ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ ИЗ НАТИВНОЙ И ДИСПЕРГИРОВАННОЙ БЕРЕСТЫ БЕРЕЗЫ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Шарапов В.И., Грек О.Р., Лабетская В.В., Мишенина С.В.

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

STUDY OF THE HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF EXTRACTS FROM NATIVE AND DISPERSED BIRCH BARK IN CASE OF CARBON TETRACHLORIDE INTOXICATION

Sharapov V.I., Grek O.R., Labetskaya V.V., Mishenina S.V.

Novosibirsk State Medical University

АННОТАЦИЯ

На крысах-самцах изучено гепатопротекторное действие водно-спиртовых экстрактов, полученных из сырья бересты нативной (ЭБН) и предварительно диспергированной с размером частиц 100–300 нм (ЭБД). Животных разделили на 14 групп по 10 особей в каждой. Группы 1, 2 – интактные; 3, 4 – контроль (тетрахлорметан); 5, 6 – предварительно в течение 5 дней однократно внутривенно вводили ЭБН в дозе 50 мг/кг, на 6-й день вводили 50% масляный раствор CCl_4 в дозе 0,2 мл/100 г внутривенно; 7, 8 – ЭБД в дозе 50 мг/кг + CCl_4 ; 9, 10 – ЭБН в дозе 100 мг/кг + CCl_4 ; 11, 12 – ЭБД в дозе 100 мг/кг + CCl_4 ; 13, 14 – вводили препарат сравнения карсил в дозе 100 мг/кг + CCl_4 . На 4-е и 7-е сутки после введения CCl_4 животных выводили из эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о гепатопротекторном эффекте ЭБН и ЭБД при интоксикации тетрахлорметаном, что выразилось в уменьшении объемной плотности некрозов на фоне профилактического введения препаратов бересты. Более выраженным защитным эффектом по сравнению с карсилом обладает ЭБН в дозе 100 мг/кг. Профилактическое введение ЭБД в дозах 50 и 100 мг/кг не только предупреждало развитие некрозов в печени, но и, в отличие от карсила, активировало в восстановительном периоде внутриклеточные процессы репаративной регенерации, что подтверждается увеличением численной плотности дублерных гепатоцитов.

Ключевые слова: экстракт бересты березы, интоксикация тетрахлорметаном, гепатопротекторный эффект, крысы.

ABSTRACT

The hepatoprotective effect of aqueous alcoholic extracts obtained from the raw materials of native birch bark (NBBE) and previously dispersed to a particle size of 100–300 nm (DBBE) was studied in male rats. The animals were divided into 14 groups of 10 animals each. Groups 1, 2 – intact; 3, 4 – control (carbon tetrachloride); 5, 6 – previously, for 5 days, NBBE was injected once intragastrically at a dose of 50 mg/kg, on the 6th day, a 50 % oil solution of CCl_4 was injected at a dose of 0,2 ml/100 g abdominally; 7, 8 – DBBE at a dose of 50 mg/kg + CCl_4 ; 9, 10 – NBBE at a dose of 100 mg/kg + CCl_4 ; 11, 12 – DBBE at a dose of 100 mg/kg + CCl_4 ; 13, 14 – the comparison drug carsil was injected at a dose of 100 mg/kg + CCl_4 . On the 4th and 7th day after the injection of CCl_4 , the animals were removed from the experiment. The data obtained indicate the hepatoprotective effect of NBBE and DBBE in carbon tetrachloride intoxication, which was expressed in the necrosis volume density decrease due to their preliminary preventive injection. NBBE at a dose of 100 mg/kg has a more significant protective effect compared to Carsil. Prophylactic injection of DBBE at doses of 50 and 100 mg/kg not only prevented the development of necrosis in the liver, but unlike Carsil, it activated intracellular processes of reparative regeneration in the recovery period, which is confirmed by an increase in the number density of binuclear hepatocytes.

Keywords: birch bark extract, carbon tetrachloride intoxication, hepatoprotective effect, rats.

