

УДК: 577.126:57.042

Л.В. ГАЛУЗІНСЬКА

Національний фармацевтичний університет

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ ПОЛІФЕНОЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ З НАДЗЕМНОЇ ЧАСТИНИ ЛЯДВЕНЦЮ РОГАТОГО

Для корекції захворювань печінки широко використовують гепатопротекторні препарати рослинного походження, які містять біофлавоноїди. В роботі вивчали гепатопротекторну дію поліфенольного екстракту «Локорин» на моделі гострого ураження печінки. Показано, що в умовах гострого токсичного гепатиту, який викликано тетрахлорметаном, екстракт «Локорин» виявляв гепатозахисну активність, про що свідчать інгібування ПОЛ за рахунок як прямих, так і опосередкованих механізмів, а також мембраностабілізуючу дію.

Ключові слова: гепатит, поліфеноли, тетрахлоретан.

ВСТУП

Перспективним напрямом вирішення проблеми безпеки лікарських засобів може бути використання препаратів на основі біологічно активних речовин різноманітних рослин. Використання рослинної сировини для створення лікарських препаратів пояснюється багатьма причинами [15, 24]. По-перше, компоненти, які входять до складу таких препаратів, завдяки широкому спектру фармакологічної дії та низькій токсичності проявляють комплексну дію на організм і рідко викликають серйозні побічні реакції [1, 23]. Це дозволяє проводити тривале лікування при хронічних захворюваннях. Діючі речовини, які входять до складу рослин, часто виявляють високу спорідненість до ферментних систем організму і тому відносно легко вступають у метаболічні процеси. Важливою особливістю багатьох рослинних препаратів є доступна сировина, економічний спосіб отримання лікарського засобу [17].

Рослини роду Лядвенець довгий час не були спеціальним об'єктом багатостороннього хімічного вивчення, що не давало можливості їх практичного використання. Перш за все цікавість до вивчення хімічного складу Лядвенцю було викликано їх кормовою цінністю. За даними літератури у рослинах роду *Lotus* виявлені амінокислоти, каротиноїди, вітаміни (С, К, В₁, В₂,) цукор, мікроелементи [18]. Основні біологічно активні речовини, які викликають зацікавлен-

ність та заслуговують на увагу – це сполуки класу флавоноїдів, в основному флавонолу.

Рослинні поліфеноли мають здатність до оборотного окиснення, переходу з фенольних форм у хінонні, і відновлення останніх у феноли, тобто можуть виступати як донорами, так і акцепторами електронів і протонів. На теперішній час безперечно доведено, що поліфеноли як антирадикальні агенти не лише перешкоджають ініціації вільно радикального окислення, але й переривають ланцюг перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) [4, 19, 21]. Антиоксидантна дія поліфенолів визначається більш високою, ніж у інших сполук, антирадикальною активністю [26]. Завдяки антиоксидантному ефекту поліфеноли захищають від пошкодження мембрани клітин, лізосом, мітохондрій, різних структур ядра, проявляючи в цілому цитозахисний ефект. В цій якості рослинні антиоксиданти виступають разом із захисною антиоксидантною системою організму, полегшуючи її завдання «гасіння» вільних радикалів [16, 20, 22, 25].

У фармакологічному відношенні рослини роду Лядвенець практично не вивчені. Але є відомості, що в Україні та на Кавказі відвар з цієї трави застосовують при сказі та при простудних захворюваннях [6]. Його вживають зовнішньо як ранозагоювальний, пом'якшувальний, анальгетичний засіб [15]. Листя використовують як в'яжучий засіб; квітки – як заспокійливий, загальнозміцнюючий і тонізуючий при втомі [6]. Незрілі плоди вживають в їжу, відвар пло-

© Л.В. Галузінська, 2013

дів використовують від головного болю та болю у шлунку і кишечнику [9].

Деякі види роду Лядвенець пригнічують ЦНС, мають антидепресивний ефект, в досліджах *in vitro* виявляють протипухлинну активність у відношенні саркоми [18].

На кафедрі фармакогнозії НФаУ доцентом Король В.В. та професором Ковальовим В.М. вперше було проведено комплексне фітохімічне дослідження біологічно активних речовин з надземної частини Лядвенцю рогатого [9]. Отримані дані свідчать про наявність в ній амінокислот, вуглеводів, фосфоліпідів, фенольних сполук, ліпофільних речовин. Також була розроблена технологія одержання фармакологічних засобів з Лядвенцю рогатого, внаслідок проведення якої були отримані два екстракти: поліфенольний під умовною назвою «Локорин» та ліпофільний – «Лотус» [12].

