

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ АЛАНИНАМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПАРЕНХИМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС В ПОСТЦИТОСТАТИЧЕСКИЙ ПЕРИОД

О. Р. Грек¹, С. В. Позднякова¹, А. П. Надеев¹, В. С. Пронин¹, Н. А. Жукова², И. В. Сорокина², Е. Б. Волкова², Т. Г. Толстикова²

На модели экспериментальной цитостатической полихимиотерапии изучено влияние бетулоновой кислоты (БК), ее аланинамидного производного (БК-2β) и аланинамидного производного метилового эфира бетулоновой кислоты (ЭБК-2β) на гистологическую структуру печени крыс. Показано, что изученные агенты значительно уменьшают степень дистрофических и цитолитических повреждений гепатоцитов, усиливают репаративные процессы в паренхиме.

Ключевые слова: бетулоновая кислота, аланинамидные производные бетулоновой кислоты, цитостатическая полихимиотерапия, гепатопротекторные свойства

ВВЕДЕНИЕ

Существенным недостатком противоопухолевых средств является их ограниченная избирательность в отношении опухолевых клеток и связанная с этим высокая общая токсичность. Гепатобилиарная система считается одной из наиболее уязвимых к повреждающему воздействию цитостатиков [2]. Коррекция цитостатической химиотерапии гепатозащитными средствами направлена на повышение ее эффективности.

Большинство известных гепатопротекторов являются растительными препаратами в основном фенольной природы [8]. Однако они часто оказываются недостаточно эффективными в условиях противоопухолевой полихимиотерапии. В связи с этим актуальным является поиск таких агентов среди соединений других химических классов. В последние годы внимание исследователей привлекают тритерпеноиды лупанового ряда. Доступность и высокая биологическая активность этих природных соединений делают их ценным источником для синтеза новых производных и разработки потенциальных лекарственных средств. Показано, что производные бетулина, получаемого из коры березы, обладают избирательным цитостатическим действием на опухолевые клетки [7], противовирусной, иммуностимулирующей, антиоксидантной активностью [4, 5, 11]. В Новосибирском институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова путем синтетических трансформаций бетулина получены бетулоновая кислота (БК), ее аланинамидное производное (БК-2β) и аланинамидное производное метилового эфира бетулоновой кислоты (ЭБК-2β) [6]. Целью данной работы было сравнительное изучение гепатопротекторных

свойств этих агентов на экспериментальной модели цитостатической полихимиотерапии (ПХТ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опыте использовали неинбредных самок крыс массой 180 – 220 г (6 групп по 10 особей в каждой). Всем животным, кроме контрольных (1-я группа), вводили однократно внутривентриально комплекс противоопухолевых препаратов в дозах, равных 1/5 ЛД₅₀, рассчитанных методом пробит-анализа: циклофосфан (“Биохимик”, Саранск) — 21 мг/кг, доксорубин (“ЛЭНС-Фарм”, Москва) — 2,1 мг/кг, винкристин (“Гедеон Рихтер”, Венгрия) — 0,04 мг/кг, преднизолон (“Гедеон Рихтер”, Венгрия) — 2,1 мг/кг массы тела. Через сутки после введения цитостатиков в течение последующих 14 дней крысам вводили внутривентриально воду (1-я и 2-я группы), БК (3-я группа), БК-2β (4-я группа), ЭБК-2β (5-я группа). Отдельная группа животных получала препарат сравнения — диквертин (ДКВ, “Бианон”, Россия). Исследуемые тритерпеноиды и ДКВ вводили в водно-твиновом растворе в дозе 50 мг/кг. На 15-е сутки после введения цитостатических средств животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Для исследования брали ткань печени, фиксировали 10 % раствором нейтрального формалина и далее проводили стандартную обработку материала на автоматическом комплексе MICROM (“Карл Цейс”). Депарафинированные срезы толщиной 5 – 8 мкм окрашивали гематоксилин-эозином по Ван Гизону. Морфометрическое исследование площадей срезов и структурных компонентов ткани печени проводили с помощью окулярной сетки (256 точек) методами стереологического исследования в соответствии с рекомендациями Г. Г. Автандилова [1]. Подсчитывали объемную плотность (V_v) цитоплазмы и ядер гепатоцитов, синусоидальных клеток, зон с дистрофическими и некротическими изменениями гепатоцитов,

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. О. Р. Грек) Новосибирской медицинской академии МЗ РФ.

