

I. А. Лукіна, О. В. Мазулін, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова
**Експериментальне вивчення антиоксидантної
та гепатопротекторної активності екстракту
з трави *Polygonum persicaria* L.**

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: гірчак печечуйний,
антиоксидантна активність,
гепатопротекторна активність,
хронічна алкогольна інтоксикація

Пошук нових ефективних та безпечних лікарських засобів рослинного походження є однією з важливих задач сучасної медицини та експериментальної фармакології.

Сьогодні для успішного лікування багатьох захворювань нерідко застосовують численні лікарські засоби, які разом з високою ефективністю мають низку побічних ефектів, зокрема, гепатотоксичність. На відміну від легенів і нирок, які також страждають від токсичної дії препаратів, що вводяться внутрішньовенно та перорально, ураження печінки частіше виникають при ентеральному застосуванні, що пов'язано з особливостями кровопостачання печінки та метаболізму в ній лікарських засобів [1].

Отже, комплексна терапія захворювань печінки різного генезу вимагає використання безпечних багатофункціональних препаратів – гепатопротекторів, які сприяють збереженню та відновленню пошкоджених тканин печінки. Багаторічна медична практика довела, що фітопрепарати для лікування низки захворювань за ефективністю не поступаються синтетичним аналогам, а через відсутність побічних дій і протипоказань мають переваги [2, 3].

Цінними компонентами рослинної сировини, які зумовлюють їхню антиоксидантну та гепатопротекторну активність є флавоноїди, амінокислоти [2, 4, 5]. Сьогодні широко застосовують з лікувальною метою лікарські засоби на основі розторопші плямистої, у якій

діючою речовиною є флавоноїди (флаволігнан – силімарин).

Одним з цінних джерел флавоноїдів та амінокислот є трава *Polygonum persicaria* L. (гірчак печечуйний, род. гречкові – *Polygonaceae*). Родина *Polygonaceae* налічує до 40 родів і понад 800 видів, представники якого поширені переважно в помірних областях обох півкуль і лише зрідка – у субтропіках. У країнах СНД ідентифіковано до 150 видів, у тому числі 18 – розповсюджені на території України. За рахунок умісту різноманітних біологічно активних речовин рослини цього роду виявляють гепатопротекторну, антиоксидантну, кровоспинну, протизапальну та ін. дії [4–6]. Дані щодо гепатопротекторної та антиоксидантної активності *Polygonum persicaria* L. у науковій літературі не знайдені, фармакологічні дослідження ліофілізованого екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. (ЛЕГ) раніше не проводилися.

Мета дослідження – провести експериментальне вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. на моделі ураження печінки за хронічної алкогольної інтоксикації.

Матеріали та методи. На кафедрі фармакогнозії, фармхімії технології ліків Запорізького державного медуніверситету було розроблено та апробовано технологію отримання ліофілізованого порошку з трави *Polygonum persicaria* L. методом сублімаційної сушки (на лабораторній установці Christ Alpha 1-2 LD plus, Німеччина), яка дозволяє зберегти високий вміст стабільних і термолабільних біологічно активних речовин.

Експериментальну частину виконано на білих нелінійних щурах обох статей масою 165–170 г, одержаних з ПП «Біомодельсервіс» (Київ). Розподіл тварин за статтю не проводили через нерівномірну чисельність самок і самців. Під час експерименту тварини знаходилися в стандартних умовах за температури 18–24 °С, вологості 50–60 %, природного світлового режиму «день-ніч», на постійному харчовому та питному режимі згідно з правилами утримання експериментальних тварин, встановлених Директивою Європейського Союзу 2010/63/EU та наказом Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України від 1 березня 2012 р. № 249. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до міжнародних вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних і інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986 р.), правил GLP та методичних рекомендацій ДП «Державний експертний центр МОЗ України» [7–9]. Дослідження проводили в лабораторії ЦНДЛ при кафедрі фармакології та медичної рецептури ДЗ «Запорізький державний медичний університет», сертифікованій ДП «Державний експертний центр МОЗ України».

Щурів було розподілено на 4 групи по 10 тварин для вивчення гепатопротекторної активності: група інтактних тварин (інтактний контроль), група з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації (ХАІ) та 2 групи тварин з моделлю патології, одна з яких отримувала ЛЕГ, а інша референс-препарат.

