

© Коллектив авторов, 2022

УДК 615.322

Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Шишканов Д.В., Сайбель О.Л.

Изучение гепатопротекторной активности топинамбура травы экстракта сухого на модели токсического гепатита у крыс

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,
117216, Россия, Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

Введение. Для выполнения программы по импортозамещению лекарственных препаратов перспективным направлением является создание оригинальных отечественных гепатопротективных средств. Топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*) - перспективный род растения для детального изучения с целью создания на его основе современных лекарственных средств для лечения заболеваний печени. **Цель работы** - изучение влияния сухого экстракта травы топинамбура на состояние печени крыс в условиях экспериментального токсического гепатита.

Методика. В отделе экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР проведено фармакологическое изучение топинамбура травы экстракта сухого. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в экстракте составляет $5,13 \pm 0,44$ %. Исследовано влияние экстракта на состояние печени крыс в условиях экспериментального токсического гепатита. В работе использовали 50 белых нелинейных крыс самцов массой 200-240 г. Экстракт вводили животным внутривентрикулярно в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг в течение 5 сут, препаратом сравнения был Силимар в дозе 100 мг/кг. Экспериментальный гепатит у крыс вызывали однократным введением подкожно 50% масляного раствора тетрахлорметана в объеме 0,4 мл на 100 г, через 1 ч после последнего введения исследуемых веществ. Через 48 ч после введения тетрахлорметана брали кровь из хвостовой вены крыс, получали сыворотку и проводили её биохимический анализ. Затем крыс подвергали эвтаназии в CO_2 камере, извлекали печень для проведения патогистологического исследования.

Результаты. Введение экстракта травы топинамбура в дозе 500 мг/кг и препарата сравнения Силимар в дозе 100 мг/кг снижало токсическое действие тетрахлорметана на печень лабораторных животных, что подтверждено результатами биохимического исследования сыворотки крови подопытных животных и при гистологическом исследовании их печени. Внутривентрикулярное введение крысам экстракта топинамбура в дозе 100 мг/кг приводило к незначительному снижению активности ферментов-маркеров функционального состояния и не влияло на морфологическую структуру печени опытных животных.

Заключение. Сухой экстракт травы топинамбура в дозе 500 мг/кг обладает гепатопротекторным действием и является перспективным объектом для дальнейшего углубленного фармакологического изучения.

Ключевые слова: гепатопротекторная активность; модель тетрахлорметанового гепатита; трава топинамбура; *Helianthus tuberosus* L

Для цитирования: Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Шишканов Д.В., Сайбель О.Л. Изучение гепатопротекторной активности топинамбура травы экстракта сухого на модели токсического гепатита у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 138-142.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.138-142

Участие авторов. Лупанова И.А., Ферубко Е.В.-- планирование и разработка эксперимента; Сайбель О.Л. – ответственная за изучение химического состава экстракта; Курманова Е.Н., Шишканов Д.В. – проводили эксперимент на модели токсического гепатита и обрабатывали результаты; все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Лупанова Ирина Александровна, канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований, e-mail: lupanova@vilarnii.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.07.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Lupanova I.A., Ferubko E.V., Kurmanova E.N., Shishkanov D.V., Saybel O.L.

Hepatoprotective activity of the *Helianthus tuberosus* L. extract in carbon tetrachloride-induced liver damage in rats

All-Russia Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants,
Grina St. 7, Bldg. 1, Moscow 117216, Russian Federation

Introduction. Some bioactive substances (e.g., flavonoids, phenolic acids, sesquiterpenes, polysaccharides, and amino acids) in *Helianthus tuberosus* L. leaves have antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant activity. These active ingredients may provide effective alternatives to imported hepatoprotective medicines. Aim of the study was to assess the hepatoprotective activity of extracts of the *Helianthus tuberosus* L. dried herb in male rats with carbon tetrachloride intoxication.