² Лаборатория фармакологических исследований (зав. — Т. Г. Толстикова) Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, 630090, пр. Лаврентьева, 9.

синусоидов, численную плотность (Nai) двуядерных гепатоцитов.

Статистическую обработку данных проводили методами параметрической статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 15-й день после введения комплекса цитостатиков у животных 2-й группы балочная структура печени в основном сохранялась, однако в ней наблюдались выраженные альтеративные изменения: отек интерстиция, полнокровие вен и значительное сужение синусоидальных капилляров, местами их просвет не определялся. Отмечена гидропическая и баллонная дистрофия гепатоцитов, фокальные микронекрозы, более всего выраженные в центральных отделах долек.

Объемная плотность дистрофических и некротических изменений под влиянием ПХТ во 2-й группе достигала 64,82 и 11,31 % объема паренхимы. У животных этой группы наблюдалось снижение на 46,43 % объемной плотности синусоидов, увеличение на 15,28 % цитоплазмы гепатоцитов, снижение на 20 % ядерно-цитоплазматического отношения по сравнению с контрольной группой. Количество двуядерных гепатоцитов снизилось на 38,63 % (таблица), что свидетельствует о депрессии пролиферативных процессов. Отмеченные выше патологические изменения могли быть вызваны как непосредственным токсическим воздействием цитостатиков на гепатоциты, так и опосредованным гипоксическим повреждением, вследствие нарушения микроциркуляции в печени. Как известно, токсический эффект цитостатиков определяется рядом механизмов: усилением свободнорадикального и перекисного окисления [12], лабильлизацией лизосом [3], нарушением активности моноокси-

геназ печени [13], индукцией в клетках хромосомных aberrаций, белкового и водно-электролитного обмена в гепатоцитах.

В группах животных, которым вводили изучаемые тритерпеноиды, наблюдалось восстановление гистологической картины печени: уменьшение отека, увеличение просвета синусоидов, сокращение количества некротизированных участков, цитолитических повреждений гепатоцитов, количества клеток с пикнотическими ядрами. Отмечено умеренное неравномерное полнокровие сосудов (центральных вен) и синусоидных капилляров преимущественно в центре долек.

Наиболее важными морфологическими показателями, отражающими выраженность деструктивных процессов в печени, являются объемная плотность дистрофических изменений и объемная плотность зон некрозов. Установлено, что изучаемые соединения достоверно уменьшают степень выраженности альтеративных изменений гепатоцитов, вызванных введением комплекса цитостатических препаратов. Введение БК сопровождалось достоверным уменьшением объемной плотности дистрофически измененных гепатоцитов в 11,5 раз относительно второй группы (ПХТ — $64,8 \pm 1,15$ %; БК — $5,6 \pm 0,6$ %, $p < 0,05$). В группах животных, которым вводили пептидные производные БК 2β-аланин (БК-2β) и 2β-аланин метиловый эфир (ЭБК-2β) также наблюдали достоверное снижение объемной плотности дистрофических изменений в 4 и 6,6 раза соответственно, однако по степени выраженности гепатозащитного действия аланинамидных производных уступали БК. Введение БК на фоне ПХТ в 6,6 раза уменьшало показатель объемной плотности некрозов (ПХТ — $11,3 \pm 0,6$ %; БК — $1,7 \pm 0,65$ %, $p < 0,05$). Введение животным после ПХТ пептидных производных (БК-2β и ЭБК-2β) сопровождалось статистически недостоверным сниже-