Аналіз хімічного складу поліфенольного екстракту показав, що основними діючими речовинами є фенольні сполуки (рис. 1.): оксикоричні кислоти, флавоноїди, загальний вміст яких становить 28,52 % [9].

Характерними флавоноїдами «Локорину» є флаволи та флавонові глікозиди: кемпферол (3,5,7,4'-тетраоксифлавоон) і кверцетином

(3,5,7,3',4'-пентаоксифлавоон) та їх глікозиди – астрагалін(кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозид), популін (кемпферол-7-О-β-D-глюкопіранозид), кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозидо-7-О-β-D-глюкопіранозид, трифолін (кемпферол-3-О-β-D-галактозид), ізокверцетрин (кверцетин-3-О-β-D-глюкопіранозид), кверцетрин (кверцетин-3-О-β-D-рамнопіранозид), гіперозид (кверцетин-3-О-β-D-галактопіранозид)

Оксикоричні кислоти представлені п-кумаровою кислотою (4-оксикорична кислота), кофейною кислотою (3,4-діоксикорична кислота), феруловою (3-окси-4-метоксикорична кислота), хлорогеновою (5-О-кофеїл-D-хінна кислота) та неохлорогеновою кислотами (3-О-кофеїл-D-хінна кислота) [9].

Отже, враховуючи широту спектру активності поліфенольних сполук та необхідність для сучасної медицини отримання нових протизапальних препаратів природного походження, необхідним було провести фармакологічні дослідження отриманого поліфенольного об'єкту для подальшого створення на його основі ефективного лікарського засобу.

Метою даного дослідження було вивчення гепатопротекторних властивостей поліфенольного екстракту «Локорин»

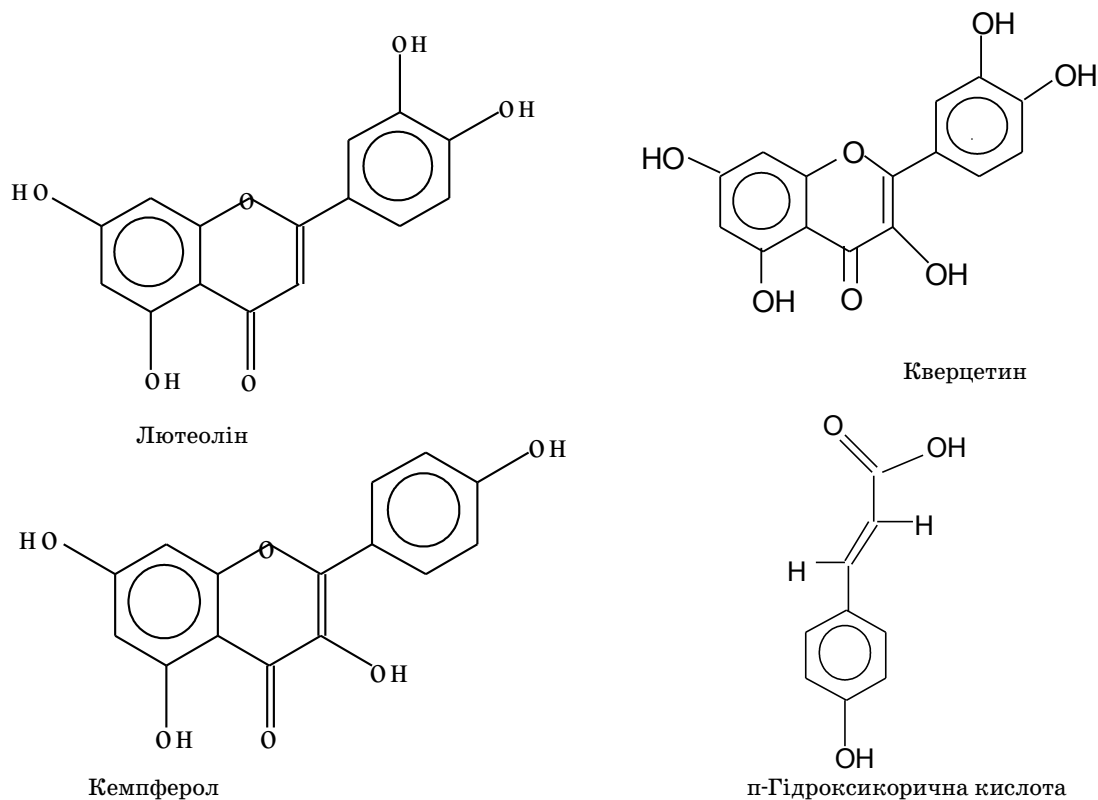


Рис. 1. Деякі поліфенольні сполуки, які входять до складу екстракту «Локорин»

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Всі маніпуляції з тваринами проводили під хлорал-уретановим наркозом. Дослідження проводилися відповідно до національних «Спільними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

У роботі використовували щурів масою 200-220 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію [3].

