

ЭОЖ 615.322/612.354

А.К. Кайынбаева, С.Т. Тулеуханов, М.К. Мурзахметова,
Р.С. Утегалиева, А.Н. Аралбаева, В.К. ТурмухамбетоваИнститут физиологии человека и животных, Казахстан, г. Алматы
E-mail: aidaarsenkz_@mail.ru

Гепатопротекторный эффект препарата растительного происхождения при интоксикации тетрахлорметаном

Аннотация. Исследования в условиях *in vivo* показали, что применение фитопрепарата при интоксикации тетрахлорметаном повышает резистентность клеточных мембран, уменьшая повреждающее действие гепатотоксиканта. При этом наблюдается снижение содержания перекисных продуктов и повышение активности супероксиддисмутазы в микросомальной фракции печени. Исследование биохимических параметров (активность аминотрансфераз) подтвердили, что фитопрепарат оказывает положительный эффект на состояние клеток печени.

Ключевые слова: гепатопротекторы, фитопрепарат, силимарин, свободные радикалы, перекисное окисление липидов, тетрахлорметан, супероксиддисмутаза, активность аминотрансфераз

Известно, что печень является мишенью для проявления токсичности ряда лекарственных препаратов, поскольку именно в этом органе происходит метаболизм ксенобиотиков. В настоящее время для поддержания функции печени широко используются средства, различные по структуре и механизму действия, но обладающие избирательным действием в отношении печени – гепатопротекторы. Гепатопротекторный эффект проявляют различные фармакологические средства, улучшающие метаболические процессы в организме (витамины, антиоксиданты, антигипоксанты и др.) [1]. Вместе с тем гепатопротекторная активность известных лекарственных препаратов не столь велика, и представляется актуальным поиск новых более эффективных средств, повышающих антиоксидантную функцию печени и неспецифическую адаптогенную резистентность организма к воздействию неблагоприятных экзогенных и эндогенных факторов.

В последние годы традиционная медицина сделала большой шаг к использованию в лечебных целях лекарственных растений, обладающих разнонаправленным терапевтическим действием и отличающимися отсутствием токсичности

[2-4]. На сегодняшний день известно множество растительных препаратов, которые дают возможность разрешить ряд проблем. Флора Казахстана отличается богатым видовым разнообразием [5-6], что дает возможность использования экстрактов растений или их активных компонентов для лечения и оздоровления населения.

Материалы и методы исследования

1. Для создания комплексного гепатопротекторного средства траву душицы обыкновенной, мать и мачехи, листьев шиповника, шалфея, цветов липы сердцевидной и почек березы измельчали и в соотношении 2:1:1:2:1:3 провели экстракцию 50%-ым этанолом при соотношении 1:10 сырье-экстрагент и температуре 20-25°C в течение 20 часов.

1. В условиях *in vivo* было проведено исследование влияния разработанной нами фитопрепарата на состояние мембран клеток печени при хронической интоксикации тетрахлорметаном. Опыты проведены на 60 взрослых (12-месячных) крысах-самцах массой 300-350 г.

Для оценки гепатопротекторных свойств фи-

топрепарата животных разделили на 6 групп. I группа - контроль, II группе вводили подкожно тетрахлорметан, растворенный в оливковом масле (v/v, 1:1), из расчета 2,0 мл/кг веса животного в течение 2-х недель., животные III и IV группа получали перорально фитопрепарат и силимарин в течение 14 дней из расчета 200 и 100 мг/кг массы тела соответственно. Животным V и VI групп давали перорально фитопрепарат и силимарин в сочетании с раствором CCl_4 в течение 2-х недель.

Для получения гомогената навеску 0,5-1,0 г ткани печени крыс после промывания в охлажденном физиологическом растворе помещали в 5-10 мл среды, содержащей 0,85% NaCl и 50мМ KH_2PO_4 , (рН 7,4 при 4°C) и гомогенизировали гомогенизатором типа Polytron в течение 90 сек. Гомогенат центрифугировали при 10000g в течение 20 мин. Микросомную фракцию получали, центрифугируя супернатант при 30000g в течение 60 мин. Надосадочную жидкость осторожно сливали и осадок, представляющий собой микросомальную фракцию, суспендировали в среде, содержащей 25% глицерина, 0.1 мМ ЭДТА, 0.2 мМ $CaCl_2$, 10 мМ гистидина, (рН 7.2 при 4°C) и хранили при минус 4°C.

