Украины на применение в пищевой промышленности (Гигиеническое заключение МЗУ № 05.03.02-06/88168 от 01.09.2011 г.). Выпускает экстракт «Дубовый» ООО «Серсиаль» (Украина).

Целью настоящего исследования стало определение гепатопротекторных свойств экстракта «Дубовый» с учетом содержания в нем полифенольных соединений, обладающих, как известно, антиоксидантными свойствами.

Материалы и методы исследования

Экстракт «Дубовый» был предоставлен ООО «Серсиаль». Содержание сухих веществ в нем составляло 6,35 %. Анализ полифенолов проводили методом ВЭЖХ на хроматографической системе Shimadzu (Япония) с использованием обращено-фазовой колонки Microsorb-MV C18 (длина 150 мм, диаметр 4,6 мм, зерно сорбента 5 мкм). Элюент – система метанол и 0,9 %-ный водный раствор фосфорной кислоты. Режим хроматографирования – градиентный, разработан для разделения фенольных кислот и флавоноидов [2, 3].

Идентификацию веществ в исследуемых экстрактах проводили путем сравнения времени удерживания и спектральных характеристик исследуемых веществ с аналогичными характеристиками стандартов. Спектральные характеристики веществ и степень сходства их со стандартными определяли на основе результатов сканирования экстрактов при 225, 255, 286 и 350 нм в соответствии со способом [3]. Использовали следующие внешние стандарты: хлорогеновая и кофейная кислоты, катехин, флавонолы кверцетин, рутин и мирицетин, флаваноны нарингенин, нарингин и гесперетин, гесперидин, флавоны лютеолин и апигенин (Sigma-Aldrich, США).

Идентификационные характеристики перечисленных стандартов получали при описанных выше условиях хроматографирования. Калибровочные зависимости «площадь пика – содержание» имели линейный вид с точностью не ниже $r^2=0.994$.

Определение содержания веществ с установленной принадлежностью к конкретным группам флавоноидов проводили с использованием стандартов, степень сходства с которыми была наибольшая, с учетом химической формы вещества (агликон, гликозид). Вещества, степень сходства которых с каким-либо стандартом была ниже 70 %, относили к группе неидентифицированных веществ, а их содержание определяли по стандартам, степень сходства с которыми была наибольшая.

Антиоксидантные свойства экстракта оценивали по антирадикальной (АРА) и хелатирующей (ХА) активности [4, 5]. В качестве препаратов сравнения были использованы «Экстравин» (водно-спиртовой экстракт из виноградной выжимки, ТУ У 15.8-34737476-001:2007), настойка софоры (UA/0366/01/01; ЗАО «Фармфабрика «Вола», г. Запорожье) и зубное полоскание «Стоматофит».

Гепатопротекторные свойства определяли на белых крысах линии Вистар (самки, 7 месяцев, средняя живая масса 216 ± 11 г), у которых воспроизводили токсический гепатит с помощью гидразин сульфата [6], который вводили в/брюшинно в дозе 50 мг/кг на 8-й, 9-й и 10-й дни опыта. Всего была использована 21 крыса, которых

распределили в 3 группы: 1-ая – контроль (норма, интактные); 2-ая – токсический гепатит и 3-я – токсический гепатит, которая получала с первого дня опыта с питьевой водой экстракт «Дубовый» в дозе 10 мл/кг.

Умерщвление животных осуществляли на 15-й день опыта под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца. Получали сыворотку крови и иссекали часть печени. В гомогенате печени определяли уровень биохимических маркеров воспаления [7]: содержание малонового диальдегида (МДА) [8] и активность лейкоцитарного фермента эластазы [7], активность уреазы (показатель микробного обсеменения) [9], лизоцима (маркер неспецифического иммунитета) [10], активность фермента каталазы [7] и щелочной фосфатазы (ЩФ) [7].

В сыворотке крови определяли уровень биохимических маркеров поражения печени [11]: содержание общего билирубина [12], активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) [13] и ЩФ. Кроме того, в сыворотке крови определяли активность уреазы и лизоцима, по соотношению относительных активностей которых рассчитывали ферментативный показатель степени дисбиоза [14].

