

©Коллектив авторов

## ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ПОБЕГОВ *CARAGANA JUBATA* (PALL.) POIR. НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ГЕПАТИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО АЦЕТАМИНОФЕНОМ У КРЫС

П.А. Какорин<sup>1\*</sup>, И.В. Бабенкова<sup>2</sup>, Ю.О. Теселкин<sup>2</sup>, Г.В. Раменская<sup>1</sup>, Т.А. Демуря<sup>1</sup>, В.Г. Кукуес<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), 119019, Москва, Малая Трубецкая ул., д. 8, стр. 2; эл. почта: kakorinpa@gmail.com

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

Целью исследования было изучение гепатопротекторной активности растения *Caragana jubata* (Pall.) Poir. (карагана гривастая) на модели острого гепатита, индуцированного у крыс Wistar введением ацетаминофена в дозе 1000 мг/кг. Установлено, что водное извлечение *C. jubata* проявляло выраженное гепатопротекторное действие, сопоставимое с препаратом сравнения “Карсил”. Это проявилось нормализацией биохимических показателей крови (аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, холестерина, общего билирубина) и антиоксидантной активности гомогенатов печени, которую определяли хемилюминесцентным методом, основанным на окислении люминола, индуцированном 2,2'-азобис(2-амидинопропаном). При гистологическом исследовании выявлена нормализация морфофункциональных показателей печени крыс, которые получали водное извлечение караганы гривастой.

**Ключевые слова:** *Caragana jubata*; гепатопротекторная активность; острый гепатит; ацетаминофен; антиоксидантная активность

**DOI:** 10.18097/PBMC20186403241

### ВВЕДЕНИЕ

Карагана гривастая (*Caragana jubata* (Pall.) Poir.), семейство Fabaceae (бобовые) – кустарник высотой 30–100 см с толстыми ветвями, густо покрытыми живыми молодыми черешками и отмершими игольчатыми черешками прошлых лет. В России распространена на Дальнем Востоке, в Восточной Сибири. За рубежом широко произрастает в Монголии и в северной части Китая [1, 2].

*C. jubata* активно используется в народной медицине Восточной Сибири, особенно Иркутской области, юго-западных районов Бурятии и на юго-востоке Тувы при заболеваниях печени и желудка, при атеросклерозе и воспалительных заболеваниях кожи и слизистых [3].

Проведённое нами исследование острой токсичности показало, что в диапазоне однократно вводимых перорально доз 3–7 г/кг раствор лиофилизированного водного извлечения не вызвал гибели мышей [4].

Учитывая, что представители рода *Caragana* являются накопителями фенольных соединений [5], в частности, флавоноидов, ранее нами был проведён анализ полифенольных соединений водного извлечения надземной части *C. jubata* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4, 6]. В качестве основных флавоноидов в водном извлечении караганы были идентифицированы кверцитрин (6,03 мг/г), гиперозид (3,73 мг/г), мирицетин-3-рамнозид (2,04 мг/г), авикулярин (2,39 мг/г), ларицитрин-3-рамнозид (1,79 мг/г), 3-рамнозиды изорамнетина и сиригетина (1,77 мг/г) [4].

Учитывая высокое содержание полифенольных соединений, а также низкую токсичность, *C. jubata* является перспективным источником для изучения её фармакологических свойств. Целью данного исследования было изучение гепатопротекторной активности водного извлечения *C. jubata* на модели острого гепатита у крыс Wistar, индуцированного ацетаминофеном (парацетамолом).

### МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования было использовано водное извлечение из побегов *C. jubata* (заготовленной в Кунгуртугском районе (Республика Тува) весной 2015 г.). Так как сырьё обладало грубой морфологической структурой, в соответствии с рекомендациями общей фармакопейной статьи (ОФС) 1.4.1.0018.15 “Настои и отвары” Государственной фармакопеи XIII изд. (ГФ XIII) для исследования был выбран вид водного извлечения – отвар, который готовили в соотношении 1:10. Экстракцию сырья проводили в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Полученный отвар охлаждали при комнатной температуре в течение 10 мин и процеживали. Полученное водное извлечение упаривали до содержания влаги 40% на ротаторном испарителе BUCHI (Германия) при следующих условиях: разрежение 72±2 мбар, температура холодильника +10±2°C. Из полученной вытяжки готовили лиофилизат, что обеспечивало точность дозирования и длительность хранения свежеприготовленного водного извлечения. Для этого полученную вытяжку замораживали при температуре -24,0±1,0°C. Процесс высушивания проводили

\* - адресат для переписки

в сублимационной сушилке Heto Dry Winner (Дания) при остаточном давлении  $0,1 \pm 0,03$  мбар и комнатной температуре в течение 22–24 ч (влажность 5%). В водном извлечении выход сухого остатка составил 18,2% (ОФС.1.5.3.0006.15 “Определение содержания экстрактивных веществ” ГФ XIII). Полученный лиофилизат водного извлечения из караганы гривастой стандартизовали по ГФ XIII изд. ОФС.1.4.1.0021.15 “Экстракты”.

Исследования гепатопротекторной активности лиофилизата водного извлечения караганы гривастой проведены с использованием модели острого гепатита согласно “Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств” (2012 г.) [7].

Эксперименты осуществляли на 40 аутбредных белых крысах-самцах Wistar массой 200–220 г, полученных из питомника лабораторных животных “КролИнфо” (Московская область, Орехово-Зуевский район). После завершения 14-дневного карантина все животные были случайным образом разделены на следующие группы:

1-я группа (n=10). Контрольная. Крысам с острым гепатитом внутрижелудочно вводили дистиллированную воду.

2-я группа (n=10). Опытная. Крысам с острым гепатитом внутрижелудочно вводили раствор лиофилизата водного извлечения караганы гривастой, разведенного дистиллированной водой в дозе 308 мг/кг (в пересчёте на экстрактивные вещества).

3-я группа (n=10). Сравнения. Крысам с острым гепатитом внутрижелудочно вводили раствор измельчённых драже “Карсил” (“Sopharma”, Болгария), содержащих сухой экстракт расторопши пятнистой, разведенный дистиллированной водой в рекомендованной дозе 140 мг/кг [7].

4-я группа (n=10). Интактная. У крыс не вызывали острый гепатит и не вводили исследуемые препараты.

Продолжительность исследования составила 14 дней. Введение исследуемых веществ животным проводили по схеме “профилактика + лечение”. В течение 7 дней животным опытной группы и группы сравнения внутрижелудочно вводились исследуемые препараты, контрольной группе вводили дистиллированную воду. На 7-й день исследования животным всех групп (кроме интактных) через час после введения препаратов индуцировали острый гепатит. Для индукции острого гепатита использовали ацетаминофен (парацетамол) (ОАО “Фармстандарт-Лексредства”, Россия) в дозе 1000 мг/кг, однократно. После индукции патологии следующие 7 дней животные получали исследуемые препараты в тех же дозах.

На 15-й день всех животных выводили из эксперимента с взятием образцов печени для гистологических исследований и исследования антиоксидантной активности.

Все эксперименты проводились с обязательным соблюдением правил “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях”, Strasbourg (1986).

#### *Измерение биохимических показателей сыворотки крови крыс*

Для оценки функционального состояния печени определяли биохимические показатели крови исследуемых животных: аланинаминотрансферазу (АлАТ), аспартатаминотрансферазу (АсАТ), щелочную фосфатазу (ЩФ), холестерин, общий билирубин.

Образцы крови крыс отбирали из хвостовой вены в объёме 250 мкл на 8 день исследования (после индукции гепатита) и на 13 день (перед завершением исследования). Значения биохимических показателей в сыворотке крови определяли с использованием наборов фирмы “Intermedica” (США) на биохимическом анализаторе фирмы “Biochem” (США).