Автор, ответственный за переписку

Corresponding author

Мишенина Светлана Владимировна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
E-mail: m-svetlana@ngs.ru

Mishenina Svetlana Vladimirovna: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: m-svetlana@ngs.ru

© ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, 2021

ВВЕДЕНИЕ

Четыреххлористый углерод (тетрахлорметан) как гепатотропный яд используется для моделирования острого токсического повреждения печени. Развивающаяся печеночная недостаточность, связанная с активацией процессов перекисного окисления липидов, продукцией и накоплением высокотоксичных метаболитов, приводит к некрозу гепатоцитов и фиброзу печени [1]. Одним из подходов к коррекции токсических повреждений печени является применение гепатопротекторов растительного происхождения [2], защитное действие которых обеспечивается присутствием в их составе фенолкарбоновых кислот, кумаринов, флавоноидов [3]. Однако они оказались недостаточно эффективными при токсических воздействиях на организм [4]. Тритерпеноиды лупанового ряда и его представитель бетулин — пентациклический тритерпеновый спирт — содержатся в больших концентрациях в сухих экстрактах бересты березы [5, 6]. В ранее проведенных исследованиях установлено, что бетулин и его производные обладают широким спектром фармакологической активности [7, 8]. В связи с этим сравнительное изучение гепатопротекторного действия экстрактов, полученных из бересты березы, на модели острой интоксикации тетрахлорметаном является актуальной задачей теоретической и практической медицины.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительное изучение гепатопротекторного эффекта экстрактов, полученных из нативной и диспергированной бересты березы, на модели интоксикации тетрахлорметаном в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на белых крысах-самцах массой 200–240 г из вивария ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. Крыс содержали по 10 особей в пластмассовых клетках в стандартных условиях вивария при естественном освещении на гранулированном комбикорме ПК 120-3 («Лабораторснаб») и воде *ad libitum*. Протокол исследования соответствовал правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267). На модели острой интоксикации тетрахлорметаном изучали гепатопротекторное действие водно-спиртовых экстрактов, полученных из нативной (ЭБН) и предвари-

тельно диспергированной (ЭБД) механическим способом до размера частиц 100–300 нм бересты березы повислой (*Betula pendula*). Экстракты получали методом исчерпывающей экстракции этанолом различных концентраций при нагревании на водяной бане.

Для изучения гепатопротекторного действия экстрактов бересты животных разделили на группы: 1, 2 — интактные животные; 3, 4 — контроль (введение тетрахлорметана); 5, 6 — предварительное введение ЭБН в дозе 50 мг/кг + CCl_4 ; 7, 8 — введение ЭБД в дозе 50 мг/кг + CCl_4 ; 9, 10 — предварительное введение ЭБН в дозе 100 мг/кг + CCl_4 ; 11, 12 — введение ЭБД в дозе 100 мг/кг + CCl_4 ; 13, 14 — предварительное введение карсила (АО «Софарма», Болгария) в дозе 100 мг/кг + CCl_4 . Экстракты и препарат сравнения карсил вводили внутривентрикулярно однократно в течение 5 сут. Интоксикацию моделировали внутривентрикулярным введением на 6-е сутки 50% масляного раствора CCl_4 в дозе 0,2 мл/100 г массы животного однократно [9]. Животных выводили из эксперимента на 4-е и 7-е сутки после введения CCl_4 декапитацией под эфирным наркозом. Предварительно животных лишали корма на 12 ч, материал забирали в утренние часы.

Для оценки гепатопротекторного действия проводилось светооптическое исследование печени. Ткань фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Образцы из большой доли печени толщиной 5–7 мм подвергали стандартной обработке на гистологическом комплексе MICROM (Германия): обезжировывали в спиртах возрастающей концентрации с последующей заливкой в парафиновые блоки. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином Лилли — Майера и 1% эозином на автомате HMS 70 (время окраски — 1 ч 15 мин). При помощи морфометрической сетки из 25 точек (16 квадратов), вставленной в окуляр, подсчитывали численную плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов в паренхиме печени на единицу тестовой площади 1600 мкм², объемные плотности (V_v) очагов некрозов и дистрофически измененных гепатоцитов [10].