Результаты морфометрического анализа ткани печени животных в постцитостатический период ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ПХТ	ПХТ + БК	ПХТ + БК-2β	ПХТ + ЭБК-2β	ПХТ + ДКВ
	1	2	3	4	5	6
Цитоплазма гепатоцитов, Vv	$56,92 \pm 1,27$	$65,62 \pm 1,32^1$	$51,58 \pm 1,18^2$	$59,06 \pm 1,35$	$51,89 \pm 1,32^2$	$54,5 \pm 1,33^2$
Ядра гепатоцитов, Vv	$14,71 \pm 0,69$	$13,17 \pm 0,64$	$15,69 \pm 0,59$	$15,89 \pm 0,92$	$17,44 \pm 0,92^2$	$16,67 \pm 0,71$
Ядерно-цитоплазматическое отношение	$0,25 \pm 0,009$	$0,20 \pm 0,01^1$	$0,28 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,02^2$	$0,28 \pm 0,02$
Двуядерные гепатоциты, Nai	$7,74 \pm 0,51$	$4,75 \pm 0,46^1$	$6,46 \pm 0,5$	$6,95 \pm 0,56$	$7,53 \pm 0,60^2$	$4,61 \pm 0,50^1$
Дистрофические изменения гепатоцитов, Vv	$2,78 \pm 0,42$	$64,82 \pm 1,15^1$	$5,63 \pm 0,6^2$	$16,39 \pm 0,77^{1,2,3}$	$16,47 \pm 1,17^{1,2,3}$	$7,12 \pm 0,97^2$
Зоны некрозов, Vv	$1,19 \pm 0,31$	$11,31 \pm 0,60^1$	$1,72 \pm 0,63^2$	$7,36 \pm 1,18^1$	$6,14 \pm 0,68^1$	$4,78 \pm 0,96^2$
Синусоидальные клетки, Vv	$4,00 \pm 1,07$	$2,67 \pm 0,94$	$5,14 \pm 0,65$	$5,58 \pm 0,76$	$8,80 \pm 0,8^{1,2}$	$8,51 \pm 0,74^{1,2}$
Синусоиды, Vv	$25,63 \pm 0,83$	$13,74 \pm 1,40^1$	$31,51 \pm 1,08^2$	$23,22 \pm 0,99^2$	$24,63 \pm 1,26$	$23,50 \pm 0,94^2$

Примечание: ^{1,2,3} — значения, достоверно отличающиеся от соответствующих в данных колонках групп ($p < 0,05$). Объемные плотности, Vv — %; численные плотности структур, Nai — количество структур в тестовой площади.

нием объемной плотности некрозов. Таким образом, по степени влияния на деструктивные изменения гепатоцитов БК была близка к ДКВ (таблица). Согласно данным, представленным в таблице, все изученные тритерпеноиды, также как и референс-препарат, восстанавливали до нормы объемную плотность синусоидов. Нормализация структуры печени у животных, леченных БК и ее производными, сопровождалась увеличением объемной плотности ядер при сохранении нормальной плотности цитоплазмы, что привело к достоверному повышению ядерно-цитоплазматического отношения в этих группах. Полученные результаты указывают на усиление синтетических процессов в клетках печени, что свидетельствует о повышении их функциональной активности. В связи с этим обращает на себя внимание, что ЭБК-2β в большей степени, чем другие агенты и ДКВ, увеличивал ядерно-цитоплазматическое отношение и количество двуядерных гепатоцитов и, тем самым, проявил высокую активность.

Обнаруженное нами гепатопротекторное действие БК и двух ее аланинамидных производных, возможно, реализуется по нескольким механизмам. В частности, противовоспалительный эффект может быть подобен действию глюкокортикоидов, так как структурно тритерпеноиды близки к стероидным гормонам млекопитающих. С другой стороны, несомненно, существенный вклад в их гепатопротекторный эффект вносят антиоксидантные свойства этих соединений. Ранее показано, что пептидные и дипептидные производные БК ингибируют инициированное окисление метилолеата в реакциях с алкильными радикалами [10]. Эти данные коррелируют с результатами, полученными ранее на модели острого СС₁₄ гепатита у мышей [10]. Показано, что БК, БК-2β и ЭБК-2β, вводимые однократно в той же дозе, проявляют антиоксидантный эффект, достоверно снижая уровень малонового диальдегида и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови. Высокая биологическая активность производных бетулина позволяет предполагать наличие у изучаемых соединений иммуностимулирующей активности, что является предметом дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