Експериментальну хронічну алкогольну інтоксикацію (ХАІ) моделювали щоденним внутрішньошлунковим введенням щурам 15 % розчину етанолу в дозі 4 г/кг протягом 10 днів, наступні 10 днів вводили 15 % розчин етанолу зі збільшенням дози до 6 г/кг. Починаючи з 21 дня до закінчення експерименту щурам вводили 25 % розчин етанолу в дозі 4 г/кг. ЛЕГ вводили внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда в дозі 100 мг/кг, один раз на одну добу, щоденно протягом 30 діб. Як розчинник використовували воду очищену [10].

Як референс-препарат у дослідженнях *in vivo* було обрано Гепабене («Merckle GmbH»/ «ratiopharm International GmbH», Німеччина) у дозі 100 мг/кг, у дослідях *in vitro* – Емоксипін (ФДУП «Московський ендокринний завод», Російська Федерація).

На 31 день експерименту проводили аналіз морфологічних і біохімічних показників. Гепатопротекторну активність ЛЕГ визначали за вмістом білірубіну, активністю трансаміназ (АлАТ, АсАТ), фосфатаз (лужної (ЛФ) та кислої (КФ)), визначали також показники тимолової проби та тривалість гексеналового сну. За активністю супероксиддисмутази (СОД), накопиченням продуктів окиснювальної модифікації білка – альдегідфенілгідрозонів (АФГ) і карбоксифенілгідрозонів (КФГ) у печінці оцінювали стан антиоксидантної та детоксикаційної системи печінки, процесів оксидативного стресу [7, 12, 13].

Дослідження антиоксидантної активності (АОА) ЛЕГ також проводили *in vitro*. Для цього використовували метод оцінки АОА за інгібуванням окисної модифікації білка в цитозольній фракції печінки, викликаної реактивом Фентона [11].

Результати дослідження розраховували за допомогою стандартного статистичного пакета ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., № AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Shapiro-Wilk. Дані наведено у вигляді середнього значення. Вірогідність різниці між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента при нормальному розподілі. У разі розподілу, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували критерій U Mann-Whitney. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках використовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності $P < 0,05$ (95 %).

Результати та їх обговорення. Результати досліджень антиоксидантної та гепатопротекторної активності ЛЕГ наведено в таблицях 1, 2.

Виходячи з отриманих даних (табл. 1), у сироватці крові тварин контрольної групи суттєво підвищився рівень білірубину, активність АлАТ, АсАТ та фосфатаз (ЛФ, КФ) на тлі збільшення показника тимолової проби та тривалості гексеналового сну порівняно з показниками інтактного контролю. У групі ХАІ + ЛЕГ порівняно з групою контролю було зареєстровано достовірне зниження біохімічних маркерів ура-

ження печінки – активності трансаміназ (АлАТ, АсАТ), тимолової проби. Також за умов застосування ЛЕГ спостерігали певний вплив на холестаза, зокрема, тенденцію до помірному зменшення рівня білірубину та активності ЛФ в крові експериментальних тварин. Уведення ЛЕГ сприяло відновленню детоксикаційної функції печінки, про що свідчило достовірне зниження тривалості гексеналового сну. Виходячи з вищенаведеного, можна зробити висновок, що курсове введення тваринам ЛЕГ за умов ХАІ чинило виражену гепатопротективну дію.

Таблиця 1

Показники функції печінки за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації в щурів та застосування ліофілізованого екстракту з трави гірчака печечуйного, $M \pm m$ (n = 10)

Група тварин / Показник	Інтактний контроль	Хронічна алкогольна інтоксикація (контроль)	Хронічна алкогольна інтоксикація + Ліофілізований екстракт з трави гірчака печечуйного	Хронічна алкогольна інтоксикація + Гепабене
Загальний білірубін, мкмоль/л	2,70 ± 0,21	7,20 ± 0,47	6,50 ± 0,31	5,10 ± 0,41
АлАТ, ммоль/л·год	0,19 ± 0,01	1,89 ± 0,18*	0,97 ± 0,07**	1,11 ± 0,08**
АсАТ, ммоль/л·год	0,53 ± 0,04	1,57 ± 0,43*	0,87 ± 0,07**	0,98 ± 0,08**
ЛФ, мкмоль/л·с	0,63 ± 0,04	2,73 ± 0,11*	2,55 ± 0,07	2,71 ± 0,07
КФ, мкмоль/л·с	0,71 ± 0,03	2,33 ± 0,21*	1,92 ± 0,11	1,97 ± 0,12
Гексеналовий сон, хв	26,0 ± 1,8	48,10 ± 4,15*	31,7 ± 3,1**	34,5 ± 4,2**
Тимолова проба, од. помутніння	1,42 ± 0,11	9,12 ± 0,51*	5,00 ± 0,42**	6,77 ± 0,54**