Об интенсивности **перекисного окисления липидов (ПОЛ)** в микросомах печени судили по содержанию ТБК-активных продуктов. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по интенсивности развивающейся окраски в результате взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по методу Н.О. Ohkawa e.a. [7]. Для индукции процесса ПОЛ в мембранах применяли систему Fe^{2+} (0,02мМ)+аскорбат (0,5мМ). Окисление проводили в среде гомогенизирования в термостатируемых ячейках при 37°C с постоянным перемешиванием в течение 60 мин. Оптическую плотность измеряли при 532 нм. Расчет содержания продуктов, реагирующих с ТБК, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА, равного $1.56 \times 10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

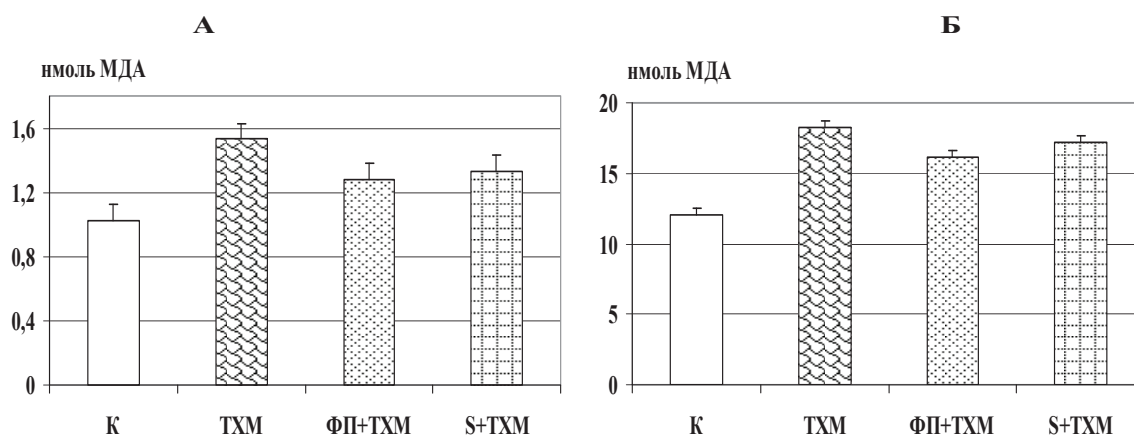
Определение активности СОД в микросомах печени проводили с помощью набора «SOD Assay Kit-WST» фирмы «Fluka».

Определение активности трансфераз (аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансфераза) в сыворотке крови и микросомах печени проводили методом Райтмана-Френкеля при помощи наборов фирмы «Витал Диагностика СПб».

Статистическая обработка данных. Результаты статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel и GraphPad Prism 5,01. С учетом критерия Фишера-Стьюдента зарегистрированные изменения показателей считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Для сравнения с разработанной нами растительной композицией был использован силимарин. Силимарин экстрагирован из расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) и используется как гепатопротективный агент в течение последних лет разными исследователями при токсических поражениях печени [8-9]. На рисунке 1 представлены результаты исследований сочетанного влияния фитопрепарата и силимарина с тетрахлорметаном (ТХМ) на накопление перекисных продуктов в микросомах печени. Результаты исследования показали, что при введении CCl_4 содержание вторичных продуктов перекисного окисления – малонового диальдегида увеличилось относительно контрольных значений. При сочетанном влиянии фитопрепарата и ТХМ наблюдается снижение как фоновых значений малонового диальдегида, так и уровня МДА при индукции ПОЛ в течение 60 мин. Исследование кинетики накопления ТБК-активных продуктов в микросомах печени выявило, что при действии ТХМ уровень МДА в течение 60 минут индукции системой Fe^{++} +аскорбат достоверно возрастает на 50%, относительно контроля. При действии фитопрепарата и ТХМ отмечено, что уровень МДА снижается на 11,5 %, при введении животным силимарина в сочетании с CCl_4 содержание МДА снижается на 5,4% по сравнению с микросомами печени животных, подвергнутых интоксикации CCl_4 . Из рисунка видно, что фитопрепарат проявляет несколько лучший эффект по сравнению с силимарином. При действии гепатотоксиканта на фоне приема фитопрепарата наблюдалось более выраженное снижение накопления МДА по сравнению с группой, получавших силимарин в сочетании с тетрахлорметаном. Следовательно, применение фитоконпозиции позволяет более эффективно снизить интенсивность накопления перекисных продуктов и предотвратить повреждение клеток печени при действии гепатотоксиканта.