Вивчення антиоксидантних властивостей проводили на моделі тетрахлорметанового гепатиту. Гепатит викликали за допомогою одноразового внутрішньошлункового введення 50 % олійного розчину тетрахлорметану в дозі 1 мл/100 г маси тіла тварини [2]. Препаратом порівняння при вивченні гепатозахисних властивостей досліджуваного екстракту був біофлавоноїдний гепатопротектор силібор з плодів розторопші плямистої (виробництва ФК «Здоров'я», м. Харків) у дозі 25 мг/кг – ЕД₅₀ за гепатозахисною дією. Екстракт «Локорин» у дозі 50 мг/кг (ЕД₅₀) і препарат порівняння вводили внутрішньошлунково за годину до та через годину після введення гепатотоксину [4].

Тварини були поділені на 4 групи: 1 група – інтактні тварини; 2 група – контрольна патологія; 3 група – тварини, яких лікували екстрактом «Локорин»; 4 група – тварини, що отримували силібор.

Наступної доби тварин декапітували. У подальших дослідженнях використовували кров

та печінку, яку видаляли, та зважували для розрахунку коефіцієнта маси печінки (КМП) та приготування гомогенату [2].

Інтенсивність процесів ПОЛ визначали за вмістом у гомогенаті печінки дієнових кон'югатів (ДК), ацилгідропероксидів (АГП), ТБК-реактивів [7]. Вміст відновленого глутатіону (GSH) досліджували спектрофотометрично за оптичною густиною комплексу з алоксаном [8]. Каталазну активність визначали спектрофотометрично за зниженням поглинання пероксиду гідрогену і виражали в мкмоль Н₂O₂/хв на мг білка [71]. У сироватці крові визначали активність аланін аміотрансферази (АлАТ), лужної фосфатази (ЛФ), та гамаглутамілтранспептидази (γ-ГТП) з використанням стандартних наборів реактивів.

Весь фактичний матеріал був оброблений статистично з застосуванням критерію t Стьюдента [5]. Розрахунки проводили за допомогою програми Statistica 5.0 for Windows на ПК Pentium 200 [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інтоксикація тварин тетрахлорметаном є певної міри еталоном пошкодження печінки з характерними проявами дисфункції органу і патоморфологічними змінами у гепатобіліарній системі. Некрозогенна дія цієї отрути обумовлена ураженням лізосом та інших мембранних структур клітин внаслідок активації ПОЛ, індукованого утворенням вільнорадикальних метаболітів тетрахлорметану [10, 13].

Пошкодження печінки гепатотоксином супроводжувалось значним підвищенням КМП

Таблиця

ВПЛИВ ЕКСТРАКТУ «ЛОКОРИН» НА ПЕРЕБІГ ГОСТРОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ, СПРИЧИНЕНОГО ВВЕДЕННЯМ ТЕТРАХЛОРМЕТАНУ У ЩУРІВ (M±M, N=7)

Показник/група	Інтакт	Контрольна патологія	Екстракт «Локорин», 50 мг/кг	Силібор, 25 мг/кг
КМП, (%)	3,73±0,15	5,18±0,27*	3,91±0,19**	3,93±0,35**
ГОМОГЕНАТ ПЕЧІНКИ				
ТБК-реактанти, (нмоль/г)	1,80±0,17	4,50±0,76*	2,39±0,36*/**	2,87±0,18*/**
АГП, нмоль/г	0,65±0,05	1,50±0,17*	0,89±0,07*/**	0,88±0,14*/**
ДК, нмоль/г	3,01±0,15	6,45±0,42*	4,13±0,09*/**	4,24±0,23*/**
GSH, мкмоль/г	3,38±0,21	1,92±0,10*	3,02±0,20**	2,85±0,06*/**
Каталаза, мкмоль Н ₂ O ₂ /хв. на мг білка	86,96±2,55	51,40±3,04*	76,35±3,30*/**	70,70±4,10*/**
СИРОВАТКА КРОВІ				
АлАТ, (ммоль/г л)	0,41±0,04	1,12±0,07*	0,77±0,06*/**	0,76±0,04*/**
ЛФ, (мккат/л)	4,31±0,43	6,07±0,39*	5,20±0,18*/**	5,10±0,034*/**
γ-ГТП, (мккат/л)	3,15±0,19	7,41±0,18*	6,10±0,24*/**	6,24±0,35*/**

Примітки: * – відмінність достовірна по відношенню до інтакту (p≤0,05); ** – відмінність достовірна по відношенню до контрольної патології (p≤0,05); n – кількість тварин у групі.