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: *P < 0,05 відносно інтактного контролю; **P < 0,05 відносно контрольної групи.

Таблиця 2

Показники оксидативного стресу в печінці щурів за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації та застосування ліофілізованого екстракту з трави гірчака печечуйного, $M \pm m$ (n = 10)

Група тварин / Показник	Інтактний контроль	Хронічна алкогольна інтоксикація (контроль)	Хронічна алкогольна інтоксикація + Ліофілізований екстракт з трави гірчака печечуйного	Хронічна алкогольна інтоксикація + Гепабене
Активність СОД, у.о./мг білка·хв	268,0 ± 21,1	110,7 ± 8,2*	161,4 ± 8,1**	115,2 ± 10,2
Уміст АФГ, у.о./г білка	6,23 ± 0,51	21,2 ± 1,1*	14,20 ± 0,88**	17,2 ± 1,1**
Уміст КФГ, у.о./г білка	2,88 ± 0,21	12,50 ± 0,89*	7,80 ± 0,67**	11,8 ± 1,0

Моделювання ХАІ призводило до пригнічення активності ключового ферменту антиоксидантної системи гепатоциту – супероксиддисмутази (СОД) і активації оксидативного стресу, накопичення цитотоксичних продуктів окиснювальної модифікації білка печінки (АФГ, КФГ) (табл. 2).

На тлі ХАІ введення тваринам ЛЕГ сприяло помірному підвищенню активності СОД, що ймовірно пов'язано зі зниженням рівня супероксидрадикала, надлишок якого пригнічує активність цього ферменту. Відомо, що біологічно активні речовини, виділені з *Polygonum persicaria L.*, здатні виступати як скаведжери активних форм кисню, так і більшою мірою гідрофільних вільних радикалів. Зниження концентрації маркерів окиснювальної модифікації білка в тканині печінки – АФГ і КФГ на фоні введення ЛЕГ вказує на здатність екстрактивних речовин гірчака почечуйного регулювати рівень гідрофільних вільних радикалів у клітині, зокрема, алкоксильних. З метою підтвердження механізмів АОА ЛЕГ були проведені дослідження його активності *in vitro* [11, 12]. Для оцінки АОА використовували метод інгібування окисної модифікації білка (ОМБ), викликаній реактивом Фентона. Отримані результати наведено в таблиці 3.

Окисна модифікація білкових структур клітин призводить до порушення мембранного потенціалу та процесів деполаризації, десенситизації рецепторів, метаболізму клітини, мітохондріальної дисфункції, надалі до ініціації

апоптозу [10]. Одним з ключових механізмів дії багатьох антиоксидантів-цитопротекторів є їхня здатність гальмувати процеси ОМБ і накопичення маркерів АФГ, КФГ [10]. У зв'язку з цим, перспективним напрямом є пошук препаратів, що гальмують процеси ОМБ.

Експерименти *in vitro* показали, що досліджуваний екстракт має бажану активність і за ступенем зниження вмісту АФГ та КФГ конкурує з активністю емоксипіну.

Таким чином, проведені дослідження показали, що на тлі ушкодження печінки за умов хронічної алкогольної інтоксикації застосування ЛЕГ у дозі 100 мг/кг чинить гепатопротекторну та антиоксидантну дію.

Отримані дані підтверджують, що така фармакологічна активність властива іншим представникам видів роду *Polygonum L.* [5, 6, 14]. Яскравими представниками видів роду *Polygonum L.* з гепатопротекторною та антиоксидантною дією є *Polygonum bellardii All.*, *Polygonum odoratum L.*, фармакологічну активність яких вивчали на моделях ураження печінки чотирьохлористим вуглецем і ацетамінофеном відповідно [5, 14]. Отже, отримані в дослідженні дані повністю узгоджуються з інформацією інших наукових джерел.