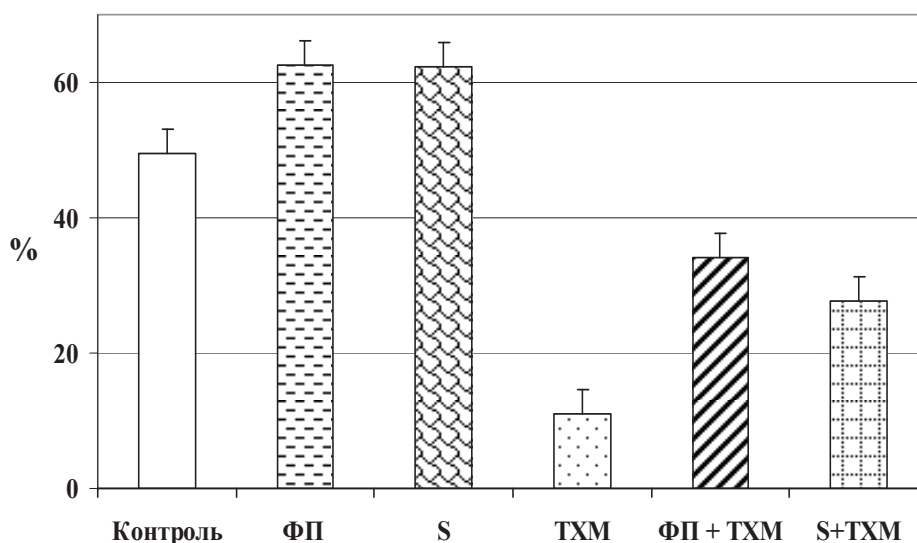


По оси абсцисс: группы животных; по оси ординат: содержание МДА, нмоль /мг белка
Рис. 1 – Влияние фитопрепарата и силимарина на содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ в микросомах печени при хронической CCl_4 -интоксикации (А – фоновые значения, Б – после индукции ПОЛ в течение 60 мин)

Как видно из рисунка 2, применение фитопрепарата и силимарина привело к повышению активности СОД по сравнению с контролем на 26 и 25 %, соответственно. При введении CCl_4 в течение 2 недель снижается активность антиоксидантного фермента в микросомах печени на 77% относительно контрольных значений. Это, по-видимому, связано с повышением интенсивности перекисного окисления липидов. Было выявлено, что при сочетанном действии фитокомпозиции или силимарина с ТХМ наблюдается двухкратное увеличение активности фермента относительно проб с моделью токсического гепатита, хотя уровень активности СОД остается ниже контрольных значений активности фермента. Итак, есть основание предположить, что использование фитокомпозиции позволяет уменьшить снижение активности супероксиддисмутазы. Липиды мембран являются микросредой, в которой функционирует большинство ферментов. Следовательно, изменения в липидном слое в результате свободно-радикальных реакций влияет на функцию ферментов. В дополнение к этому, белковые молекулы могут подвергаться атаке активными формами кислорода, что

ведет к изменению их конформации и, в связи с этим, к изменению их свойств и активности.

Оценка активности аминотрансфераз (АлАт, АсАт) в сыворотке крови при хронической интоксикации тетрахлолорметаном на фоне действия фитопрепарата показали, что при сочетанном действии фитокомпозиции и силимарина с гепатотоксикантом снижается повреждающий эффект CCl_4 (рисунок 3). При действии ТХМ активность аланинаминотрансферазы повысилось на 124 %, аспаргатаминотрансферазы – на 210 %. Тогда как у крыс, получавших протекторные препараты, активность аминотрансфераз достоверно снижалась относительно проб с моделью токсического гепатита. Также можно отметить, что действие фитопрепарата на уровень аминотрансфераз более выражено по сравнению с эффектом силимарина. Сравнение протекторного эффекта фитопрепарата и силимарина позволяет заключить, что защитное действие фитопрепарата выше силимарина. Следовательно, можно отметить, что использование фитопрепарата снижает токсическое действие ТХМ на клетки печени и улучшает состояние гепатоцитов.



По оси абсцисс: группы животных; по оси ординат: активность СОД, %.

Рис. 2 – Активность СОД в микросомах печени при изолированном и сочетанном действии фитопрепарата, силимарина и ТХМ

Таким образом, результаты исследования при интоксикации тетрахлорметаном на фоне действия фитопрепарата выявили, что разработанный нами фитопрепарат снижает интенсивность

накопления перекисных продуктов в микросомах печени.

По оси абсцисс: группы животных, по оси ординат: активность аминотрансфераз, нмоль.