Methods. The composition of *Helianthus tuberosus* L. herb dry extract includes hydroxycinnamic acids and flavonoids. The predominant phenolic compound is chlorogenic acid. The hepatoprotective activity of the H. tuberosus extract doses of 100 and 500 mg/kg body weight was compared in carbon tetrachloride-treated rats. The rats were divided into five groups with ten animals in each. The first group consisted of intact animals; the second group received carbon tetrachloride, the third and the fourth groups received the H. tuberosus extract at a dose of 100 or 500 mg/kg plus carbon tetrachloride (TCM). The fifth group received Silymar[®] as a comparator drug. 48 hours after the TCM administration, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) activities and total bilirubin concentration were measured. Pathomorphology of rat liver was studied by histological methods using section staining with hematoxylin and eosin.

Results. Prior H. tuberosus extract administration reduced the toxic TCM effect on liver cells in experimental toxic hepatitis. In animals treated with H. tuberosus at a dose of 500 mg/kg body weight, the ALT activity was decreased by 31 %, the AST activity by 20%, the alkaline phosphatase activity by 19%, and the total bilirubin concentration by 16% as compared with the respective variables in the Silymar[®] group of animals that were not treated with the extract. The histological study showed that the H. tuberosus extract administration to animals at a dose of 500 mg/kg reduced dystrophic changes in hepatocytes.

Conclusion. The H. tuberosus extract at a dose of 500 mg/kg has a pronounced hepatoprotective effect and it is promising for further pharmacological study for developing hepatoprotective drugs.

Keywords: carbon tetrachloride treatment model; *Helianthus tuberosus* L.; hepatoprotective activity

For citation: Lupanova I.A, Ferubko E.V., Kurmanova E.N., Shishkanov D.V., Saybel O.L. Hepatoprotective activity of the *Helianthus tuberosus* L. extract in carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 138-142. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.138-142

Author's contribution: Lupanova I.A., Ferubko E.V. – planning and development of the experiment; Saibel O.L. – responsible for studying the chemical composition of the extract; Kurmanova E.N., Shishkanov D.V. – conducted the experiment on the model of toxic hepatitis and processed the results; all authors participated in discussion of the results and in writing the article. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: Irina A. Lupanova, Ph.D. (Biol.), Head of Preclinical research Center, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow, Russia), e-mail: lupanova@vilarnii.ru

Financing. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about authors:

Lupanova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>

Kurmanova O.N., <https://orcid.org/0000-0002-9243-5268>

Ferubko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>

Received 18.07.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Для выполнения программы по импортозамещению лекарственных препаратов перспективным направлением является создание оригинальных отечественных гепатопротективных средств, которые могли бы конкурировать с зарубежными препаратами, в настоящее время представляющими большую часть Российского фармацевтического рынка [1,2].

Интерес в качестве гепатопротекторов представляют средства растительного происхождения, к достоинствам которых относят сочетание комплекса биологически активных веществ, что определяет широкий спектр фармакологического воздействия, возможность потенцировать эффект на фоне низкой токсичности и длительного применения [3]. В этом плане интерес представляет топинамбур (*Helianthus tuberosum* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*) –

перспективное растение для детального изучения с целью создания на его основе современных лекарственных средств. Разнообразный состав БАВ топинамбура обуславливает фармакологическое действие различных средств, получаемых из клубней и надземной части данного растения. Биологически активные вещества, содержащиеся в клубнях и надземной части растения (стебли, листья и цветки) активно используются в животноводстве [4]. Из литературных данных известно, что инулин, содержащийся в клубнях, стимулирует рост *Bifidobacteria* и *Lactobacillus*, за счет чего регулируется микрофлора кишечника и улучшается иммунитет [5, 6]. Кроме того, надземная часть топинамбура содержит ряд биологически активных веществ, таких как флавоноиды, фенольные кислоты, терпеноиды и некоторые аминокислоты, которые проявляют антиоксидантную, противовоспалительную, противоопухолевую и антибактериальную активность [7, 8]. Стоит отметить, что содержание основных биологически активных веществ в траве топинамбура сильно различается и зависит от сорта, фазы роста и времени заготовки [9].

