

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА ИЗ ЯГОД ЖИМОЛОСТИ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ У КРЫС

С. Е. Фоменко¹, Н. Ф. Кушнерова^{1, 2}, В. Г. Спрыгин¹, Т. В. Момот^{2, 3}

Исследовали действие экстракта из высушенного отжима ягод жимолости *Lonicera edulis Turcz.* и коммерческого препарата сравнения «Легалон®» на весовые и биохимические показатели печени крыс после интоксикации четыреххлористым углеродом. Экстракт способствовал снижению содержания общих липидов и удельной массы печени, восстановлению активности аланинаминотрансферазы крови и лизосомальных ферментов печени. В крови крыс повышалась активность супероксиддисмутазы, уровень восстановленного глутатиона, антирадикальная активность и снижалось количество малонового диальдегида. Действие экстракта из плодов жимолости в восстановлении функции печени оказалось более эффективным, чем легалона.

Ключевые слова: четыреххлористый углерод; печень; экстракт из ягод жимолости; легалон.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы проводится большое количество исследований по использованию фруктов и ягод в терапевтических целях для улучшения естественных функций организма и профилактики различных заболеваний. Ягоды являются одним из главных источников потенциального здоровья, благодаря входящим в их состав биологически активным веществам, таким как полифенольные соединения (антоцианы, проантоцианидины, флавоноиды и др.) [12]. Эти компоненты, являясь вторичными метаболитами растений, эволюционно адаптированы к употреблению человеком в пищу. Они обладают противоопухолевыми, антимикробными, антиаллергическими, противовоспалительными, антимутагенными и другими свойствами [7, 15]. Их биологическая активность обусловлена способностью фенольных структур принимать активное участие в окислительно-восстановительных реакциях, помогая организму сохранить гомеостаз, путем захвата реактивных кислородных и азотных радикалов [2]. Высокая антиоксидантная способность полифенолов позволяет защитить организм от проявлений оксидативного стресса, который является одной из основных причин развития болезней цивилизации (диабет, гипертония, псориаз, ожирение, цирроз печени и др.). В связи с этим актуальным становится выделение по-

лифенольных комплексов из отходов переработки растительного сырья и использование их для получения лекарственных препаратов.

Среди ягодных культур особый интерес вызывает синяя съедобная жимолость, которая относится к семейству *Caprifoleaceae*. Это традиционная культура, издавна используемая в народной медицине. Дикорастущие виды жимолости широко представлены на севере России (Дальний Восток, Камчатка, Сахалин), а также в странах Северо-Восточной Азии, Японии. Ягоды жимолости являются потенциальным источником полифенольных соединений. Так, в ягодах камчатской жимолости (*Lonicera caerulea var. kamtschatica*) содержится 33,5 % фенольных соединений, включая антоцианы (18,5 %), олиго- и полимерные флавоноиды, фенольные кислоты [15]. При этом на культуре тканей (*in vitro*) было показано, что фенольная фракция из жимолости в тестируемой дозе (1 – 1000 мг/мл) не являлась токсичной для гепатоцитов крыс и эндотелиальных клеток человека [10]. В дальневосточной жимолости съедобной содержание общих полифенолов в ягодах может варьировать от 775 до 2000 мг/100 г сухого вещества [16], а количество антоцианов достигать более 50 % от общих полифенолов [9], что свидетельствует о перспективности создания на их основе растительных препаратов с высокой антиоксидантной активностью. И хотя ягоды жимолости давно используются в пищевой индустрии благодаря своему уникальному вкусу и питательным компонентам, сообщений в литературе об их биологической активности недостаточно. В частности, отсутствуют сведения о гепатопротекторных свойствах жимолости в условиях острого и хронического воздействия гепатотоксических агентов. Кроме того, использование отхо-

¹ ФГБУН Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева ДВО РАН, 690041, Владивосток, ул. Балтийская, 43; e-mail: sfomenko@poi.dvo.ru.

² Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины, 690950, Владивосток, ул. Суханова, 8.

³ ФГБУН Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

дов от переработки ягодного сырья на пищевых производствах, в частности отжим после отделения сока (кожица, семена, оси соцветий и др.), особенно если это конечный бросовый продукт в технологической цепи, является экономически выгодным.