Статистическую обработку данных проводили методами параметрической статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel с определением среднего значения (M), ошибки среднего (m). Различия между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внутрижелудочное введение тетрахлорметана приводило к выраженным деструктивным изменениям в паренхиме печени крыс. На 4-е сутки интоксикации при макроскопическом исследовании печень у животных тусклая и дряблая по консистенции. При микроскопии в паренхиме печени преобладала вакуольная дистрофия гепатоцитов, вплоть до баллонной (44,1 %). Некрозы гепатоцитов встречались в различных отделах долек и были диссеминированными (38,7 %). Полнокровие выражалось неравномерно в сосудах триад, синусоидах и центральных венах. Объемная плотность нормальных гепатоцитов составляла 17,2 %. Численная плотность двуядерных гепатоцитов достоверно не отличалась от аналогичного показателя у интактных крыс. На 7-е сутки интоксикации исследуемые показатели не отличались от таковых на 4-е сутки исследования.

В группе крыс с профилактическим введением ЭБН в дозе 50 мг/кг объемная плотность дистрофически измененных гепатоцитов отмечалась больше контроля в 1,7 и 1,5 раза, а объемная плотность некрозов меньше в 6,8 и 4,3 раза на 4-е и 7-е сутки интоксикации соответственно. Объемная плотность нормальной ткани в 1,2 раза больше, а численная плотность двуядерных гепатоцитов не отличалась от контроля на 4-е сутки и меньше в 1,5 раза на 7-е сутки интоксикации. В группе крыс с профилактическим введением ЭБН в дозе 100 мг/кг обнаружена вакуольная дистрофия гепатоцитов (84,9 и 89,4 %), объемная плотность очагов некрозов отмечалась меньше контроля в 4,8 и 5,5 раза, однако объемная плотность неповрежденной ткани уменьшалась в 2,5 и 4,9 раза по сравнению с контролем на 4-е и 7-е сутки интоксикации соответственно. Численная плотность двуядерных гепатоцитов в данных группах животных не отличалась от контроля в эти сроки исследования.

При профилактическом введении ЭБД в дозе 50 мг/кг в печени крыс на 4-е сутки интоксикации объемная плотность дистрофически измененных гепатоцитов, объемная плотность нормальной ткани и численная плотность двуядерных гепатоцитов отмечалась в 1,4 раза больше, а объемная плотность некрозов меньше в 4,0 раза по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. На 7-е сутки интоксикации объемная плотность дистрофически измененных гепатоцитов увеличивалась в 1,7 раза, а объемная плотность некрозов уменьшалась в

4,2 раза по сравнению с контролем. При увеличении дозы ЭБД до 100 мг/кг объемная плотность нормальной ткани увеличивалась в 1,4 раза на 4-е сутки и в 1,8 раза на 7-е сутки интоксикации. Объемная плотность некрозов меньше контроля в 3,9 и 3,5 раза на 4-е и 7-е сутки интоксикации соответственно. При этом численная плотность двуядерных гепатоцитов увеличивалась в 1,7 раза на 4-е сутки и в 1,2 раза на 7-е сутки интоксикации по сравнению с контролем.

В группе с предварительным введением карсила в дозе 100 мг/кг объемные плотности дистрофически измененных гепатоцитов увеличивались по сравнению с контролем в 1,8 и 1,5 раза, объем очагов некрозов уменьшался в 3,4 и 3,5 раза на 4-е и 7-е сутки интоксикации соответственно. Объемная плотность нормальной ткани на 4-е сутки меньше контроля в 1,8 раза, а на 7-е сутки приближалась к показателю в контроле. Численная плотность двуядерных гепатоцитов в данных группах животных не отличалась от контроля в эти сроки исследования.

Профилактическое введение экстрактов, полученных из нативной (ЭБН) и предварительно диспергированной (ЭБД) бересты березы, способствовало уменьшению повреждения печени при интоксикации тетрахлорметаном (см. табл.). Ранее установлено [11], что профилактическое внутрижелудочное введение крысам ЭБН сопровождалось снижением активности в крови фермента цитолиза — аланинаминотрансферазы, сохранением активности белоксинтетических процессов в ответ на введение тетрахлорметана, предупреждало повышение в крови активности матриксных металлопротеаз, являющихся маркером выраженности деструктивных процессов в печени [12, 13]. Полученные данные морфометрического исследования подтверждают способность экстрактов бересты уменьшать повреждение гепатоцитов тетрахлорметаном.