В то же время в источниках литературы нет сведений о гепатопротекторной активности экстрактов надземной части топинамбура обыкновенного. Цель исследования – изучение влияния сухого экстракта травы топинамбура на состояние печени крыс в условиях экспериментального токсического гепатита.

Методика

Сухой экстракт получен из травы топинамбура, заготовленного в фазу конца вегетации растения в Московской и Тверской областях в 2018-2021 гг. Способ получения экстракта включает стадию экстракции сырья 70%-м спиртом, концентрирования полученных извлечений, очистку от липофильных соединений и сушку. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в экстракте составляет $5,13 \pm 0,44$ %. В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС было установлено, что фенольный комплекс травы топинамбура представлен вторичными метаболитами, относящимися к гидроксикоричным кислотам и флавоноидам. Доминирующими веществами являются хлорогеновая, изохлорогеновая А и изохлорогеновая С кислоты [10].

При проведении эксперимента использовали белых нелинейных крыс-самцов массой 200-240 г в количестве 50 особей. Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации и «Руководству по проведению доклинических

исследований лекарственных средств» (2012 г.). Животных содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР, протокол №62 от 01.12. 2021.

Опытные животные были разделены на 5 групп по 10 особей в каждой: 1-я группа интактные, 2-я – контрольные, получавшие на протяжении 5 сут внутрижелудочно очищенную воду в объеме эквивалентном исследуемым веществам. 3-я и 4-я группы – опытные, которые получали исследуемое вещество (сухой экстракт травы топинамбура внутрижелудочно в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг соответственно) на протяжении 5 сут., 5-я группа животных на протяжении 5 сут получала внутрижелудочно препарат сравнения – субстанцию Силимара в дозе 100 мг/кг, суспендированную в 1% крахмальном геле. Через 1 ч после завершающего введения исследуемых веществ у животных всех опытных групп (за исключением интактной) моделировали токсический тетрахлорметановый гепатит однократным введением подкожно 50%-го масляного раствора тетрахлорметана в объеме 0,4 мл на 100 г.

Через 48 ч после введения тетрахлорметана из хвостовой вены крыс брали для исследования кровь; биохимический анализ сыворотки крови проводили на анализаторе биохимическом «Dirui CS-T240». В сыворотке крови определяли активность ферментов-маркеров функционального состояния гепатоцитов: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), экскреционного фермента маркера холестаза – щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержание общего билирубина и холестерина

После завершения всех манипуляций крыс подвергали эвтаназии в CO₂ камере и извлекали печень. Для оценки морфологических изменений печень животных фиксировали в 10%-ном забуференном нейтральном формалине с последующей стандартной спиртовой проводкой и заливкой в парафин по общепринятой методике. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4-6 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином. Структурные изменения печени оценивали с помощью микроскопа «Axio LAB.A1» с цифровой камерой «AxioCam ERc5s» с программным обеспечением для анализа изображений (Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 и ZEN 2012).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета «Statistica 13», значимость различий между группами оценивали по критерию U Манна-Уитни. Различия между анализируемыми показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния сухого экстракта травы топинамбура на активность маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов в сыворотке крови крыс представлены в **таблице**.

Введение опытным животным тетрахлорметана вызвало выраженные изменения активности индикаторных ферментов цитолитического синдрома (АЛТ, АСТ), экскреционного фермента маркера холестаза щелочной фосфатазы, уровней общего билирубина и холестерина. Наблюдалось статистически значимое увеличение активности этих ферментов-маркеров функционального состояния печени.

Внутрижелудочное введение крысам экстракта топинамбура в дозе 100 мг/кг приводило к незначительному снижению активности ферментов-маркеров, в то время как введение экстракта в дозе 500 мг/кг существенно снижало: активность АЛТ на 31 %, АСТ на 20 %, щелочной фосфатазы на 19 %, содержание общего билирубина 16%, холестерина на 38 %. Препарат сравнения Силимар в дозе 100 мг/кг также оказывал выраженное гепатопротекторное действие, снижая активность «печеночных» ферментов: АЛТ на 31 %, АСТ на 25 %, ЩФ на 20 %, содержание общего билирубина на 15 %, общего холестерина на 34 %.