Целью настоящей работы явилось исследование гепатопротекторных свойств экстракта, выделенного из высушенного отжима ягод дальневосточной жимолости (*Lonicera edulis Turcz.*), в условиях интоксикации крыс четыреххлористым углеродом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Высушенный отжим из ягод жимолости (после отделения сока) экстрагировали 40 % этиловым спиртом методом реперколяции, при этом из 1 кг сырья выход экстракта составлял 1 л. Согласно нашим и литературным данным [9, 10], при определении химического состава экстракта доминирующей среди биологически активных соединений являлась полифенольная фракция, поэтому стандартизацию экстракта проводили по суммарному содержанию общих полифенолов (ПФ) и дозу вводимого вещества рассчитывали в мг суммы общих ПФ на 1 кг массы животного. Суммарное содержание общих ПФ в экстракте, определенное с помощью реактива Folin-Ciocalteu [14], составляло 2,5 г/100 мл экстракта. Полученные результаты сопоставимы с представленными в литературе данными [9, 10]. Значительное содержание общих ПФ в экс-

тракте обуславливает высокий уровень антирадикальной активности, который составлял $115 \pm 0,11$ ммоль тролокса/л. Данный показатель оценивали по способности экстракта восстанавливать органический катион-радикал ABTS⁺ [13], и количественно выражали в эквивалентах тролокса — водорастворимого аналога витамина Е.

Эксперимент проводили на белых крысах-самцах линии Вистар массой 200 – 220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при естественном освещении и постоянной температуре 20 – 22 °С. Интоксикацию животных четыреххлористым углеродом (CCl₄) осуществляли согласно руководству для проведения доклинических испытаний [6]: крысам внутривенно через зонд вводили 50 % масляный раствор CCl₄ из расчета 1,25 мл/кг в течение 4 сут. Контрольным животным вводили оливковое масло в сопоставимой дозе. В качестве эталонного препарата сравнения использовали “Легалон®140” (MADAUS AG, Германия). Лекарственная форма — капсулы (1 капсула Легалон-140 содержит 173 – 188,7 мг сухого экстракта из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum*), эквивалентно 140 мг силимарина).

Водный раствор экстракта из плодов жимолости (предварительно освобожденный от спирта путем упаривания в вакууме и высушенный в вакуумном эксикаторе до постоянной массы) животным вводили внутривенно через зонд в дозе 100 мг/кг общих полифенолов, легалон — в виде взвеси в 1 % крахмальном

Влияние экстракта из жимолости и полифенольного препарата “Легалон” на весовые и биохимические параметры печени и крови крыс после интоксикации четыреххлористым углеродом ($M \pm m$)

| Показатель | Группа животных | | | | |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | 1-я Контроль | 2-я CCl ₄ | 3-я Депривация | 4-я Депривация + жимолость | 5-я Депривация + легалон |
| Масса животных, г | 216,0 ± 2,33 | 180,8 ± 2,16 ³ | 180,8 ± 2,90 ³ | 217,0 ± 2,13 ^{в, е} | 200,5 ± 2,79 ^{3, в} |
| Удельная масса печени, г/100 г массы | 4,29 ± 0,19 | 5,12 ± 0,24 ¹ | 5,79 ± 0,19 ² | 4,30 ± 0,08 ^{в, д} | 4,93 ± 0,19 ^{1, б} |
| Общие липиды, мг/г ткани | 43,11 ± 2,86 | 140,69 ± 4,87 ³ | 120,46 ± 4,33 ³ | 45,95 ± 2,26 ^{в, г} | 56,16 ± 3,44 ^в |
| АлАТ, ед/л | 44,60 ± 2,17 | 295,74 ± 8,65 ³ | 140,72 ± 5,38 ³ | 48,32 ± 2,66 ^{в, е} | 63,24 ± 2,19 ^{3, в} |
| β-глюкозидаза, нмоль/мин/г | 0,19 ± 0,01 | 0,13 ± 0,02 ¹ | 0,12 ± 0,01 ³ | 0,18 ± 0,01 ^в | 0,17 ± 0,01 ^б |
| β-галактозидаза, нмоль/мин/г | 0,41 ± 0,03 | 0,97 ± 0,08 ³ | 0,72 ± 0,06 ³ | 0,46 ± 0,02 ^{в, д} | 0,55 ± 0,02 ^{2, а} |
| МДА, нмоль/мл плазмы | 4,22 ± 0,16 | 7,53 ± 0,40 ³ | 9,06 ± 0,23 ³ | 4,53 ± 0,07 ^{в, е} | 5,40 ± 0,11 ^{3, в} |
| АРА, ед. тролокса/мл плазмы | 10,93 ± 0,33 | 7,68 ± 0,48 ³ | 6,64 ± 0,20 ³ | 10,60 ± 0,29 ^{в, г} | 9,50 ± 0,25 ^{2, б} |
| СОД, у. е. | 706,85 ± 16,96 | 253,42 ± 9,50 ³ | 211,20 ± 9,90 ³ | 708,08 ± 9,41 ^{в, е} | 590 ± 12,00 ^{3, в} |
| Г-SH, мкмоль/г гемоглобина | 6,60 ± 0,17 | 2,94 ± 0,08 ³ | 3,40 ± 0,11 ³ | 6,93 ± 0,07 ^{в, е} | 6,10 ± 0,15 ^{1, в} |

