<http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2618-8783-2018-3-2-18-24>

ГЕПАТОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА SILYMARIN ПРИ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

Горчакова О.В.

Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

Аннотация. В публикации предоставлена информация о гепатотропных свойствах Silymarin, изученных на экспериментальной модели токсичного гепатита. Предварительное введение Silymarin способствовало сокращению некроза гепатоцитов, уменьшению активности трансаминаз, что указывает на гепатопротективный эффект. Гепатопротективный эффект препарата Silymarin является условием превентивной коррекции острого токсического гепатита.

Ключевые слова: Silymarin, печень, токсичный гепатит, морфология, фитотерапия.

Введение. Патология печени широко распространена среди современных болезней, поскольку печень подвержена действию многих этиопатогенетических факторов (вирусный, токсичный, аутоиммунный и т.д.) [1]. Печень – ведущий орган в обеспечении метаболической детоксикации токсичных веществ. В медицине для сохранения структуры и функции печени существует большая группа лекарственных средств, именуемых гепатопротекторами, которые используются при патологии печени [1, 2]. Требования для идеального гепатопротектора были сформулированы R. Preisig [2]. Это – разнообразная группа лекарственных препаратов, которые предотвращают разрушение клеточных мембран и стимулируют регенерацию гепатоцитов. Среди патентованных лекарственных средств Silymarin является самым популярным препаратом [3, 4]. Несмотря на то, что гепатопротекторы используются давно, данные по их эффективности противоречивы [5]. Очевидно, что исследование Silymarin позволит оценить его эффект на поврежденную печень. Результат имеет практическое значение в прогнозе дальнейшей деятельности печени после перенесенного токсического гепатита и коррекции.

Цель исследования состояла в том, чтобы оценить свойства растительного лекарственного средства Silymarin в превентивной терапии токсичного гепатита.

Материалы и методы. Эксперимент был выполнен на 80 крысах Wistar массой 200-250 г. Животные получали при свободном доступе к воде стандартную диету (экструдированный комбикорм ПК-120-1). Эксперимент на животных был проведен в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики, изложенных на Женевской конференции (1971), а также в документах «О гуманном обращении с экспериментальными животными» (Минздрав РФ № 775 от 12.08.1977, № 267 от 19.06.2003),

«Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985).

Модель острого повреждения печени была создана внутривенной инъекцией четыреххлористого углерода в дозе 1 мг/кг (40 животных). Половина животных предварительно получала Silymarin 120 мг/кг в течение 2 недель. 20 крыс составляли контрольную группу. В работе использовали стандартизированный препарат Legalon SIL (Silymarin), который содержит комплекс алкалоидов, биофлавоноидов, включая флавоноиды силибинина (А и В), силикристина, силидианина, изосилибинина (А и В) и т.д. [6]. Силибинин (silybinin) – наиболее активный компонент препарата, и он определяет терапевтический эффект растительного препарата.

Повреждение гепатоцитов (некроз, дистрофия) любой этиологии сопровождается увеличением активности ферментов. Активность аланинаминотрансферазы (ALT) и аспаратаминотрансферазы (AST) определяли в сыворотке колориметрическим методом Reitman–Frankel.

Печень была изучена гистологическим методом. Взятые кусочки органа фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Затем следовала классическая схема проводки и заливки материала в парафин с последующим изготовлением гистологических срезов и их окраской гематоксилином и эозином, реактивом Н. Schiff. При морфометрии учитывали строение ацинуса – структурно-функциональной единицы печени. Область некроза гепатоцитов определяли относительно общей площади ацинуса печени.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с помощью лицензионной программы StatPlus, AnalystSoft Inc. Проводили расчет средней арифметической с определением ее стандартной (среднеквадратической) ошибки. Проверку принадлежности к нормальному распределению осуществляли с помощью построения гистограммы и для большей уверенности производили расчет критерия Колмогорова–Смирнова и сопутствующих показателей. Уровень статистической значимости различий между данными двух групп признавали при $p \leq 0,05$, что является достаточным для медико-биологических исследований.

Результаты и обсуждение. После инъекции четыреххлористого углерода происходит токсическое повреждение печени и развивается эндотоксикоз. Повреждение гепатоцитов сопровождается изменением активности ферментов и разрушением клеточных мембран (синдром цитолиза). В печени отмечены дистрофические изменения гепатоцитов и центростремительные некрозы после инъекции четыреххлористого углерода. Площадь некроза гепатоцитов составила в среднем $16,4 \pm 2,8\%$ (Рис. 1). Многие гепатоциты подвержены гидропической вакуолизации. Активность цитоплазматических ферментов увеличивается в несколько раз в сыворотке крови крыс. Активность трансаминаз – маркер повреждения печени.