О состоянии липидного обмена судили по содержанию триглицеридов (ТГ) и общего холестерина (ОХ) в печени и в сыворотке крови [15].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием стандартных методов [16].

Результаты и их обсуждение

Типичная хроматограмма полифенольных веществ, которые содержатся в водном экстракте «Дубовый», представлена на рис. 1. Из этих данных видно, что в экстракте содержатся катехины, флавононы и флавонолы, однако большую часть (более 70 %) составляют неидентифицированные соединения (табл. 1).

Таблица 1

Содержание полифенолов в экстракте «Дубовый»

Полифенолы	Содержание, г/кг сух. в-в
Катехины	12,2
в т. ч. катехин	0,16
Флавонолы	0,55
в т. ч. рутин	0,25
Флавононы	40,6
Флавоны	0,18
Неидентифицированные полифенолы	132,2
Сумма полифенолов	185,7

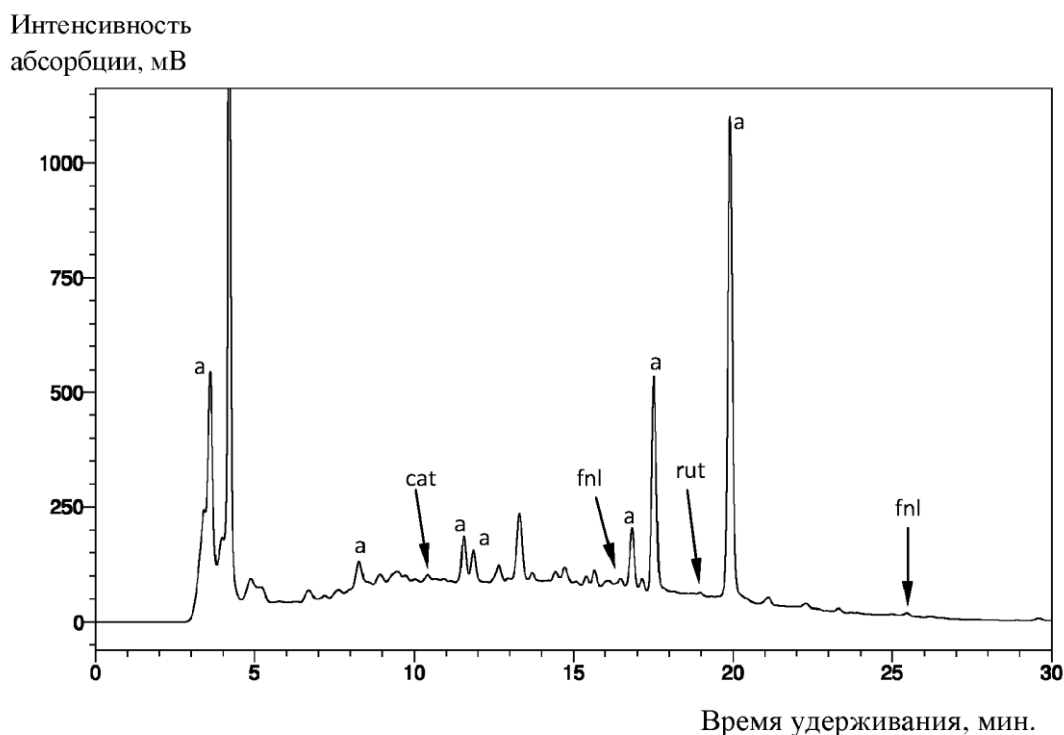


Рис. 1. Хроматограмма водного экстракта из древесины дуба при 255 нм (cat – катехин, rut – рутин (рутинозид кверцетина), fnl – флавонолы, а – неидентифицированные полифенолы. Остальные пики по спектральным характеристикам соответствуют катехинам и флавононам)

Результаты анализа антиоксидантных свойств полифенолов экстракта «Дубовый» представлены на рис. 2, из которого видно, что по антирадикальной активности (АРА) экстракт «Дубовый» значительно превосходит все остальные испытанные препараты, хотя по хелатирующей способности (ХА) он уступает этим препаратам. Тем не менее, именно АРА вносит наибольший вклад в суммарную оценку антиоксидантных свойств [5].