Различия статистически значимы по сравнению:

с контролем ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$;

с 3-й группой (депривация) ^а $p < 0,05$, ^б $p < 0,01$, ^в $p < 0,001$;

с 5-й группой (легалон) ^г $p < 0,05$, ^д $p < 0,01$, ^е $p < 0,001$.

АлАт – аланинаминотрансфераза, МДА - малоновый диальдегид, АРА - антирадикальная активность, СОД — супероксиддисмутаза, Г-SH — восстановленный глутатион.

клеястере в той же дозе [1]. В ходе эксперимента были выделены следующие группы по 10 крыс в каждой: 1-я — контроль; 2-я — внутрижелудочное введение CCl_4 в течение 4 дней; 3-я — введение CCl_4 в течение 4 дней с последующей отменой (депривация) в течение 7 дней; 4-я — введение экстракта из жимолости в период депривации в течение 7 дней; 5-я — введение легалона в период депривации в течение 7 дней. Крыс выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением Правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В. И. Ильичева ДВО РАН. Исследовали весовые характеристики животных и печени, биохимические показатели печени и крови.

Кровь для исследований собирали из шейной вены животных в вакуэты с 1 % раствором гепарина. Печень после извлечения промывали в физиологическом растворе, высушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали и далее использовали для исследования биохимических параметров. Экстракты общих липидов из ткани печени готовили по методу J. Folch, et al. [8]. Количество общих липидов в липидном экстракте определяли весовым способом в мг на 1 г ткани. Состояние антиоксидантной системы крови и печени оценивали по величине антирадикальной активности [13], активности супероксиддисмутазы [11], уровня восстановленного глутатиона и малонового диальдегида [4]. Определение активности аланинаминотрансферазы в крови крыс проводили с помощью наборов Sigma Diagnostics (USA), активности β -глюкозидазы и β -галактозидазы ткани печени по методу [3]. Полученные данные обрабатывали с помощью параметрического критерия Стьюдента (t), используя статистическую программу InStat (Graph Pad Software Inc. USA, 2005) со встроенной процедурой проверки соответствия выборки закону нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение CCl_4 сопровождалось снижением массы животных на 16 % ($p < 0,001$) и возрастанием удельной массы печени на 19 % ($p < 0,05$) (таблица), которое обусловлено увеличением количества общих липидов в 3,3 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. В печени отмечалась зернистость жировых включений, что свидетельствует о выраженной жировой инфильтрации, характерной при интоксикации CCl_4 . Кроме того, отмечалось повышение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в плазме крови более чем в 6,6 раза ($p < 0,001$). Фермент АлАТ является биохимическим маркером печеночных повреждений, а увеличение его активности связано с выходом фермента в кровь в результате повышения проницаемости мем-

бран гепатоцитов. Одновременно увеличивалась активность цитозольного фермента лизосом β -галактозидазы в 2,4 раза ($p < 0,001$) и снижалась активность мембраносвязанного фермента β -глюкозидазы на 32 % ($p < 0,05$), что также связано с нарушением структурной организации мембран клеточных органелл и их проницаемости. Активность антиоксидантных ферментов и собственно антиоксидантов, которые ингибируют образование свободных радикалов, имеет существенное значение для защиты клеток печени от воздействия CCl_4 и его метаболитов. Так, активность супероксиддисмутазы (СОД), ключевого фермента антиокислительной защитной системы, после интоксикации CCl_4 была в 2,8 раза ниже ($p < 0,001$) контрольного уровня. Также отмечалось снижение количества восстановленного глутатиона (Γ -SH) на 55 % ($p < 0,001$), который, являясь собственно антиоксидантом, действует как внутри клетки, так и вне ее. Такие нарушения в показателях системы антиоксидантной защиты можно определить как ее напряжение. Кроме того, выражено истощение антирадикальной защиты организма, что подтверждается снижением антирадикальной активности (АРА) в плазме крови на 30 % ($p < 0,001$). Нарушения защитной системы печени сопровождалась также увеличением количества малонового диальдегида (МДА) на 78 % ($p < 0,001$). Данный показатель характеризует высокую активность перекисного окисления жирных кислот, входящих в состав мембранных фосфолипидов, что сопровождается повышением проницаемости мембран гепатоцитов.