#### *Исследование антиоксидантной активности гомогенатов печени крыс методом активированной хемилюминесценции 2,2'-азобис(2-амидинопропаном)*

Для определения антиоксидантной активности печень крыс выделяли и промывали холодным (4°C) физиологическим раствором и готовили 10% гомогенаты (масса/объём). Для этого гомогенизировали 250 мг ткани печени в 2,25 мл холодного физиологического раствора и центрифугировали в течение 20 мин при 4000 g, супернатант отделяли и использовали для дальнейших исследований.

Антиоксидантную активность (АОА) гомогенатов печени крыс определяли по ингибированию ими хемилюминесценции (ХЛ) люминола (“Sigma-Aldrich”, США), индуцированной водорастворимыми пероксильными радикалами, образующимися при термическом разложении 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП) (“Sigma-Aldrich”) [8]. Измерение ХЛ проводили на хемилюминометре Lum-1200 (“ДиСофт”, Россия) с программным обеспечением PowerGraph 3,3 Professional. Реакционная среда общим объёмом 1,5 мл имела следующий состав: 10 мкМ люминол, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ АБАП в 50 мМ Трис-НCl буфере, содержащем 0,14 М NaCl, pH 8,0. В качестве стандартного антиоксиданта использовали тролокс (“Sigma-Aldrich”). АОА печени крыс выражали в виде “тролокс-эквивалента” – в микромолях тролокса на 1 г сырой ткани.

#### *Гистологические исследования ткани печени крыс*

Гистологическое исследование было выполнено на ткани печени. Вырезку пласта ткани печени производили сверху вниз по наибольшему длиннику. Полученную ткань размером  $1,5 \times 1,5 \times 0,7$  см помещали в 10%-ный нейтральный забуференный формалин, далее обрабатывали в аппарате гистологической проводки тканей и заливали в парафин. Парафиновые блоки нарезали на роторном микротоме на серийные срезы толщиной 4 мкм, которые затем фиксировали на предметные стёкла, покрытые адгезивом Mainzel Glaser (“Polylysine”, Германия), и инкубировали в термостате при 37°C в течение 12 ч. Полученные препараты депарафинировали, регидратировали, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под покровные стёкла с использованием монтирующей среды (Shandon Mount).

# Методы статистической обработки

Результаты исследования обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней при помощи пакета статистических программ Statistica 10. Различия считались статистически достоверными при уровне различия  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Исследование биохимических показателей сыворотки крови у крыс с острым гепатитом на фоне применения водного извлечения C. jubata и "Карсила"*

В качестве критериев оценки сохранности печёночной ткани и гепатопротекторной эффективности водного извлечения караганы гривастой были исследованы некоторые биохимические показатели сыворотки крови крыс (табл. 1).

На 8-й день исследования после введения гепатотоксина (ацетаминофена) у крыс контрольной группы (по сравнению с интактными) было отмечено значительное повышение уровня печёночных ферментов: АлАТ в 4,5 раза, АсАТ в 6,9 раз, ЩФ в 3,3 раза; холестерина в 2,9 раза, билирубина общего в 4 раза. У крыс опытной группы и группы, получавшей "Карсил", указанные изменения были выражены в меньшей степени, чем у крыс интактной группы. Значения исследованных параметров достоверно отличались от величин контрольной группы.

На 14-й день лечения (спустя 7 дней после введения гепатотоксина и 7 дней введения препаратов) у крыс контрольной группы биохимические показатели были достоверно выше по сравнению с остальными группами животных. Сохранялись повышенные показатели печёночных ферментов: АлАТ в 3,6 раза, АсАТ в 4 раза, ЩФ в 2,7 раза; холестерина в 2,1 раза, билирубина общего в 2 раза. У крыс опытной группы и группы, получавшей "Карсил", по сравнению с крысами интактной группы указанные сдвиги были выражены в меньшей степени и достоверно отличимы от показателей контрольной группы.