Предварительный прием растительного лекарственного средства Silymarin предотвращает некроз гепатоцитов после инъекции четыреххлористого углерода. В ацинусе печени у животных, получавших Silymarin, площадь некроза уменьшается в 2,2 раза до $6,84-9,47 \pm 2,2\%$ (после инъекции четыреххлористого углерода $33,02-45,91 \pm 3,4\%$).

Ослабление дистрофических и некротических изменений гепатоцитов связаны с уменьшением активности трансаминаз AST (в 1,5 раза) и ALT (в 3 раза) после приема препарата Silymarin (рис. 1). Уменьшение активности трансаминаз указывает на гепатопротективный эффект. Подобный факт уменьшения активности трансаминаз в сыворотке крови после приема Legalon SIL (Silymarin) наблюдали при хронических заболеваниях печени, безалкогольном стеатогепатите и др. [1, 2, 4].

Рис. 1. Активность аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) с демонстрацией площади некроза гепатоцитов после Silymarin и четыреххлористого углерода (CCl₄)

В России Silymarin традиционно называют гепатопротектором [1, 5]. Но существует точка зрения, что неправильно называть Silymarin гепатопротективным препаратом, заменяя его на термин гепатотропное растительное лекарственное средство [3, 7]. Наши исследования показали, что профилактический прием Silymarin ослабляет эффект токсичных веществ на печень. Доказательством этого является сокращение площади некроза гепатоцитов и уменьшение активности аминотрансфераз (Рис. 1). Уменьшение активности трансаминаз наблюдается после терапии различных хронических заболеваний печени [1, 4]. Это предполагает наличие у препарата Silymarin гепатопротективных свойств. Механизм действия Silymarin не был изучен достаточно. Известно, что активный компонент Silybinin проявляет антиокислительные свойства, что предотвращает разрушение клеточных мембран при действии свободных радикалов и липоксигеназы [5]. Свойства гепатопротективного препарата определяются антитоксическим действием, стабилизацией клеточных мембран и противовоспалительным эффектом [7–9]. Биофлавоноиды многих лекарственных растений имеют подобный эффект на печень [8, 9]. Все это увеличивает устойчивость печени к действию различных токсикантов и уменьшает повреждение, вызванное четыреххлористым углеродом. Гепатопротективные свойства препарата Silymarin определяют положительные эффекты в профилактике и терапии токсичного гепатита, что важно для медицинской практики.

Заключение. Растительный лекарственный препарат Silymarin имеет сложный механизм действия при остром токсичном гепатите. Показано наличие гепатопротективных свойств у препарата Silymarin, проявляющихся в уменьшении активности трансаминаз и площади некроза гепатоцитов в печени в условиях токсического гепатита. Наблюдаемые эффекты Silymarin расширяют понимание о механизме действия и дополняют рекомендации для медицинской практики.

Исследование проведено при поддержке Rotapharm S.p. A.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ивашкин В.Т., Буеверов А.О., Богомолов П.О. и др. Рациональное медикаментозное лечение в гепатологии. Руководство для практикующих врачей. М. 2009. 1–296.
2. Preisig R. Supplements to the editorial «Liver protection therapy». Schweiz Rundsch Med. Prax. 1970. 59: 1559–1560.
3. Flora K.D., Rosen H.R., Benner K.G. The use of naturopathic remedies for chronic liver disease. Am. J. Gastroenterol. 1996. 91: 2654–2655.
4. Ahmed-Belkacem A., Ahnou N., Barbotte L. et al. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. Gastroenterology. 2010. 138: 1112–1122.
5. Матвеев А.В., Коняева Е. И., Курченко В.П., Гепатопротективные свойства силимарина. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2011. 2: 130–135.
6. Lee D.Y., Liu Y. Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, isolated from Silybum marianum (Milk thistle). J. Nat. Prod et al. 2003. 66: 1171–1174.
7. Kuntz E., Kuntz H.-D. Hepatology. Textbook And Atlas 3Ed. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2008. 1–937.
8. Гаскина Т.К., Горчаков В.Н., Курилович С.А. Ангиопротективный эффект катергена при экспериментальном повреждении печени. Бюл. exper. биол. и мед. 1989. 7: 28–30.
9. Горчаков В.Н., Гаскина Т.К. Влияние больших доз стандартизированного силимарина при токсичном повреждении печени в клинической практике. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012. 9: 71–79.