Усе вищезазначене експериментально обґрунтовує застосування ЛЕГ як перспективної лікарської рослинної сировини для виробництва препаратів з гепатопротекторною й антиоксидантною дією.

Таблиця 3

Антиоксидантна активність ліофілізованого екстракту з трави гірчака почечуйного in vitro за інгібуванням окисної модифікації білка в тканині печінки, M ± m, n = 5

Група тварин	Показник	АФГ, у. о./г білка	КФГ, у. о./г білка
Інтактний контроль		1,070 ± 0,002	1,37 ± 0,02
Контроль		9,95 ± 007*	6,870 ± 0,002*
Ліофілізований екстракт з трави гірчака почечуйного (10 ⁻⁷ г)		7,21 ± 0,01**	4,72 ± 0,02**
Емоксипін (10 М)		7,000 ± 0,002**	4,87 ± 0,01**

Висновки

1. Результати експериментів на щурах з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації свідчать, що курсове введення ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. у дозі 100 мг/кг позитивно впливає на функціональний стан печінки, сприяє покращанню її детоксикаційної функції, характеризується гепатопротекторною та антиоксидантною активністю. За силою гепатопротекторної активності досліджуваній екстракт конкурує з референс-препаратом Гепабене.
2. Досліджуваний екстракт проявляє антиоксидантну активність *in vitro* та за ступенем зниження маркерів окиснювальної модифікації білка не поступається емоксипіну.
3. Отримані дані експериментально обґрунтовують застосування екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. як перспективної лікарської рослинної сировини для виробництва препаратів гепатопротекторної та антиоксидантної дії.

1. Набока О. І. Гепатопротекторна дія екстракту ласкавцю золотистого за експериментального ураження печінки щурів тетрацикліном / О. І. Набока, С. З. Хуарі, О. Ю. Кошова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 2 (43). – С. 72–77.
2. Куркин В. А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных средств / В. А. Куркин, А. В. Куркина, Е. В. Авдеева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11. – С. 1897–1901.
3. Попович В. П. Гепатопротекторний потенціал рослин: монографія / В. П. Попович, Б. П. Громошук, В. А. Сятиня. – Київ : Інтерсервіс, 2012. – 188 с.
4. Амінокислотний склад трави *Polygonum hydropiper* L. та *Polygonum persicaria* L. флори України / І. А. Лукіна, О. В. Мазулін, Г. П. Смойловська [та ін.] // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – № 1 (17). – С. 56–59.
5. Antioxidant, hepatoprotective and antimicrobial activities of the aerial parts of *Polygonum bellardii* All. / Adel M. AbdEl-Kader, Alaa M. Nafady, Amany S. Ahmed [et al.] // Bull. Pharm. Sci., Assiut University. – 2012. – V. 35, № 1. – P. 43–54.
6. Pharmacological and other Bioactivities of the Genus *Polygonum* – A Review / Dong X., Fu J., Yin X. [et al.] // Trop. J. Pharm. Res. – 2014. – V. 13, № 10. – P. 1749–1759.
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації): за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена». – 2001. – 528 с.
8. European convention for the protection of the vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
9. Науково-методичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – Київ : ВД «Авіцена», 2002. – 156 с.
10. Соколик О. П. Спонтанний та індукований АФК *in vitro* апоптоз нейронів сенсомоторної кори щурів при хронічній алкоголізації: ефекти нейропротекторів / О. П. Соколик // Матеріали доповіді 76 Всеросійської наукової конференції з міжнародною участю «Молодіжна наука та сучасність», м. Курськ, Росія. – 2011. – С. 294.
11. Методи оцінки антиоксидантної активності речовин при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліді *in vitro*: метод. реком. / І. Ф. Беленічев, Ю. І. Губський, В. В. Дунаєв, С. І. Коваленко. – Київ : ДФЦ МОЗ України, 2001. – 19 с.
12. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції / І. С. Чекман, І. Ф. Беленічев, О. О. Нагорна [та ін.] // Методичні рекомендації. – Київ : ТОВ «Видавництво «Юстон», 2016. – 80 с.
13. *Lundblad Roger L.* / Hand book of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition / Roger L. Lundblad, Fiona Macdonald. – CRC Press, 2010. – 1098 p.
14. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Polygonum odoratum* L. extract against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats / N. Somporn, R. Jitvaropas, S. Saenthaweek, Am. Thuppiya // Thammasat Medical Journal. – 2013. – V. 13, № 4. – P. 456–464.