в 1,4 разу в порівнянні з інтактними тваринами, що є результатом набряку печінкової тканини і вказує на порушення гемодинаміки (табл.).

Токсична дія тетрахлорметану проявилась в тканині печінки активацією процесів ПОЛ, а саме – достовірним накопиченням АГП, ДК та ТБК-реактивів у 2,3; 2,1 та 2,5 разу, відповідно у порівнянні з інтактними тваринами, а також розвитком цитолізу гепатоцитів та підвищенням у 2,7 разів АЛАТ в сироватці крові. Гіперферментемія (зростання ЛФ у 1,4 разу та γ -ГТП у 2,4 разу) є свідченням розвитку холестатичного та цитолітичного синдромів. Важливим є достовірне зниження вмісту природного антиоксиданту GSH в 1,75 разу та активності антиоксидантного ферменту каталази в 1,7 разу.

Введення тваринам на тлі експериментальної патології екстракту «Локорин» в умовах лікувально-профілактичного режиму сприяло відновленню функціонально-біохімічних показників печінки та зниженню гіперліпопероксидації. Так, досліджуваний екстракт достовірно знижував вміст ТБК-реактивів в 1,9 разу, накопичення АГП та ДК в гомогенаті печінки у 1,7 рази та 1,6 разу, відповідно (табл.).

У тварин, яких лікували екстрактом «Локорин», поліпшились показники антиоксидантної системи, а саме: у гомогенаті печінки відновився до норми рівень GSH, а вміст каталази був в 1,5 рази більше, ніж у групі контрольної патології. Відновлення функціонування порушених компонентів антиоксидантного захисту організму реалізується, напевно, через участь атому гідрогену поліфенолів екстракту «Локорин» в окиснювально-відновних реакціях.

Поряд з позитивними змінами показників ПОЛ та АОС у тканині печінки, у сироватці крові спостерігалось зниження активності ферментів цитолізу. Так, активність АЛАТ була в 1,45 разу, а активність ферментів ЛФ та γ -ГТП в 1,2 разу достовірно нижче, ніж у щурів групи контрольної патології.

В групі тварин, яким вводили силібор, спостерігалось достовірне зменшення КМП в 1,3 разу, як і при введенні екстракту «Локорин». Вміст продуктів ПОЛ в гомогенаті печінки також знизився: ТБК-реактивів – в 1,6 разу, АГП – 1,7 разу, ДК – 1,5 рази в порівнянні з показниками в групі контрольної патології (табл.). З боку АОС відмічалось збільшення вмісту GSH в 1,5 рази та каталази в 1,4 разу. Достовірне зниження активності всіх досліджуваних ферментів в сироватці крові свідчить про зменшення інтенсивності цитолізу гепатоцитів.

Таким чином, в умовах гострого токсичного гепатиту, який викликано тетрахлорметаном,

екстракт «Локорин» виявляв гепатозахисну активність, про що свідчать інгібування ПОЛ за рахунок як прямих, так і опосередкованих механізмів, а також мембраностабілізуючу дію. Зміни більшості зазначених показників були порівнюваними за гепатозахисним ефектом з показниками тварин, яким вводили силібор.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Громашевская Л.М. Биохимические исследования при болезнях печени / Л.М. Громашевская // Журнал практ. врача. – 1999. – № 1. – С. 24-28.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / за ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова – К. : Авіцена. – 2001. – 528с.
3. Западнюк М.П., Лабораторные животные. Использование в эксперименте. / М.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария. – К. : Высшая школа, 1983. – 878 с.
4. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Высшая школа, 1993. – 272 с.
5. Иванов Ю.И., Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам / Ю.И. Иванов, Р.Н. Погорелюк – М. : Медицина, 1990. – 224 с.
6. Исаева Г.П. Об использовании некоторых представителей лекарственной флоры Алтая в народной медицине // Лекарственные растения в традиционной и народной медицине. – Улан-Уде, 1987. – С. 75-76.
7. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностики: В 2 т.— Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
8. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностики: В 2 т.— Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 2. – 463 с.
9. Король В.В. Фармакогносичне вивчення *Lotus corniculatus*. Автореф. дис. канд. фарм.н.– Харків, 1999. – 18 с.
10. Ланкин В.З., Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях. / В.З. Ланкин, В.З. Тихадзе – М., 2001. – 78 с.
11. Лапач С.М., Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням Excel / С.М. Лапач, А.В. Чубенко, П.М. Бабіч // К. : Моріон. 2001. – 408 с.
12. Пат. МПКА61К№18309. Безвідходний спосіб одержання біологічно активних комплексів з лядвенцю рогатого /Вороніна Л.М., Галузінська Л.В., Кисличенко В.С., Король