Таблица 1. Влияние водного извлечения C. jubata и "Карсила" на биохимические показатели сыворотки крови крыс

Показатель	Группа (n=10)	Интактная	Контрольная	Опытная	Сравнения
8-й день					
АлАТ, Е/л		41,2 $\pm$ 1,5	185,7 $\pm$ 11,2*	75,6 $\pm$ 1,8*,**	69,9 $\pm$ 1,2*,**
АсАТ, Е/л		142,5 $\pm$ 1,7	992,4 $\pm$ 15,7*	324,1 $\pm$ 12,8*,**	332,3 $\pm$ 13,1*,**
ЩФ, Е/л		288,4 $\pm$ 0,87	955,4 $\pm$ 1,09*	648,5 $\pm$ 0,97*,**	667,8 $\pm$ 0,87*,**
Билирубин общий, мкмоль/л		9,1 $\pm$ 0,78	36,4 $\pm$ 1,7*	18,2 $\pm$ 2,3*,**	16,8 $\pm$ 1,5*,**
Холестерин, ммоль/л		1,43 $\pm$ 0,25	4,15 $\pm$ 0,31*	2,53 $\pm$ 0,23*,**	2,55 $\pm$ 0,24*,**
14-й день					
АлАТ, Е/л		40,7 $\pm$ 1,2	145,2 $\pm$ 12,1*	54,9 $\pm$ 4,1*,**	55,4 $\pm$ 3,2*,**
АсАТ, Е/л		141,5 $\pm$ 0,8	573,1 $\pm$ 13,8*	232,1 $\pm$ 11,6*,**	221,5 $\pm$ 16,3*,**
ЩФ, Е/л		270,4 $\pm$ 0,50	745,1 $\pm$ 1,12*	408,6 $\pm$ 0,45*,**	426,1 $\pm$ 0,68*,**
Билирубин общий, мкмоль/л		9,2 $\pm$ 0,21	18,9 $\pm$ 1,32*	12,1 $\pm$ 0,82*,**	10,9 $\pm$ 0,39*,**
Холестерин, ммоль/л		1,41 $\pm$ 0,34	3,59 $\pm$ 0,28*	1,93 $\pm$ 0,3*,**	2,05 $\pm$ 0,22*,**

Примечание. Здесь и в таблице 2 \* -  $p < 0,05$  по отношению к соответствующим показателям интактной группы; \*\* -  $p < 0,05$  по отношению к соответствующим показателям контрольной группы.

Следует отметить, что значения измеряемых показателей у животных, получавших водное извлечение караганы гривастой и "Карсил", хотя и превышали значения аналогичных показателей у интактных животных ( $p < 0,05$ ), тем не менее, были существенно ниже, чем показатели крови контрольных животных ( $p < 0,05$ ). Данные результаты свидетельствуют о меньшем проявлении гепатотоксического действия ацетаминофена на фоне применения караганы гривастой и "Карсила". Карагана гривастая и "Карсил" оказывали профилактическое действие: на фоне их применения исследуемые показатели крови были существенно ниже уже после применения гепатотоксина по сравнению с показателями контрольной группы. При этом достоверных различий между значениями измеряемых показателей у крыс обеих опытных групп зарегистрировано не было, что свидетельствует о сопоставимом гепатопротекторном эффекте водного извлечения караганы гривастой и препарата сравнения "Карсила".