Через 7 дней после отмены CCl_4 (3-я группа, период депривации) весовые характеристики и большинство изученных биохимических параметров к норме не вернулись. В печени отмечалась зернистость жировых включений, то есть сохранялась жировая инфильтрация, характерная для токсического гепатита. Количество общих липидов печени превышало контрольный уровень в 2,8 раза ($p < 0,001$). Проницаемость мембран гепатоцитов также не восстановилась в период депривации, о чем свидетельствует повышенная активность АлАТ в плазме крови в 3 раза по сравнению с контролем. Следует отметить факт еще большего снижения активности мембраносвязанной β -глюкозидазы и сохранения повышенной активности β -галактозидазы в сравнении с контролем, что свидетельствует о нарушении структурной целостности лизосомальных мембран и их проницаемости. В период депривации также сохранялось рассогласование ферментов антиоксидантной защиты. Так, активность СОД оставалась на уровне показателей 2-й группы (в 3 раза ниже контрольного уровня). Пул восстановленного глутатиона относительно 2-й группы (интоксикация CCl_4) несколько увеличился, но относительно контроля сохранялся достоверно пониженным (на 48 %, $p < 0,001$). Отмечалась высокая величина МДА (в 2,2

раза относительно контроля; $p < 0,001$), которая превышала таковую во 2-й группе на 18 % ($p < 0,001$). Все эти факторы являются результатом низкого антиоксидантного и антирадикального статуса организма в период депривации, в пользу чего свидетельствует еще большее снижение АРА (на 39 %; $p < 0,001$) в плазме крови по сравнению с контрольными величинами. Таким образом, отмена токсиканта в течение 7 дней сопровождается неполным восстановлением функционального состояния печени крыс. По нашему мнению, период отмены токсического агента является стрессом для организма, так как стали еще больше различия с контролем и со 2-й группой для некоторых изученных биохимических показателей, а также удельной массы печени.

При введении животным в период отмены CCl_4 экстракта из отжима ягод жимолости (4-я группа) проявлялась нормализация исследованных параметров печени, что свидетельствует о мембраностабилизирующих свойствах экстракта. В то же время при введении препарата сравнения “Легалон®” (5-я группа) была выражена лишь тенденция к нормализации. Так, масса тела у животных 5-й группы была ниже контроля на 8 % ($p < 0,05$). При этом удельная масса печени и содержание общих липидов превышали контроль на 15 и 30 % ($p < 0,05$) соответственно. Активности АЛАТ и β -галактозидазы были выше контрольного уровня на 42 % ($p < 0,001$) и 34 % ($p < 0,01$), что указывает на сохраняющуюся повышенную проницаемость мембран гепатоцитов и лизосом. Исследование величин антирадикальной и антиоксидантной систем защиты при введении растительных препаратов (4-я и 5-я группы) выявило достоверное увеличение активности СОД, величины АРА, Г-SH и снижение уровня МДА по сравнению с соответствующими показателями в группе 3 (депривация). Можно предположить, что антиоксидантную и антирадикальную функцию выполняли ПФ, входящие в состав растительных препаратов, как физиологически совместимые антиоксиданты [5] и “ловушки” свободных радикалов. Однако при введении легалона уровни Г-SH, АРА, активность СОД оставались достоверно ниже контроля (в среднем на 8 – 16 %), а содержание МДА превышало его значения на 28 % ($p < 0,001$).