1. Введение бетулоновой кислоты и ее аланинамидных производных на фоне токсического поражения пе-

чени комплексом цитостатических препаратов оказывает гепатопротективное действие, уменьшая степень дистрофических и некротических изменений в паренхиме печени, нормализуя микроциркуляцию, увеличивая пролиферативную активность гепатоцитов.

2. Бетулоновая кислота в большей степени снижает деструктивные изменения гепатоцитов (дистрофия, некрозы), а ЭБК-2β — повышает ядерно-цитоплазматическое отношение и количество двуядерных клеток.

3. Гепатопротекторные свойства изученных тритерпеноидов сравнимы с эффектом диквертина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Автандилов, *Медицинская морфометрия*, Медицина, Москва (1990).
2. Е. Д. Гольдберг, Т. И. Фомина, Т. В. Ветошкина, Т. Ю. Дубская, *Бюл. эксперим. биол.*, **126**(11), 561 – 565 (1998).
3. О. Р. Грек, С. В. Мишенина, А. Б. Пупышев, *Бюл. эксперим. биол.*, **134**(10), 413 – 417(2002).
4. Л. Т. Карачурина, Т. А. Сапожникова, Ф. С. Зарудай и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(4), 56 – 59 (2003).
5. Ле Банг Шон, Г. А. Посыпанова, Л. Г. Колибаба и др., *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, № 4, 31 – 34 (2002).
6. Н. И. Петренко, Н. В. Еланцева, В. З. Петухова и др., *Хим. прир. соед.*, № 4, 276 – 283 (2002).
7. А. А. Семенов, *Природные противоопухолевые средства*, Новосибирск (1979).
8. И. В. Сорокина, А. П. Крысин, Т. Б. Хлебникова и др., *Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободнорадикальному окислению. Аналитический обзор: ГПНТБ СО РАН*, Новосибирск (1997).
9. И. В. Сорокина, Т. Г. Толстикова, Е. Б. Бубнова и др., *Научный вестник Тюменской медицинской академии. Биоантиоксиданты*, № 1, 60 – 61. (2003).
10. И. Н. Цымбал, Н. М. Сторожок, Н. И. Петренко, Г. А. Толстиков, *Тезисы докладов VI Междунар. конф. биоантиоксидант*, Москва (2002), сс. 607 – 608.
11. Hye-Jean Jeong, Hee-Byung Chai, So-Young Park, and Dar-rick S. H. L. Kim, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, № 9, 1201 – 1 204 (1999).
12. M. G. Mostafa, T. Mima, S. T. Ohnishi, and K. Mori, *Planta Med.*, **66**(2), 148 – 151 (2000).
13. L. Quinteri, A. Rosato, E. Napoli, et al., *Cancer Res.*, **60**(12), 3232 – 3238 (2000).

Поступила 29.11.04.

THE EFFECT OF BETULONIC ACID AND ITS ALANINE AMIDE DERIVATIVES ON RAT LIVER PARENCHYMA REPAIR DURING POSTCYTOSTATIC PERIOD

O. R. Grek¹, S. V. Pozdnyakova¹, A. P. Nadeev¹, V. S. Pronin¹, N. A. Zhukova², I. V. Sorokina², E. B. Volkova², and T. G. Tolstikova²

¹ Pharmacology Department, Novosibirsk State Medical Academy, Krasnyi pr. 52, Novosibirsk, 630091 Russia

² Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Lavrent'eva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

The effects of betulonic acid, its *p*-alanine amide derivative, and *p*-alanine amide derivative of betulonic acid methyl ether on the histologic structure of rat liver have been studied on the model of experimental polychemotherapy in rats. These agents significantly decrease the dystrophic and cytolytic damage of hepatocytes and increase the repair processes in liver parenchyma.