*Результаты изучения антиоксидантной активности методом активированной хемилюминесценции АБАП в гомогенатах печени крыс*

Развитие острого гепатита сопровождалось снижением АОА гомогенатов печени (табл. 2). На 15-е сутки эксперимента этот показатель у крыс контрольной группы был на 37% ниже, чем у интактных животных ( $p < 0,05$ ). У животных, получавших водное извлечение караганы гривастой (опытная группа), достоверных изменений АОА гомогенатов печени, по сравнению с интактными животными, не выявлено. В то же время у животных данной группы АОА гомогенатов печени была в среднем на 39% выше, чем у животных контрольной

Таблица 2. Антиоксидантная активность C. jubata и "Карсила" в гомогенатах печени крыс ( $M \pm m$ )

Группа животных, n=10	АОА гомогената печени, мкмоль/г сырой ткани ( $M \pm m$ )
Интактная	4,64 $\pm$ 0,12
Контрольная	2,92 $\pm$ 0,10*
Опытная	4,07 $\pm$ 0,17**
Сравнения	3,94 $\pm$ 0,19*,**

группы ( $p < 0,05$ ). Что касается группы сравнения, то изучаемый показатель был больше (на 35%,  $p < 0,05$ ), чем у крыс контрольной группы, достоверно не отличался от показателя опытной группы, однако был меньше (на 15%,  $p < 0,05$ ), чем у животных интактной группы.

Известно, что ацетаминофен инициирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), активируя выработку свободных радикалов, которые способствуют разрушению мембран клеток печени [9, 10]. Поэтому снижение АОА печени животных контрольной группы связано с расходом эндогенных антиоксидантов в печени крыс данной группы на фоне активации свободнорадикальных реакций, индуцированных введением гепатотоксина. АОА печени животных опытной группы была выше, чем у контрольной. Это связано с тем, что в исследуемом растении содержатся флавоноиды, которые являются сильными антиоксидантами.

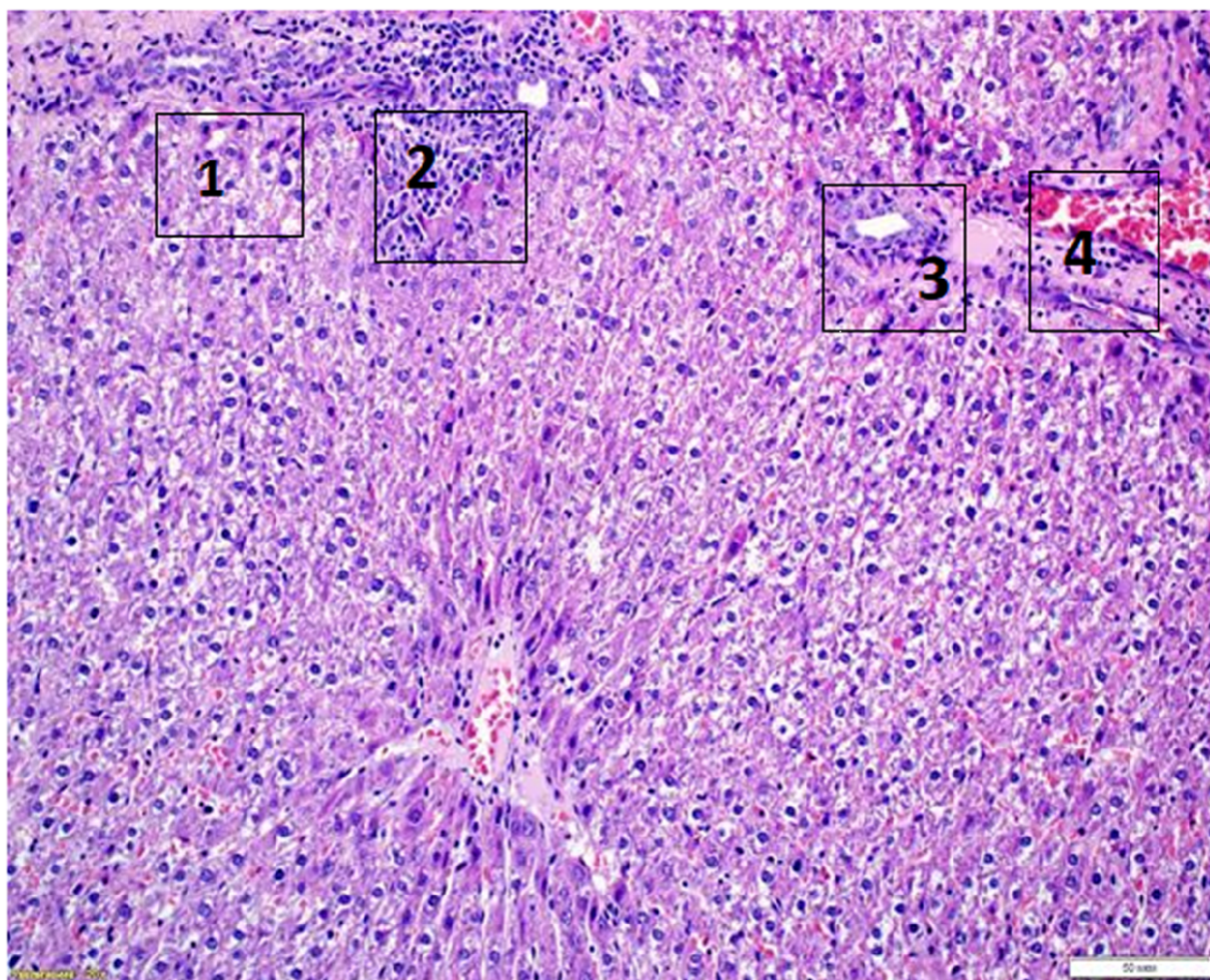
#### Результаты гистологических исследований

У животных контрольной группы цитоархитектоника печени была сохранена, однако обнаружен некроз отдельных гепатоцитов и выраженное полнокровие синусоидов. Гепатоциты средних и периферических отделов

долек в состоянии гидропической, вплоть до баллонной дистрофии; отмечены внутридольковые и перипортальные воспалительные инфильтраты, построенные из лимфоцитов, плазмоцитов, макрофагов и с примесью лейкоцитов; в ряде случаев обнаружены перипортальные некрозы гепатоцитов и расширение портальных трактов (рис. 1). Морфологическая картина соответствует токсическому (лекарственному) гепатиту.

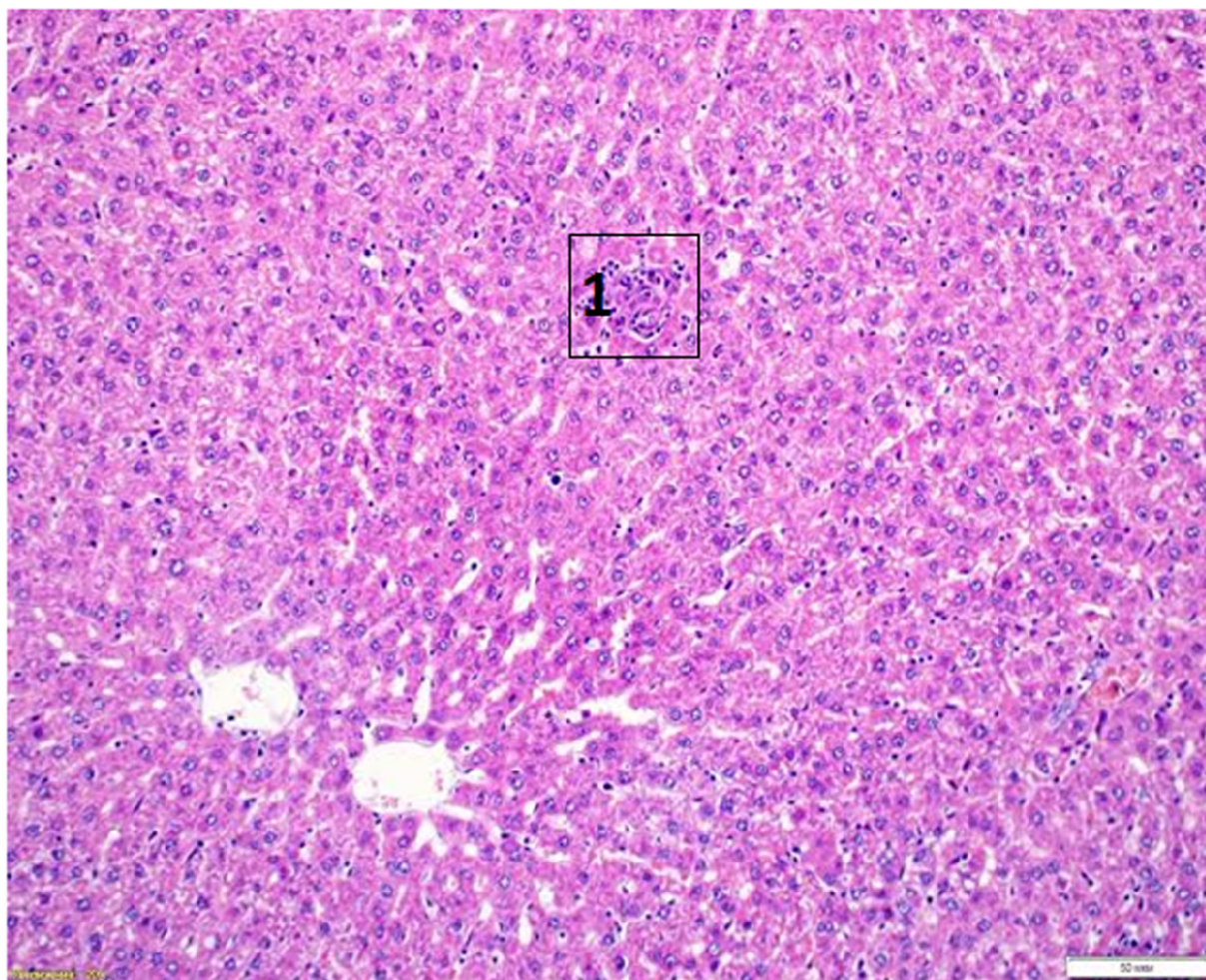
В печени животных опытной группы и группы сравнения цитоархитектоника сохранена: гепатоциты с чёткими ровными ядрами образовывали печёночные балки, синусоиды местами полнокровны, триады окружены тонкой прослойкой соединительной ткани. У гепатоцитов периферических отделов отмечены единичные явления гидропической дистрофии, обнаружены единичные внутридольковые лимфоидные инфильтраты, отмечалась гиперплазия купферовских клеток (рис. 2).

В контрольной группе гистологическая картина соответствует токсическому гепатиту с выраженным воспалением, тогда как в опытной группе и группе сравнения – минимальному воспалению, показывая, что данные препараты положительно влияют на нормализацию морфофункционального состояния печени.



**Рисунок 1.** Микропрепарат печени контрольных животных (увеличение  $\times 200$ ). 1 - гидропическая дистрофия гепатоцитов, 2 - некроз гепатоцитов, 3 - перипортальный инфильтрат, 4 - полнокровие сосудов.





**Рисунок 2.** Микропрепарат печени опытных животных (увеличение  $\times 200$ ). 1-лимфоцитарный инфильтрат.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. Лиофилизат водного извлечения караганы гривастой в дозе 308 мг/кг оказывает выраженное гепатопротекторное действие, сопоставимое с действием препарата сравнения “Карсил”.

2. Антиоксидантная активность гомогенатов печени у животных с острым гепатитом, получавших лиофилизат водного извлечения караганы гривастой, увеличивалась на 39% по сравнению с животными контрольной группы.

3. При биохимическом исследовании сыворотки крови крыс обнаружено, что водное извлечение караганы гривастой оказывает лечебно-профилактическое действие, так как на фоне его применения исследуемые показатели крови по сравнению с показателями контрольной группы были существенно ниже после применения гепатотоксина и в конце исследования.

4. При гистологическом исследовании выявлена нормализация морфофункциональных показателей печени крыс, которые получали водное извлечение караганы гривастой.