В таблице 2 представлены результаты определения в печени крыс, получавших гидразин, ряда биохимических показателей, свидетельствующих о развитии воспаления (повышение активности эластазы на 29 % и содержания МДА на 16 %), холестаза (повышение активности ЩФ на 177 %), снижении неспецифического иммунитета (снижение активности лизоцима на 28 %) и повышении микробной обсемененности (увеличение активности уреазы на 16 %). Введение в течение 2-х недель экстракта «Дубовый» нормализовало практически все биохимические показатели.

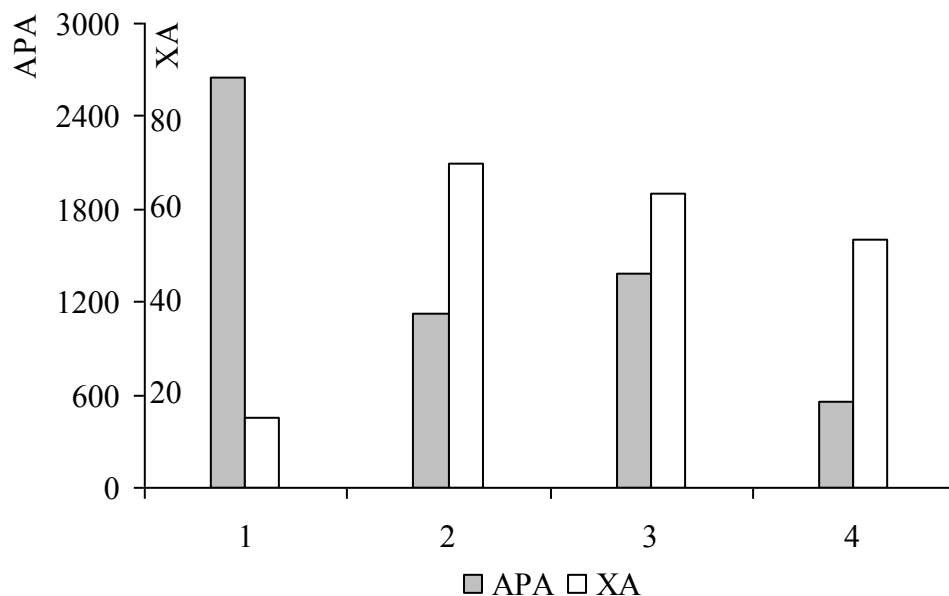


Рис. 2. Сравнительные антиоксидантные свойства экстракта «Дубовый»
 (1 – экстракт «Дубовый», 2 – «Экстравин», 3 – настойка софоры, 4 – «Стоматофит»)
 АРА – антирадикальная активность, ХА – хелатирующая активность

Таблица 2

Влияние экстракта «Дубовый» на биохимические показатели печени крыс
 с токсическим гепатитом (M±m, n=7)

Показатели	1 гр.	2 гр.	3 гр.
	Контроль	Гепатит	Гепатит + экстракт
МДА, ммоль/кг	105,6±8,1	122,5±4,8 p>0,05	101,1±8,1 p>0,3; p ₁ <0,05
Эластаза, мк-кат/кг	198,4±9,9	255,6±12,4 p<0,05	205,1±8,3 p>0,3; p ₁ <0,05
Уреаза, мк-кат/кг	1,89±0,10	2,20±0,22 p>0,05	1,72±0,10 p>0,05; p ₁ <0,05
Лизоцим, ед/кг	76±6	55±5 p<0,05	71±9 p>0,3; p ₁ >0,05
Каталаза, мкат/кг	6,42±0,12	6,29±0,09 p>0,3	6,33±0,06 p>0,3; p ₁ >0,5
ЩФ, мк-кат/кг	1,46±0,27	4,05±0,21 p<0,01	2,55±0,31 p<0,05; p ₁ <0,01

Примечание: p – в сравнении с гр. 1; p₁ – в сравнении с гр. 2.