HEPATOTROPIC PROPERTIES OF HERBAL REMEDY SILYMARIN AT LIVER PATHOLOGY

Gorchakova O.V.

Institute of clinical and experimental Lymphology – branch of Institute of Cytology and Genetics of Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Annotation. In this publication, we provide additional information on the hepatotropic properties of Silymarin according to the data obtained on the model of toxic hepatitis. Pathological changes of liver was caused by toxic hepatitis. The pretreatment by Silymarin promoted to the reduction of necrosis of hepatocytes after injection of carbon tetrachloride. The decrease of transaminases activity indicates a hepatoprotective effect of Silymarin. We have received evidence of hepatoprotective effect of Silymarin, this is one of the conditions for the effectiveness of the liver after acute hepatitis.

Key words: Silymarin, liver, toxic hepatitis, morphology, phytotherapy.

Introduction. Liver pathology is the most common among modern diseases, as the liver is affected by many etiopathogenetic factors (viral, toxic, autoimmune, etc.) [1]. The liver is the

leading organ in providing detoxification of the body in the metabolism of most toxic substances. Hepatoprotectors are the main group of drugs, they are used to treat liver diseases [1, 2]. The requirements for an ideal hepatoprotector were formulated by R. Preisig [2]. It is a diverse group of drugs that prevent the destruction of cell membranes and stimulate the regeneration of hepatocytes. Silymarin is the most popular drug among over-the-counter drugs [3, 4]. Despite the fact that hepatoprotectors have been used for a long time, data on their effectiveness are contradictory [5]. It is obvious that the study of the effect of Silymarin will characterize the liver in the pathology. The result is of practical importance in predicting the combined activity of the liver.

The aim of the study was to assess properties of herbal remedy Silymarin for correction of toxic hepatitis.

Materials and methods. The experiment was performed on 80 Wistar rats weighing 200-250 g. The Animals were obtained standard diet (extruded feed PK-120-1) under free access to water. The experiment was conducted in accordance with the "International recommendations for medical and biological research using animals" (1985) and in accordance with the order of the Ministry of health of the Russian Federation № 267 from 19.06.2003.

The model of acute liver damage was created by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride at a dose of 1 mg/kg (40 animals). Half of the animals were pre-given inside Silymarin 120 mg/kg for 2 weeks. 20 rats were in the control group. We used the reference hepatotropic drug Legalon Sil (Silymarin). It contains a mixture of alkaloids, bioflavonoids in Milk thistle seeds (*Silybum marianum* L.), including flavonoids silibinin (A and B), silychristin, silydianin, isosilybin (A and B) etc. [6]. Silybinin is the most active component, and it determines the therapeutic effect of the herbal drug.

Damage to hepatocytes (necrosis, dystrophy) of any etiology is accompanied by an increase in enzyme activity. Alanine and aspartate aminotransferase activity was determined in serum by colorimetric method of Reitman–Frankel.

The liver was studied by histological method. Taken pieces of organ were fixed in 10% neutral formalin. Next, we made a classic scheme of wiring and pouring the material into paraffin, followed by the preparation of histological sections with hematoxylin and eosin, H. Schiff's reagent stain. Liver acinus is defined as the structural and functional unit, we took into account in morphometry. We determined the area of hepatocytes necrosis in relation to the total area of liver acinus.

Statistical data processing was performed with licensed statistical software package StatPlus Pro 2009, AnalystSoft Inc. Data were expressed as average arithmetic with definition of a standard (mean square) error. Belonging to normal distribution was defined when calculating criterion of Kolmogorov–Smirnov and the accompanying indicators. In work the correlation analysis with definition of a correlation coefficient of Brave–Pearson is used. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

Results and Discussion. There is a development of endotoxycosis after injection of carbon tetrachloride. We note toxic damage to the liver. Toxic injury of hepatocytes is followed by disturbance of activity of fermental systems and destruction of cellular membranes (a cytolysis

syndrome). There are dystrophic changes in hepatocytes and centrolobular necrosis after injection of carbon tetrachloride. The area of hepatocytes necrosis averaged $16.4 \pm 2.8\%$ (Fig. 1). However, many hepatocytes are not destroyed, and swell and subjected to hydropic vacuolization. The activity of cytoplasmic enzymes (ALT and AST) increases several times in the blood serum of rats. The activity of transaminases is a marker of liver damage.