Таким образом, можно предположить, что гепатозащитное действие караганы гривастой обусловлено тем, что флавоноиды растения ингибируют

процессы ПОЛ, вызванные ацетаминофеном, обладают мембраностабилизирующей активностью и повышают эффективность эндогенной антиоксидантной системы печени [11, 12]. Результаты проведенного исследования можно рекомендовать для дальнейшего изучения фармакологических свойств караганы гривастой и разработки готовых лекарственных форм на основе этого растения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шелепова О.В., Куклина А.Г., Виноградова Ю.К. (2015) Политематический научный журнал Кубанского ГАУ, **114**, 1-16.
2. Meng Q., Niu Y., Niu X., Roubin R.H., Hanrahan J.R. (2009) J. Ethnopharm., **124**, 350-368.
3. Гиляров М.С. (1986) Биологический энциклопедический словарь, М.: Сов. энциклопедия, 831.
4. Какорин Р.А., Перова И.Б., Рыбакова Е.Д., Эллер К.И., Раменская Г.В., Павлова Л.А., Теселкин Ю.О. (2018) Pharm. Chem. J., **51**, 1014-1020.
5. Партиллаев В.В., Танхаева Л.М., Оленников Д.Н. (2013) Хим. раст. сырья, №1, 143-150.
6. Перова И.Б., Жогова А.А., Черкашин А.В., Эллер К.И., Раменская Г.В., Самылина И.А. (2014) Хим.-фарм. журн., **48**(5), 32-39.

7. Венгеровский А.И., Удот В.В., Рейхарт Д.В., Дыгай А.М. (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств Т.1 (Миронов А.Н., ред.), Гриф и К, Москва, 710-717.
8. Чехани Н.Р., Теселкин Ю.О., Павлова Л.А., Козин С.В., Любичкий О.Б. (2012) Вестн. РГМУ, №6, 66-68.
9. Яценков А.И. (2013) Бюлл. сиб. мед., 12(1), 80-86.
10. Дремза И.К., Чецевик В.Т., Забродская С.В., Максимчик Ю.З., Судникович Е.Ю., Лапина Е.А., Заводник И.Б. (2010) Биомед. химия, 56, 710-718.
11. Куркин В.А., Куркина А.В., Авдеева Е.В. (2013) Фунд. иссл., 11(9), 1897-1901.
12. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Рахманин Ю.А. (2004) Биомед. химия, 50, 605-611.

Поступила: 12. 02. 2018.  
Принята к печати: 15. 05. 2018.

# HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT FROM *CARAGANA JUBATA* (PALL.) POIR. SHOOTS IN THE MODEL OF ACUTE HEPATITIS INDUCED BY ACETAMINOPHEN IN RATS

*P.A. Kakorin<sup>1</sup>, I.V. Babenkova<sup>2</sup>, Y.O. Teselkin<sup>2</sup>, G.V. Ramenskaya<sup>1</sup>, T.A. Demura<sup>1</sup>, V.G. Kukes<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),  
8-2 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia; e-mail: kakorinpa@gmail.com  
<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The aim of the study was to investigate the hepatoprotective activity of an aqueous extract of *Caragana jubata* (Pall.) Poir. Acute experimental hepatitis was induced by acetaminophen administration of 1000 mg/kg. Studies were conducted in white Wistar rats. The aqueous extract of *C. jubata* demonstrated the hepatoprotective effect, comparable to that of the reference preparation "Carcil". This was manifested by the normalization of biochemical blood parameters (ALT, AST, alkaline phosphatase, cholesterol, total bilirubin) and antioxidant activity of liver homogenates, determined by the method based on oxidation of luminol induced by 2,2'-azo-bis-2-amidinopropane. Normalization of morphofunctional indices was also shown in a histological study of liver of rats that received aqueous extract from *C. jubata*.

**Key words:** *Caragana jubata*; hepatoprotective activity; acute hepatitis; acetaminophen; antioxidant activity