І. А. Лукіна, А. В. Мазурін, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова **Експериментальне вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності екстракту з трави *Polygonum persicaria* L.**

Мета дослідження – експериментальне вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. на моделі ураження печінки за хронічної алкогольної інтоксикації.

В експериментах на щурах з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації встановлено, що курсове введення ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. у дозі 100 мг/кг

позитивно впливає на функціональний стан печінки, сприяє покращанню її детоксикаційної функції, характеризується гепатопротекторною та антиоксидантною активністю. За силою гепатопротекторної активності досліджуваний екстракт конкурує з референс-препаратом Гепабене. Досліджуваний екстракт проявляє антиоксидантну активність *in vitro* та за ступенем зниження маркерів окиснювальної модифікації білка не поступається емоксипіну.

Отримані дані аргументують доцільність подальшого вивчення ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria L.*, що має антиоксидантну та гепатопротекторну активність, як засобу комплексної терапії, так і з профілактичною метою.

Ключові слова: гірчак печечуйний, антиоксидантна активність, гепатопротекторна активність, хронічна алкогольна інтоксикація

И. А. Лукина, А. В. Мазулин, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтиярова
Экспериментальное изучение антиоксидантной и гепатопротекторной активности экстракта травы *Polygonum persicaria L.*

Цель исследования – экспериментальное изучение антиоксидантной и гепатопротекторной активности лиофилизированного водного экстракта травы *Polygonum persicaria L.* на модели поражения печени при хронической алкогольной интоксикации.

В экспериментах на крысах с моделью хронической алкогольной интоксикации установлено, что курсовое введение лиофилизированного водного экстракта травы *Polygonum persicaria L.* в дозе 100 мг/кг оказывает положительное влияние на функциональное состояние печени, способствует улучшению ее детоксикационной функции, характеризуется гепатопротекторной и антиоксидантной активностью. По выраженности гепатопротекторного действия исследуемый экстракт конкурирует с референс-препаратом Гепабене. Он также проявляет антиоксидантную активность *in vitro* и по степени уменьшения маркеров окислительной модификации белка не уступает эмоксипину.

Полученные данные аргументируют целесообразность дальнейшего изучения лиофилизированного водного экстракта травы *Polygonum persicaria L.*, обладающего антиоксидантной и гепатозащитной активностью, как средства комплексной терапии, так и с профилактической целью.

Ключевые слова: горец печечуйный, антиоксидантная активность, гепатопротекторная активность, хроническая алкогольная интоксикация

I. A. Lukina, A. V. Mazulin, A. V. Abramov, N. V. Bukhtiyarova
Experimental study of the antioxidant and hepatoprotective activities of the extract from the herb *Polygonum persicaria L.*

The aim of the study was experimental evaluation of antioxidant and hepatoprotective activities of lyophilized extract from the herb *Polygonum persicaria L.* under liver damage model induced by chronic alcohol intoxication.

In experiments on rats under chronic alcohol intoxication it was found that course administration of lyophilized extract from the herb *Polygonum persicaria L.* (100 mg/kg) demonstrates positive effects on the liver, improves its detoxification function, characterizes by antioxidant and hepatoprotective properties. The extract was not inferior to the reference drug by the strength of hepatoprotective effect. It also demonstrated antioxidant effect *in vitro* significantly decreased the level of oxidative stress markers.

The results obtained substantiate the further study the feasibility of lyophilized extract from the herb *Polygonum persicaria L.* having antioxidant and hepatoprotective activities as a means of complex therapy and preventive purposes as well.

Key words: *Polygonum persicaria L.*, antioxidant activity, hepatoprotective activity, chronic alcohol intoxication

Надійшла: 30 грудня 2016 р.

Контактна особа: Лукіна Ірина Андріївна, аспірант, кафедра фармакогнозії, фармацевтичної технології ліків, Запорізький державний медичний університет.
Електронна пошта: lukina_iryana@u