Уменьшение объемной плотности очагов некрозов гепатоцитов отмечалось при использовании ЭБД и ЭБН во всех группах по сравнению с контролем. Более выраженный гепатопротекторный эффект отмечался при профилактическом введении ЭБН в дозе 100 мг/кг по сравнению с эффектом при введении препарата сравнения карсила. Изучение численной плотности двуядерных гепатоцитов свидетельствует о способности ЭБД в дозах 50 и 100 мг/кг стимулировать репаративные процессы в паренхиме печени крыс на клеточном уровне. Однако наличие меньшей объемной плотности дистрофически измененных гепатоцитов у животных, получав-

Токсическое повреждение печени крыс тетрахлорметаном на фоне предварительного введения водно-спиртового экстракта нативной (ЭБН) и диспергированной (ЭБД) бересты березы ($M \pm m, n = 10$)

Группы крыс	№ групп	Сроки взятия материала, сут	Дистрофия гепатоцитов V_{vi} , %	Некроз гепатоцитов V_{vi} , %	Нормальная ткань, %	Двуядерные гепатоциты, N_{ai}
Интактные	1	4	$3,2 \pm 0,8^*$	$1,3 \pm 0,7^*$	$95,6 \pm 2,1^*$	$1,7 \pm 0,1$
	2	7	$2,8 \pm 0,6^*$	$0,9 \pm 0,1^*$	$96,3 \pm 1,8^*$	$2,2 \pm 0,2$
Контроль (тетрахлорметан)	3	4	$44,1 \pm 0,2$	$38,7 \pm 1,5$	$17,2 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,1$
	4	7	$43,9 \pm 0,1$	$35,3 \pm 0,9$	$20,8 \pm 1,2$	$2,3 \pm 0,1$
ЭБН 50 мг/кг + тетрахлорметан	5	4	$74,3 \pm 1,3^{*13)}$	$5,7 \pm 0,4^{*13)}$	$20,1 \pm 1,0^{13)}$	$2,3 \pm 0,2$
	6	7	$66,6 \pm 1,3^*$	$8,3 \pm 0,5^*$	$25,3 \pm 1,4^*$	$1,5 \pm 0,1^*$
ЭБД 50 мг/кг + тетрахлорметан	7	4	$63,9 \pm 1,9^{*13)}$	$9,7 \pm 0,5^*$	$24,4 \pm 2,1^{*13)}$	$2,7 \pm 0,2^{*13)}$
	8	7	$76,4 \pm 2,0^{*14)}$	$8,5 \pm 0,7^*$	$16,4 \pm 2,5$	$2,4 \pm 0,2$
ЭБН 100 мг/кг + тетрахлорметан	9	4	$84,9 \pm 1,2^{*13)}$	$8,1 \pm 0,8^{*13)}$	$6,9 \pm 0,7^*$	$2,3 \pm 0,1$
	10	7	$89,4 \pm 0,9^{*14)}$	$6,4 \pm 0,3^{*14)}$	$4,2 \pm 0,5^*$	$2,4 \pm 0,1$
ЭБД 100 мг/кг + тетрахлорметан	11	4	$65,9 \pm 1,8^{*13)}$	$9,8 \pm 0,7^*$	$24,6 \pm 1,8^*$	$3,3 \pm 0,2^{*13)}$
	12	7	$51,6 \pm 1,9^{*14)}$	$10,0 \pm 0,8^*$	$36,9 \pm 2,2^*$	$2,7 \pm 0,1^{*14)}$
Карсил 100 мг/кг + тетрахлорметан	13	4	$79,6 \pm 1,2^*$	$11,2 \pm 0,8^*$	$9,3 \pm 0,9^*$	$1,8 \pm 0,1$
	14	7	$66,2 \pm 1,9^*$	$10,1 \pm 0,9^*$	$19,0 \pm 1,1$	$2,1 \pm 0,2$

Примечание: * — достоверность различий с контролем (тетрахлорметан); ^{13), 14)} — с соответствующей номеру группой, $p < 0,05$; V_{vi} — объемная плотность; N_{ai} — численная плотность; ЭБН — экстракт из бересты нативной; ЭБД — экстракт из бересты диспергированной; тетрахлорметан — интоксикация четыреххлористым углеродом.