Развитие токсического гепатита после введения гидразин сульфата подтверждается и данными, представленными в таблице 3, из которой видно, что

уровень всех печеночных маркеров в сыворотке достоверно повышается: содержание билирубина на 40 %, активность АЛТ на 85 % и активность ЩФ более чем в 4 раза. Введение экстракта «Дубовый» снизило все эти показатели, однако не до нормы.

Таблица 3

Влияние экстракта «Дубовый» на уровень «печеночных» маркеров в сыворотке крови крыс с токсическим гепатитом ($M \pm m$, $n=7$)

Показатели	1 гр.	2 гр.	3 гр.
	Контроль	Гепатит	Гепатит + экстракт
Билирубин общий, мк-моль/л	2,38±2,24	3,33±0,15 $p < 0,05$	3,01±0,30 $p > 0,05$; $p_1 > 0,3$
АЛТ, мк-кат/л	0,39±0,05	0,72±0,04 $p < 0,01$	0,50±0,01 $p < 0,05$; $p_1 < 0,05$
ЩФ, мк-кат/кг	1,60±0,11	6,56±0,40 $p < 0,01$	4,17±0,48 $p < 0,01$; $p_1 < 0,05$

Примечание: см. табл. 2.

На рис. 3 показан характер изменения ферментативного показателя степени дисбиоза в печени и в сыворотке крови, который свидетельствует об антидисбиотическом действии экстракта «Дубовый»: снижение степени дисбиоза в печени на 40 % и в сыворотке крови на 38 %.

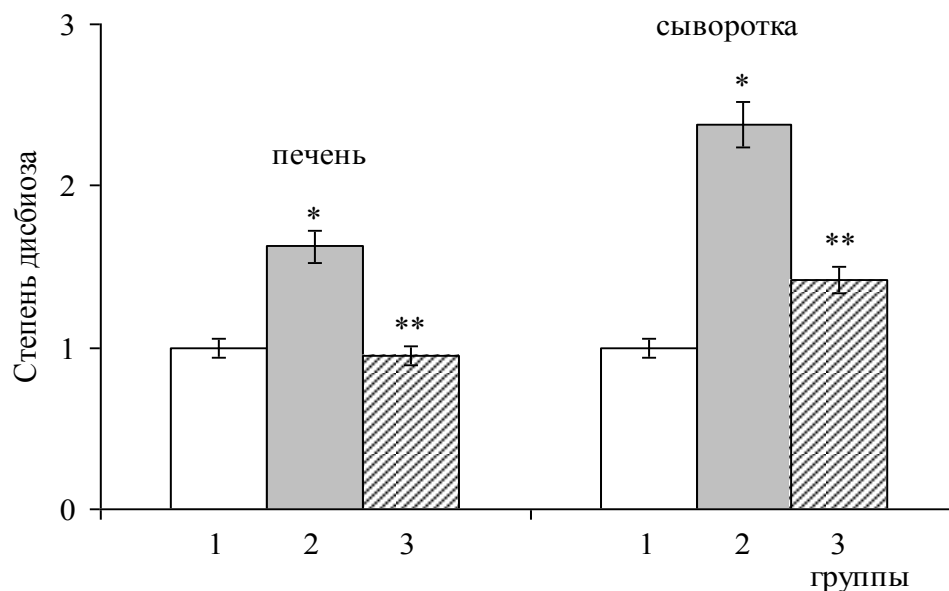


Рис. 3. Влияние экстракта «Дубовый» на степень дисбиоза у крыс с токсическим гепатитом

(1 – контроль, 2 – гепатит, 3 – гепатит + экстракт)

*– $p < 0,05$ в сравнении с гр. 1, **– $p < 0,05$ в сравнении с гр. 2.