Таким образом, введение экстракта из отжима жимолости и легалона сопровождалось более эффективным восстановлением изученных показателей печени, чем при обычной депривации без применения растительных комплексов. В то же время действие экстракта из отжима жимолости в восстановлении функции печени оказалось более эффективным, чем легалона в отношении исследуемых параметров. Известно, что в состав легалона входит активная группа изомерных флавоноидных соединений (силибинин, силикрестин, силидианин), не образующих олигомерных форм. Видимо, экстракт из отжима жимолости, будучи ком-

плексом олигомерных и полимерных полифенольных веществ, демонстрирует антиоксидантные свойства в большей степени, чем мономеры легалона.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт из отжима ягод жимолости, содержащий полифенольный комплекс, при внутрижелудочном введении в дозе общих ПФ 100 мг/кг крысам с экспериментальным CCl_4 -гепатитом проявляет выраженные антиоксидантные и гепатозащитные свойства и по параметрам антиоксидантной активности превосходит препарат сравнения легалон, в среднем, на 10 – 17 %.

2. Экстракт из отжима ягод жимолости является перспективным источником полифенольных комплексов для создания гепатопротекторных препаратов с высокой антиоксидантной и антирадикальной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Венгеровский, И. В. Маркова, А. С. Саратиков, *Ведомости фарм. комитета*, № 2, 9 – 12 (1999).
2. Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко, Л. Н. Лесникова и др., *Вопр. питания*, **80**(1), 64 – 69 (2011).
3. Р. В. Меркурьева, Г. Л. Билич, Р. П. Нарциссов, *Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и фермент-субстратных систем различной клеточной локализации*, Москва (1982).
4. Т. П. Новгородцева, Э. А. Эндакова, В. И. Янькова, *Руководство по методам исследования параметров системы “Перекисное окисление липидов — антиоксидантная защита” в биологических жидкостях*, ДВГУ, Владивосток (2003).
5. В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(5), 37 – 47 (2013).
6. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред), Москва (2005).
7. D. Bagchi, C. K. Sen, M. Bagchi, M. Atalay, *Biochemistry*, Moscow, **69**(1), 75 – 80 (2004).
8. J. Folch, M. Less, G. H. Sloane-Stanley, *Biol. Chem.*, **226**, 497 – 509 (1957).
9. A. Jurgoński, J. Juśkiewicz, Z. Zdunczyk, *Nutrition*, **29**(6), 898 – 902 (2013).
10. I. Palikova, K. Valentova, I. Oborna, J. Ulrichova, *J. Agric. Food Chem.*, **57**(15), 6584 – 6589 (2009).
11. F. Paoletty, D. Adinucci, A. Mocali, A. Caparrini, *Anal. Biochem.*, **154**(2), 536 – 541 (1986).
12. O. Paredes-Lopez, M. L. Cervantes-Ceja, M. Vigna-Perez, T. Hernandez-Perez, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **65**, 299 – 308 (2010).
13. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9 – 10), 1231 – 1237 (1999).
14. V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos, *Meth. Enzymol.*, **299**, Academic Press Inc., San Diego (1999).
15. I. Svarcova, J. Heinrich, K. Valentova, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, **151**(2), 163 – 174 (2007).
16. A. Wojdyło, P. N. Jáuregui, A. A. Carbonell-Barrachina, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **61**(49), 12072 – 12084 (2013).

HEPATOROTECTIVE ACTIVITY OF HONEYSUCKLE FRUIT EXTRACT IN CARBON TETRACHLORIDE INTOXICATED RATS

S. E. Fomenko^{1*}, N. F. Kushnerova^{1,2}, V. G. Sprygin¹, and T. V. Momot^{2,3}

¹ V. I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far-East Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Baltiiskaya 43, Vladivostok, 690041 Russia;

² School of Biomedicine, Far-East Federal University, ul. Sukhanova 8, Vladivostok, 690091 Russia;

³ A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far-East Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia;

* e-mail: sfomenko@poi.dvo.ru.

We have studied the effects of the extract from the dry pomace of honeysuckle fruits *Lonicera edulis* Turcz. and commercial reference preparation Legalon on weight and biochemical liver indexes in rats upon carbon tetrachloride intoxication. The extract of honeysuckle fruits favored a decrease in the total lipid content, reduced specific liver weight, and facilitated restoration of the activity of serum alanine aminotransferase and liver lysosomal enzymes. In the blood of rats, the extract increased superoxide dismutase activity, decreased glutathione level, enhanced antiradical activity, and reduced the level of malonic dialdehyde. The effect of administration of honeysuckle fruits pomace extract on restoration of the liver function was more pronounced than the effect of Legalon.

Keywords: carbon tetrachloride intoxication; liver; extract of honeysuckle fruits; legalon