ших ЭБД, в сравнении с аналогичным показателем после карсила демонстрирует, что меньшее количество гепатоцитов, в том числе и двуядерных, подвергается некрозу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о гепато-защитном эффекте экстрактов из нативной и диспергированной бересты при интоксикации тетрахлорметаном, что выражается в уменьшении объемной плотности некрозов на фоне их профилактического введения. Более выраженным защитным эффектом по сравнению с карсилом обладает ЭБН в дозе 100 мг/кг. Профилактическое введение ЭБД в дозах 50 и 100 мг/кг не только предупреждает развитие некрозов в печени, но и активирует в восстановительном периоде внутриклеточные процессы репаративной регенерации, что подтверждается увеличением численной плотности двуядерных гепатоцитов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кравченко Л.В., Трусов Н.В., Ускова М.А. и др. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса // Токсикологический вестник. 2009. № 94 (1). С. 12–18.
2. Шабанов П.Д., Султанов В.С., Лебедев В.А., Бычков Е.Р., Прошин С.Н. Эффекты полифенольного препарата ропрен при токсическом поражении печени и головного мозга у крыс: изучение функционального состояния печени, поведения и метаболизма моноаминов в мозге // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. 2010. Т. 8, № 3. С. 7–30.
3. Eesha B.R., Amberkar M., Kumari M.K. et al. Hepatoprotective activity of Terminalia paniculata against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats // Asian Pac. J. Trop. Med. 2011. Vol. 4 (6). P. 466–469. DOI: 10.1016/S1995-7645(11)60127-2.
4. Штробля А.Л., Фира Л.С., Лихацкий П.Г. и др. Изучение гепатозащитных свойств сухого экстракта из листьев абрикоса обыкновенного на модели поражения печени тетрахлорметаном // Вестн. РАМН. 2013. Т. 68, № 3. С. 68–72.
5. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Толстиков А.Г., Флехтер О.Б. Терпиноиды лупана — биологическая активность и фармакологические перспективы // Биоорг. химия. 2006. Т. 32, № 1. С. 291–307.
6. Кузнецова С.А., Васильева Н.Ю., Калачева Г.С. и др. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности // Журн. Сиб. федер. ун-та. Сер.: Химия. 2008. № 1. С. 151–165.
7. Жукова Н.А., Семенов Д.Е., Сорокина И.В. и др. Влияние бетулоновой кислоты и ее производного (3-оксо-20(29)-лупен-28-оил)-3-аминопропионовой кислоты на структуру печени мышей с лимфомой RLS // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2005. Т. 140, № 9. С. 348–351.

8. Шарапов В.И., Лабеецкая В.В., Грек О.Р., Саломейна Н.В., Мишенина С.В. Влияние экстракта из бересты березы на морфофункциональное состояние печени при экспериментальном токсическом гепатите // Сиб. мед. вестн. 2019. № 3. С. 8–12.
9. Скуратов А.Г. Тетрахлорметановая модель гепатита и цирроза печени у крыс // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. 2012. № 9. С. 37–40.
10. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
11. Иванова В.В., Лигостаева Ю.В., Потеряева О.Н. и др. Изучение гепатопротекторного действия растительного экстракта коры березы при экспериментальном гепатите, вызванном четыреххлористым углеродом // Фундаментальные исследования. 2013. № 3-2. С. 277–279.
12. Patel K., Gordon S.C., Jacobson I. et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients // J. Hepatol. 2004. Vol. 41 (6). P. 935–942. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.08.008
13. Reif S., Somech R., Brazovski E. et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C // Digestion. 2005. Vol. 71 (2). P. 124–130. DOI: 10.1159/000084626.

Поступила 01.02.2021

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шарапов Виктор Иванович — д-р мед. наук, профессор кафедры медицинской химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Грек Олег Рувимович — д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Лабеецкая Виктория Валерьевна — преподаватель кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Мишенина Светлана Владимировна — канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Образец цитирования: Шарапов В.И., Грек О.Р., Лабеецкая В.В., Мишенина С.В. Изучение гепатопротекторного действия экстрактов из нативной и диспергированной бересты березы при интоксикации тетрахлорметаном // Сиб. мед. вестн. 2021. № 1. С. 68–72.