The pretreatment by Silymarin promoted to the reduction of necrosis of hepatocytes after injection of carbon tetrachloride. There is a reduction of 2.2 times the relationship of the area of necrosis to the acinus area in the group of animals receiving Silymarin to $6.84-9.47 \pm 2.2\%$ (after injection of carbon tetrachloride $33.02-45.91 \pm 3.4\%$).

The weakening of dystrophic and necrotic changes of hepatocytes is associated with a decrease in the activity of transaminases AST (in 1.5 times) and ALT (in 3 times) after intake a Silymarin drug. The decrease of transaminases activity indicates a hepatoprotective effect of Silymarin. A similar fact of decrease in serum transaminases activity after taking Legalon Sil (Silymarin) was observed in chronic liver diseases, nonalcoholic steatohepatitis etc. [1, 2, 4].

Fig. 1. Activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) with demonstration of hepatocyte necrosis area after Silymarin and carbon tetrachloride (CCl₄)

Silymarin is traditionally referred to hepatoprotectors in Russia [1, 5]. It is considered wrong to call Silymarin a hepatoprotective drug and it is proposed to use the term hepatotropic herbal remedy [3, 7]. Our studies have shown that preventive intake of Silymarin weakens the effect of toxic substances on the liver. Evidence of signs are a reduction the area of hepatocytes necrosis and a decrease of aminotransaminases activity (Fig. 1).

The decrease of transaminase activity is observed in the treatment of various chronic liver diseases [1, 4]. This suggests that Silymarin has hepatoprotective properties. The mechanism of action of Silymarin has not been studied enough. It is known that silybinin has antioxidant properties, which prevents the destruction of cell membranes under the action of free radicals and lipoxygenase [5]. Hepatoprotective properties of the drug are determined by a combination of antitoxic, membrane-stabilizing, anti-inflammatory effects [7–9]. All this increases the liver's resistance to toxic substances.

Detection of hepatoprotective properties of Silymarin is of great importance for practice. This reduces the toxic effect of carbon tetrachloride. Bioflavonoids of many medicinal plants have a similar effect on the liver [8, 9]. Hepatotropic properties of Silymarin determine the positive effects in the development of toxic hepatitis.

Conclusion. Silymarin has a complex mechanism of action in acute toxic hepatitis. We have shown the presence of hepatotropic effect of Silymarin. There is a decrease of transaminases activity with a decrease of necrosis area of hepatocytes in the liver with toxic hepatitis after receiving Silymarin. We consider the changes in the liver as morphological equivalents of the toxic effect of carbon tetrachloride and increase of the level of detoxification in the liver region. The observed effects of Silymarin expand the understanding of the mechanism of action and complement the recommendations for use in medical practice.

Acknowledgements: Supported by the Rotapharm S.p.A.

REFERENCES

1. Ivashkin V.T., Bueverov A.O., Bogomolov P.O. et al. Rational drug therapy in hepatology. Guidance for practitioners. M. 2009. 1–296.
2. Preisig R. Supplements to the editorial «Liver protection therapy». Schweiz Rundsch Med. Prax. 1970. 59: 1559–1560.
3. Flora K.D., Rosen H.R., Benner K.G. The use of naturopathic remedies for chronic liver disease. Am. J. Gastroenterol. 1996. 91: 2654–2655.
4. Ahmed-Belkacem A., Ahnou N., Barbotte L. et al. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. Gastroenterology. 2010. 138: 1112–1122.
5. Matveev A.V., Konyaeva E. I., Kurchenko V.P., Shchekatikhina A.S. Hepatoprotective properties of Silymarin. Experimental and clinical gastroenterology. 2011. 2: 130–135.
6. Lee D.Y., Liu Y. Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, isolated from *Silybum marianum* (Milk thistle). J. Nat. Prod et al. 2003. 66: 1171–1174.
7. Kuntz E., Kuntz H.-D. Hepatology. Textbook And Atlas 3Ed. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2008. 1–937.
8. Gaskina T.K., Gorchakov V.N., Kurilovich S.A. Angioprotective effect Katergen in experimental liver damage. Bull. experim. biol. med. 1989. 7: 28–30.
9. Gorchakov V.N., Gaskina T.K. The Possibility of high doses of standardized Silymarin in toxic liver damage in clinical practice. Experimental and clinical gastroenterology. 2012. 9: 71–79.