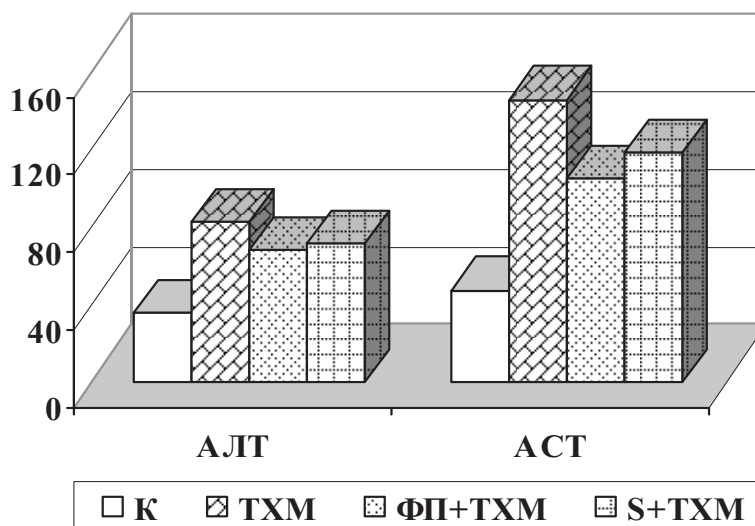


Рис. 3 – Влияние фитопрепарата и силимарина на уровень аминотрансфераз в сыворотке крови при хронической интоксикации ТХМ

Кроме того, использование растительного препарата позволяет предотвратить потерю активности эндогенных антиоксидантов. Результаты по срав-

нению антиоксидантных и мембраностабилизирующих свойств фитокомпозиции с силимарином показали, что разработанный нами фитопрепарат,

оказывает аналогичный эффект. Исследование биохимических параметров подтвердили, что фитопрепарат, также как и силимарин, оказывают практически одинаковый положительный эффект на состояние клеток печени. Следовательно, фитопрепарат, разработанный на основе лекарственных растений Казахстана, обладает антиоксидантным свойством и проявляет гепатопротекторный эффект и может быть использован для повышения устойчивости организма к действию факторов, приводящих к избыточному образованию свободных радикалов и развитию окислительного стресса.

Литература

- 1 Королева, Л.Р. Современные гепатопротекторы // Российский медицинский журнал. – 2005. – №2. – С. 35-37.
- 2 Fong H.H. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects // Integr Cancer Ther. – 2002. – Vol. 1. – P. 287–93.
- 3 Ameenah Gurib-Fakim. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow // Molecular Aspects of Medicine. – 2006. Vol. – 27. – N 1. – P.1-93.
- 4 Chin Y.-W, Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. Drug discovery from natural sources // AAPS Journal. – 2006. – Vol.8. – N2. – P.E239-E253.
- 5 Рахимов К.Д., Сатыбалдиева Ж.А., Суходоева Г.С. и др. Руководство по работе с лекарственными растениями / под ред. Беклемишева Н.Д. – Алматы: ЗГКП «Дәрі-Дармек», 1999. – 232 с.
- 6 Кукенов М.К., Адекенов С.М., Рахимов Қ.Д., Исамбаев А.И., Сауранбаев Б.Н. Қазақстанның дәрілік өсімдіктері және оның қолданылуы. – Алматы: Ғылым, 1998. – 288 б.
- 7 Ohkawa H.O. Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal.Biochem. – 1979. – Vol. 95. – N 2. – P. 351-358.
- 8 Saller R., Meier R., Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases // Drugs. 2001. – Vol. 61. – N 14. – P. 2035-2063.
- 9 Pradhan S.C., Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine // Indian J Med Res. 2006. – Vol.124. – N 5. – P. 491-504.

А.К. Қайынбаева, С.Т. Төлеуханов, М.К. Мырзахметова,
Р.С. Өтеғалиева, А.Н. Аралбаева, В.К. Турмухамбетова
**Өсімдіктерден алынған препараттың тетрахлорметанмен улану
жағдайындағы гепатопротекторлы әсері**

In vivo жағдайындағы зерттеулер тетрахлорметанмен улану кезіндегі фитопрепаратты пайдалану клетка мембраналарының төзімділігін арттырып, гепатотоксиканттың зақымдаушы әсерінен қорғайтынын көрсетті. Бұл кезде бауырдың микросомалды фракцияларындағы асқын тотығу үдерістерінің қарқындылығы төмендеп, супероксиддисмутаза белсенділігінің артатындығы байқалды. Сондай-ақ фитопрепараттың бауыр клеткаларына онынан әсер ететіндігі қан сарысуының биохимиялық көрсеткіштерін (аминотрансферазалардың белсенділігі) зерттеу нәтижелері растады.

A.K.Kayinbaeva, S.T. Tuleuhanov, M.K. Murzahmetova, R.S. Utegalieva,
A.N. Aralbayeva, V.K. Turmuhambetova
Hepatoprotective effect of plant origin drug at carbon tetrachloride intoxication

In the in vivo studies have shown that the use of phytopreparation with carbon tetrachloride intoxication increases resistance cellular membranes, reduces the deleterious effect of hepatotoxicant. there is a decrease of peroxidation products and an increase in the activity of superoxide dismutase in microsomal fraction of liver. study of biochemical parameters (aminotransferases activity) confirmed that a phytopreparation has a positive effect on the state of the liver cells.