Гепатопротекторная активность экстракта была подтверждена и при гистологическом исследовании печени крыс. Оценивая морфологическую структуру печени опытных животных, можно сделать заключе-

ние, что тетрахлорметан проявлял выраженное гепатотоксическое действие, вызывая изменения гепатоцитов по типу вакуольной и жировой дистрофии. Введение топинамбура травы экстракта сухого в дозе 500 мг/кг и препарата сравнения Силимар® в дозе 100 мг/кг существенно снижало токсическое действие тетрахлорметана на печень лабораторных животных.

Установленная в опытах *in vivo* гепатопротекторная активность экстракта может быть обусловлена входящим в ее состав комплексом фенольных соединений. Согласно данным литературы гепатопротекторное действие многих лекарственных средств связано с их антиоксидантной и противовоспалительной активностью [11].

Так, Wang и соавт. (2017) в экспериментах *in vivo* показали, что добавление флавоноидов из травы топинамбура (45 мг/кг сухого вещества) в рацион овец значительно увеличивало антиоксидантный потенциал сыворотки крови и печени. Кроме того, активность ферментов: супероксиддисмутазы в сыворотке крови, печени и селезенке, активность каталазы и глутатионпероксидазы в сыворотке крови и селезенке также повышались, при этом содержание малонового диальдегида в сыворотке крови и печени было снижено [12].

Доминирующими компонентами экстракта травы топинамбура являются гидроксикоричные кислоты, и хлорогеновая кислота, преобладающая в нём, возможно, вносит значительный вклад в его гепатопротекторную активность. Venditti и соавт. (2015) пред-

Таблица/ Table

Влияние сухого экстракта травы топинамбура на активность маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов в сыворотке крови крыс при CCl₄ гепатите

Effect of dry extract of topinambur herb on the activity of markers of morphofunctional state of hepatocytes in the blood serum of rats with CCl₄ hepatitis

| Группа животных Animal Group n=10 | Холестерин, ммоль/л Cholesterol, mmol/l | Билирубин, общ. мкмоль/л Bilirubin, total μmol/l | ЩФ, Е/л Alkaline phosphatase u/l | АЛТ, Е/л ALT, u/l | АСТ, Е/л AST, u/l |
|---|--|--|--|----------------------|----------------------|
| Интактные Intact | 1,72±0,15 | 2,12±0,03 | 400,0±6,97 | 54,03±0,81 | 94,14±6,51 |
| Контроль Control | 0,99±0,02 | 2,89±0,57 | 582,6±19,27 | 113,51±7,75 | 173,17±2,10 |
| Топинамбура Topinambur 100 мг/кг (mg/kg) | 1,02±0,04* | 2,86±0,01* | 573,8±3,60* | 109,05±1,14* | 165,20±2,42* |
| Топинамбура Topinambur 500 мг/кг (mg/kg) | 1,37±0,02* | 2,44±0,02* | 474,1±5,11* | 78,33±2,16* | 138,00±0,52* |
| Силимар Silimar 100 мг/кг (mg/kg) | 1,33±0,01* | 2,47±0,08* | 469,1±6,60* | 79,11±2,13* | 130,28±1,12* |

Примечание. * $p \leq 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с контролем

Note. * $p < 0.05$ – differences are statistically significant compared to the control

положили один из механизмов действия хлорогеновой кислоты, заключающийся в том, что она «поглощает» активные формы кислорода, образующиеся при диете с высоким содержанием жиров, подавляя воспаление, что приводит к снижению резистентности к инсулину, накоплению жира и увеличению массы тела, в то время как ингибирование рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR γ), предотвращает развитие стеатоза печени [13].

Заключение

Таким образом, топинамбура травы экстракт сухой в дозе 500 мг/кг обладает гепатопротекторным действием, ослабляя повреждающее действие тетрахлорметана, что подтверждено биохимическими и гистологическими исследованиями, и является перспективным объектом для дальнейшего углубленного фармакологического изучения.