Таким образом, проведенное нами исследование показало выраженные гепатопротекторные свойства экстракта «Дубовый», обусловленные, прежде всего, его высокой антиоксидантной активностью и выраженным антидисбиотическим действием. Возможно, именно полифенольные соединения, содержащиеся в древесине дуба и затем переходящие в марочные вина и в коньяки, определяют их высокие не только органолептические, но и гепатопротекторные свойства.

Таблица 4

Влияние экстракта «Дубовый» на содержание триглицеридов (ТГ) и холестерина (Х) в печени и в сыворотке крови крыс с токсическим гепатитом ($M \pm m$, $n=7$)

Показатели	1 гр.	2 гр.	3 гр.
	Контроль	Гепатит	Гепатит + экстракт
<u>Печень</u>			
ТГ, ммоль/кг	8,00±0,22	11,58±0,31 p<0,001	9,80±0,54 p<0,05; p ₁ <0,05
Х, ммоль/кг	6,69±0,28	8,66±0,32 p<0,01	7,51±0,41 p>0,05; p ₁ >0,05
<u>Сыворотка крови</u>			
ТГ, ммоль/л	0,49±0,10	1,27±0,21 p<0,05	1,00±0,18 p<0,05; p ₁ >0,3
Х, ммоль/л	1,12±0,05	1,62±0,14 p<0,05	1,25±0,07 p>0,05; p ₁ <0,05

Примечание: см. табл. 2.

Выводы

1. Экстракт «Дубовый» содержит большое количество полифенольных веществ (более 18% от суммы экстрактивных веществ).
2. Экстракт «Дубовый» обладает высокой антиоксидантной активностью.
3. Экстракт «Дубовый» оказывает гепатопротекторное действие при токсическом гепатите.
4. В гепатопротекторном действии экстракта «Дубовый» существенную роль могут играть не только антиоксидантные, но и антидисбиотические свойства.

Литература

1. http://quercus.com.ua/ekstrakt_duboviy.html
2. Левицкий А. П. Методы исследования жиров и масел / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. В. Ходаков. – Одесса: КП ОГТ, 2016. – 32 с.
3. Ходаков И. В. Способ идентификации полифенолов в растительных экстрактах

при помощи ВЖХ. Определение состава изофлавонов сои / И. В. Ходаков // Методы и объекты химического анализа. – 2013. – т. 8, № 3. – С. 132-142.

4. Nadaroglu H. Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris Germanica* / H. Nadaroglu, I. Demir, N. Demir // Хим.-фарм. журнал. – 2007. – т. 41, № 8. – С. 13-18.

5. Макаренко О. А. Биохимические механизмы остеотропного действия флавоноидов: Автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.00.04 – биохимия / Макаренко Ольга Анатольевна. – Одесса, 2011. – 40 с.

6. Пустовойт П. И. Клинико-экспериментальное обоснование применения ингибиторов протез при заболеваниях желчевыводящих путей: Дис. ... кандидата мед. наук / Пустовойт Петр Иванович. – Одесса, 1983. – 210 с.

7. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации / А.П. Левицкий, О.В. Деньга, О.А. Макаренко [и др.] – Одесса, 2010. – 16 с.

8. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили / В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В. Н.) – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

9. Гаврикова Л. М. Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой и одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // Стоматология. – 1996. – Спецвыпуск. – С. 49-50.

10. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.

11. Методические рекомендации по экспериментальному изучению желчегонной, холеспазмолитической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных средств / С. М. Дроговоз, С. И. Сальникова, Н. П. Скакун [и др.]. – К.: ФКМЗ Украины, 1994. – 46 с.

12. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике / А. М. Горячковский. – Изд. 3-е исп. и доп. – Одесса: Экологія, 2005. – 616 с.

13. Reitman S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases / S. Reitman, S. Frankel // Amer. J. Clin. Pathol. – 1957. – v. 28, № 1. – P. 56-63.

14. Патент на корисну модель, Україна 43140, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / Левицький А. П., Деньга О. В., Селіванська І. О. [та ін.]. – Опубл. 10.08.2009, Бюл. № 15.

15. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Под ред. Н. У. Тица. – М.:

Лабинформ, 1997. – С. 128, 459-460.

16. Трухачева Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 379 с.

References

1. http://quercus.com.ua/ekstrakt_duboviy.html
2. Levitsky A. P., Makarenko O. A., Khodakov I. V. Metody issledovaniya zhirov i masel [Methods to investigate fats and oils]. Odessa: KP OGT, 2015: 32.
3. Khodakov I. V. The HPLC method of identification of polyphenols in plant extracts by exemple of determination of isoflavone composition in soy seeds. Metody i ob"ekty khimicheskogo analiza. 2013; 8(3): 132-142.
4. Nadaroglu H., Demir I., Demir N. Antioxidant and radical scavenging properties of Iris Germanica. / Khim.-farm. zhurnal. 2007; 41(8): 13-18.
5. Makarenko O. A. Biokhimicheskie mekhanizmy osteotropnogo deystviya flavonoidov [The biochemical mechanisms of ostetropic effect of flavonoids]. Abstract of dissertation for doctor biology sciences: 03.00.04 – biokhimiya. Odessa, 2011: 40.
6. Pustovoyt P. I. Kliniko-eksperimental'noe obosnovanie primeneniya inhibitorov protez pri zabolevaniyakh zhelchevyvodyashchikh putey [Clinical-experimental substantiation of the use of inhibitors of proteases at the diseases of bile passages: author's abstract of candidate's thesis in medicine]. Candidate's thesis in medicine. Odessa, 1983: 210.
7. Levitsky A. P., Denga O. V., Makarenko O. A. [et al.]. Biokhimicheskie markery vospaleniya tkaney rotovoy polosti: metodicheskie rekomendatsii [Biochemical markers of inflammation of oral cavity tissue: method guidelines]. Odessa, KP OGT, 2010:16.
8. Stalnaya I. D., Garishvili T. G. Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoshchyu tiobarbiturovoy kisloty [The method of revelation of malonic dialdehyde with thiobarbituric acid]. Moskva, Meditsina, 1977: 66-68.
9. Gavrikova L. M., Segen I. T. Urease activity of oral liquid in patients with acute odontogenic infection of maxillo-facial part. Stomatologiya. 1996; The extra issue: 49-50.
10. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.
11. Drogovoz S. M., Sal'nikova S. I., Skakun N. P. [et al.]. Metodicheskie rekomendatsii po eksperimental'nomu izucheniyu zhelchegonnoy, kholespazmoliticheskoy, kholelitiaznoy i gepatoprotekturnoy aktivnosti novykh lekarstvennykh sredstv [Guidelines for the experimental study of the choleric, spasmolytic, cholelitiastic and hepatoprotective activity of new drugs]. Kiev, FKMZ Ukrainy, 1994: 46.

12. Goryachkovskiy A. M. Klinicheskaya biokhimiya v laboratornoy diagnostike [The clinical biochemistry in laboratorial diagnostics] [3rd ed.]. Odessa, Ekologiya, 2005: 616.
13. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases / Amer. J. Clin. Pathol. – 1957. – v. 28, № 1. – P. 56-63.
14. Levitsky A. P., Denga O. V., Selivanskaya I. A. [et al.]. The method of estimation of the degree of dysbiosis (dysbacteriosis) of organs and tissues. Patent of Ukraine 43140. IPC (2009) G01N 33/48. Application number u 200815092. Date of filling: 26.12.2008. Publ.: 10.08.2009. Bul. № 15.
15. Entsiklopediya klinicheskikh laboratornykh testov [The encyclopedia of clinical laboratoric tests]. Red. N. U. Tica. Moskva: Labinform, 1997: 128, 459-460.
16. Truhacheva N. V. Matematicheskaja statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyah s primeneniem paketa Statistica [Mathematical Statistics in biomedical research using application package Statistica]. Moskva, GJeOTAR-Media, 2012: 379.