- В.В., Набока О.І.; Заявл. 27.03.2006; Опубл. 15.11.2006.
13. Пентюк А.А., Поражения печени ксенобиотиками / А.А. Пентюк, Л.В. Мороз, О.В. Паламарчук // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – № 2. – С. 8-16.
 14. Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. / Ю.Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // Доклады АН СССР, 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513-1516.
 15. Фитотерапия в клинике внутренних болезней: Учебное пособие для студентов ВУЗов / Под ред. Самуры Б.А. – Х. : Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2003. – 416 с.
 16. Чекман І.С. Флавоноїди – клініко-фармакологічний аспект / І.С. Чекман // Фітотерапія в Україні. – 2000. – № 2. – С.3-5.
 17. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения / под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб.: Спец. лит., 1999. – 408 с.
 18. Яковлев Г.П. Бобовые земного шара. / Г.П. Яковлев // – Л. : Наука, 1991. – 144 с.
 19. Casagrande R., Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antiliperoxidative activity / R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr. // AAPS PharmSciTech. – 2006. – № 7 (1). – P. 10.
 20. de Beer D., Unravelling the total antioxidant capacity of pinotage wines: contribution of phenolic compounds / D. de Beer, E. Joubert, M. Manley // 2006. – № 54 (8). – P. 2897-905.
 21. de Boer V.C., SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism / V.C. de Boer, P.C. Hollman, J. Keijer // Mech Ageing Dev. – 2006. -№ 127(7). – P. 618-627.
 22. Harborne J.B. Flavonols as yellow flower pigments / J.B. Harborne // Phytochemistry. – 1965. – Vol. 4. – P. 645-657.
 23. Romero Gomes M., Nimesulide acute hepatitis: description of 3 cases / M. Romero Gomes, M. Nevado Santos, M.J. Fjbelo // Med.Clin (Barc). –1999. – P. 357-358.
 24. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. / C.E. Ruper, S.E. Kulling // – 2006. – № 54 (8). – P. 2926-2931.
 25. Salvador M.J., Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. / M.J. Salvador, E.O. Ferreira, S.U. Mertens-Talcott // Z Naturforsch. 2006. – № 1-2. – P. 19-25.
 26. Singab A.N., Hepatoprotective effect of flavonol glycosides rich fraction from Egyptian *Vicia calcarata* Desf. against CCl4-induced liver damage in rats / A.N. Singab, D.T. Youssef, E. Noaman // Arch Pharm Res. – 2005. – № 7. – P. 791-798.

УДК 577.126:57.042

Л.В. Галузинская

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ
ПОЛИФЕНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА С НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО**

Для коррекции заболеваний печени широко используют гепатопротекторные препараты растительного происхождения, содержащие биофлавоноиды. В работе изучали гепатопротекторное действие полифенольного экстракта «Локорин» на модели острого поражения печени. Показано, что в условиях острого токсического гепатита, который вызывали тетрахлорметаном, экстракт «Локорин» проявлял гепатозащитную активность, о чем свидетельствует ингибирование ПОЛ за счет как прямых, так и опосредованных механизмов, а также мембраностабилизирующее действие.

Ключевые слова: гепатит, полифенолы, тетрахлорметан.

UDC 577.126:57.042

L.V. Galuzinskaja

**EXPERIMENTAL STUDY HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY POLYPHENOLIC
EXTRACTS FROM AERIAL PARTS OF LOTUS CORNICULOTOS**

For the correction of liver disease is widely used hepatoprotective herbal drugs containing bioflavonoids. The paper studied the hepatoprotective effect polyphenol extract «Locorin» on the model of acute liver injury. It is shown that in acute toxic hepatitis, which causes carbon tetrachloride extract «Locorin» showed hepatoprotective activity, as evidenced by the inhibition of lipid peroxidation due to both direct and indirect mechanisms, and membrane-stabilizing action.

Key words: hepatitis, polyphenols, carbon tetrachloride.

Адреса для листування:
61024, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Кафедра біохімії НФаУ
Тел.: (057)-706-30-99

Надійшла до редакції:
11.01.2013