Данная работа проведена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме: «Направленный скрининг, оценка фармакологической активности и безопасности биологически активных веществ и фармацевтических композиций на их основе» (FGUU-2022-0010).

Литература

(п.п. 4-9; 19; 12-13 см. References)

1. Вельмяйкина Е. И. Анализ ассортимента иммунотропных лекарственных препаратов. *Вестник ПГФА*. 2012; № 9: 19 – 21.
2. Куркин В. А., Петрухина И.К. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов. *Фундаментальные исследования*. 2014; 11(2): 366-371.
3. Мизина П.Г. Растительное и минерально-биологически активные комплексы для медицинских технологий оздоровления. Москва; Наука; 2021.
10. Сайбель О.Л. Исследование фенольных соединений топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2022; 2(25): 7-13. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-02-02/>
11. Новиков В.Е., Климкина Е.И. Фармакология гепатопротекторов. *Обзоры по клинической и лекарственной терапии*. 2005; 4(1): 2-20.

References

1. Velmyaikina E. I. Analiz assortimenta immunotropnih lekarstvennih preparatov assortimenta immunotropnykh lekarstvennykh preparatov. *Vestnik PGFA*. 2012; № 9: 19 – 21. (in Russian)
2. Kurkin V.A., Petruhina I.K. Aktualnie aspekty sozdaniya importozamestchaayushih lekarstvennih rastitelnykh preparatov. *Fundamentalnie issledovaniya*. 2014; 11(2): 366-371. (in Russian)
3. Mizina P.G. *Rastitelnie i mineralnie biologicheski aktivnie kompleksi dlya meditsinskih tehnologiy zdorov'esberejeniya*. Moscow; Nauka; 2021. (in Russian)
4. Kays SJ, Nottingham SF. Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 10(4): 352e3. <https://doi.org/10.1080/10496500903245503>.
5. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. 1998; 19(2): 281e5. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.2.281>.
6. Kaur N, Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biomechanics*. 2002; 27(7): 703e14. <https://doi.org/10.1007/BF02708379>.
7. Pan L, Sinden MR, Kennedy AH, Chai H, et al. Bioactive constituents of *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke). *Phytochemistry Letters*. 2009; 2(1): 15e8. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.10.003>.
8. Yuan X, Gao M, Xiao H, Tan C, Du Y. Free radical scavenging activities and bioactive substances of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves. *Food Chemistry*. 2012; 133: P. 10e4.
9. Wang Y, Zhao Y., Xue F., Nan X., et al. Nutritional value, bioactivity, and application potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a neotype feed resource. *Animal Nutrition*. 2020; 6: 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.001>
10. Saybel O.L. Issledovanie fenolnykh soedineniy travi topinambura (*Helianthus tuberosus* L.). *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2022; 2(25): 7-13. (in Russian) <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-02-02/>
11. Novikov V.E., Klimkina E.I. *Pharmakologiya hepatoprotektorov. Obzori po klinicheskoy i lekarstvennoy terapii*. 2005; 4(1): 2-20. (in Russian)
12. Wang YM, Zhao JQ, Yang JL, Idong PT, Shi YP. Antioxidant and a α -glucosidase inhibitory ingredients identified from Jerusalem artichoke flowers. *Natural Product Research*. 2017; 33(4): 1e5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1399379>.
13. Venditti A, Bianco A., Frezza C., Conti F., et al. Essential oil composition polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *Aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. *Industrial Crops and Products*. 2015; 77: P. 353–363.

Сведения об авторах:

Лупанова Ирина Александровна, канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: lupanova@vilarnii.ru;

Ферубко Екатерина Владимировна, доктор мед. наук, зав. отделом экспериментальной фармакологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Курманова Елена Николаевна, науч. сотр. отдела экспериментальной фармакологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Шишканов Дмитрий Васильевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела экспериментальной фармакологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Сайбель Ольга Леонидовна, канд. фарм. наук, руководитель Центра химии и фармацевтической технологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений».