

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

МЕДИЦИНА
MEDICINE

УДК 615.322:615.451.232+616.36-002.1+577.15
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-6-713-722>

Поступило в редакцию 28.09.2020
Received 28.09.2020

**И. П. Сутько, А. Г. Шляхтун, О. В. Титко, Н. В. Янкевич, А. В. Колодко,
П. Г. Телегин, И. В. Зверинский, И. Н. Семененя**

*Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси,
Гродно, Республика Беларусь*

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНАЦИИ СИЛИМАРИНА
И БЕРБЕРИНА В СОСТАВЕ САМОЭМУЛЬГИРУЮЩЕЙСЯ СИСТЕМЫ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ПАРАЦЕТАМОЛОМ**

(Представлено членом-корреспондентом Н. С. Сердюченко)

Аннотация. Изучены гепатозащитные свойства комбинации силимарина и растительного алкалоида берберина при экспериментальном поражении печени парацетамолом. Силимарин получали из семян расторопши пятнистой. Проведена оптимизация условий экстракционного извлечения флаволигнанов (силимарина). В качестве экстрагентов использовали 70 %-ный этиловый спирт, этилацетат и воду. Показано, что оптимальными условиями экстракции флаволигнанов для получения их максимального выхода является спиртовая экстракция в аппарате Сокслета. Установлено, что сочетанное применение силимарина с берберинном в большей степени по сравнению с их действием в отдельности стабилизирует мембраны гепатоцитов и предотвращает нарушение их целостности при токсическом поражении печени парацетамолом. Выявлено, что силимарин и берберин в составе разработанной самоэмульгирующей системы в большей мере предотвращают дистрофические изменения гепатоцитов и некрозы в ткани печени, снижают степень выраженности гиперферментемии в сыворотке крови крыс, предотвращают нарушение активности тиоредоксинредуктазы и ферментов глутатионовой антиоксидантной системы и тем самым эффективнее предотвращают нарушение функциональных способностей гепатоцитов.

Ключевые слова: силимарин, расторопша пятнистая, берберин, самоэмульгирующаяся система, токсический гепатит, парацетамол

Для цитирования. Оценка эффективности применения комбинации силимарина и берберина в составе самоэмульгирующей системы при экспериментальном поражении печени парацетамолом / И. П. Сутько [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 6. – С. 713–722. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-6-713-722>

**Iryna P. Sutsko, Aliaksei G. Shlyahtun, Aksana V. Titko, Nadezhda V. Yankevich, Anastasia V. Kolodko,
Pavel G. Telegin, Igor V. Zverinsky, Igor N. Semeneya**

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

**EVALUATION OF SILYMARIN AND BERBERINE EFFICIENCIES IN THE SELF-EMULSIFYING DRUG
DELIVERY SYSTEM IN PARACETAMOL-INDUCED EXPERIMENTAL TOXIC LIVER INJURY**

(Communicated by Corresponding Member Nikolay S. Serdyuchenko)

Abstract. The hepatoprotective properties of the silymarin and the plant alkaloid berberine combination in experimental paracetamol-induced liver damage were studied. Silymarin was obtained from milk thistle seeds. The conditions for extraction of flavonolignans (silymarin) were optimized. 70 % ethyl alcohol, ethyl acetate and water were used as extractants. It was shown that the optimal conditions for the extraction of flavonolignans in order to obtain the maximum yield of flavonolignans were alcohol extraction in a Soxhlet apparatus. The experiment showed that the combined of silymarin and berberine was greater than their individual actions, which most effectively permitted stabilization of hepatocyte membranes and prevented altering their integrity in paracetamol-induced toxic liver damage. The self-emulsifying system with silymarin and berberine

to a greater extent a significant extent prevented dystrophic changes in hepatocytes and necrosis in liver tissue, reduced hyperfermentemia in rat blood serum, prevented disturbance in the activity of thioredoxin reductase and enzymes of the glutathione antioxidant system and there by more effectively prevented hepatocyte functional impairment.

Keywords: silymarin, milk thistle, berberine, self-emulsifying system, toxic hepatitis, paracetamol

For citation: Sutsko I. P., Shlyahatun A. G., Titko A. V., Yankevich N. V., Kolodko A. V., Telegin P. G., Zverinsky I. V., Semeneyna I. N. Evaluation of silymarin and berberine efficiencies in the self-emulsifying drug delivery system in paracetamol-induced experimental toxic liver injury. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 6, pp. 713–722. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-6-713-722>

Введение. Среди соединений с гепатопротекторным действием многочисленную группу составляют вещества растительного происхождения, способствующие нормализации метаболических процессов и функций печени при ее повреждениях. Использование растительного сырья для производства лекарственных средств (ЛС) и биологически активных добавок гепатопротекторного действия в значительной степени связано с широким спектром действия биологически активных веществ растений, доступностью их в ценовом отношении, минимальным количеством побочных эффектов.

Хорошо известен своими гепатопротекторными свойствами силимарин – экстракт плодов и семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn), представляющий собой комплекс флаволигнанов. Доказана терапевтическая эффективность силимарина как антидота фаллоидина и аманитина – ядов гриба бледной поганки. В настоящее время активно изучаются новые свойства и возможности применения флаволигнанов расторопши пятнистой, в частности, их противовоспалительное, иммуномодулирующее, противоопухолевое и кардиопротекторное действие [1; 2].

Однако эффективность применения силимарина ограничивается его относительно низкой биодоступностью при пероральном применении из-за липофильной природы, плохой растворимости в воде (0,04 мг/мл) и, как следствие, недостаточно полной абсорбции в кишечнике (20–50 %) [2].

Берберин – изохинолиновый алкалоид растений ряда семейств, включая Berberidaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rutaceae и Annonaceae. В настоящее время установлено его антиоксидантное, противовоспалительное, желчегонное, гиполипидемическое, гипогликемическое, антиаритмическое, антипролиферативное и противоопухолевое действие [3]. Показаны его защитные эффекты при поражениях печени различного генеза. Результаты проведенных нами ранее исследований подтверждают гепатопротекторный потенциал берберина при моделировании холестаза [4] и частичной гепатэктомии [5].

Однако несмотря на то что берберин обладает широким спектром биологической активности и низкой токсичностью, его применение ограничивается низкой биодоступностью (менее 1 %) при пероральном применении [6]. Известно, что всасывание берберина в желудочно-кишечном тракте лимитируется гликопротеином-P (Pgp), представляющим собой АТФ-зависимый трансмембранный белок, который осуществляет эффлюкс большого спектра ЛС из клеток и тем самым снижает их эффективность. Ингибирующее действие на Pgp известно для силимарина [7].

Установленная нами и другими авторами более высокая эффективность совместного применения различных гепатопротекторов, а также известное свойство силимарина оказывать ингибирующее действие на Pgp, послужили основанием для изучения гепатопротекторных свойств комбинации силимарина и берберина.

В настоящее время применяется ряд технологических приемов для повышения растворимости и, следовательно, улучшения биодоступности ЛС. Особое место среди них занимают так называемые самоэмульгирующиеся системы (СЭС, или SEDDS (Self-Emulsifying Drug Delivery System)). Они являются специализированными формами доставки ЛС, защищающими лекарственные вещества от превращений в желудке и увеличивающими их растворимость в водной фазе желудочно-кишечного тракта, тем самым повышая биологическую доступность ЛС. СЭС обычно состоят из нескольких компонентов: чаще всего это различные масла, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и органические соразтворители. При попадании СЭС в желудочную и кишечную среду вследствие смешивания с водной фазой происходит образование эмульсии

«масло в воде», содержащей липидные капли диаметром 100–300 нм с лекарственным веществом [8]. СЭС являются стабильными системами благодаря наличию в их составе ПАВ и соразтворителей и значительно превосходят по этому параметру простые эмульсии.

При поражениях печени, в частности при наличии воспалительного процесса, невысокая биодоступность силимарина и его отдельных компонентов еще больше снижается. Среди разных видов гепатопатологии высокий удельный вес занимают токсические поражения, в том числе вызванные употреблением лекарственных препаратов. При этом особое значение в связи с тяжестью клинического течения и наибольшей распространенностью имеет парацетамол. Парацетамол (N-ацетил-п-аминофенол, или ацетаминофен) в терапевтических дозах является достаточно эффективным анальгетиком/антипиретиком и широко используется во всем мире. Однако однократный прием большой дозы парацетамола либо его длительное употребление в меньших дозах при повышенной чувствительности к препарату, злоупотреблении алкоголем, неправильном режиме питания или при сочетании с препаратами, замедляющими его метаболизм, приводят к повреждениям печени, прогрессирующим вплоть до печеночной недостаточности, что является главной причиной лекарственных поражений печени во многих странах [9]. К примеру, в США ежегодно около 30 тыс. человек госпитализируется с острой печеночной недостаточностью, вызванной приемом парацетамола и около 500 смертельных случаев регистрируется от его абсолютной или относительной передозировки [10].

Целью нашей работы стала оптимизация условий получения силимарина из семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), разработка СЭС для флаволигнанов расторопши пятнистой (силимарина) и берберина и анализ гепатозащитного действия силимарина и берберина в составе СЭС и в свободном виде при токсическом гепатите, вызванном парацетамолом у крыс.

Материалы и методы исследования. Силимарин получали экстракционными методами из семян расторопши пятнистой. С целью достижения максимального выхода флаволигнанов проводили оптимизацию условий их экстракционного извлечения. В качестве экстрагентов использовали 70 %-ный этиловый спирт, этилацетат и воду.

Спиртовую экстракцию проводили методом мацерации при комнатной температуре и 60 °С трижды, а также в аппарате Сокслета (однократно) в течение 72 ч. После экстракции проводили отгонку спирта. Для удаления липофильных соединений полученный экстракт обрабатывали дважды гексаном. Перед экстракцией этилацетатом семена расторопши пятнистой обрабатывали гексаном, а затем сушили под вакуумом при комнатной температуре. Экстракцию этилацетатом проводили при комнатной температуре в течение 72 ч. Отгонку этилацетата из экстракта осуществляли с использованием ротационного испарителя под вакуумом. Водную экстракцию проводили при температуре 90 °С в течение 24 ч. Экстракт концентрировали на вакуумном ротационном испарителе.

Осаждение общей фракции флаволигнанов проводили 0,1 %-ным раствором соляной кислоты. Для полного осаждения флаволигнанов раствор оставляли на 24 ч при температуре 4 °С. Осадок отфильтровывали и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Сушку флаволигнанов проводили под вакуумом при температуре 30 °С.

Содержание силимарина определяли модифицированным спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовом диапазоне при длине волны 293 нм. Подлинность выделенных флаволигнанов из семян расторопши пятнистой подтверждали методом спектрофотометрии в УФ-области с использованием стандартного образца силимарина (Sigma-Aldrich, США).

При разработке СЭС выбор ее компонентов и типа СЭС во многом определили свойства силимарина и берберина. При этом учитывали токсичность потенциальных компонентов, опыт их использования, растворяющую способность, смешиваемость, самодиспергируемость. На основании фазовых диаграмм выбирали комбинации компонентов СЭС с наименьшим количеством ПАВ, при котором происходило самоэмульгирование. Оценивали физико-химические свойства выбранных комбинаций. Полученная СЭС для силимарина и берберина содержала соответственно олеиновую кислоту в качестве липидной фазы, твин-80 в качестве ПАВ и полиэтиленгликоль-400 в качестве соразтворителя. Разработанную СЭС в дальнейшем использовали для

сравнительного анализа гепатопротекторного действия силимарина и берберина в составе СЭС и в свободном виде при токсическом гепатите у крыс.

В работе использовали взрослых крыс-самцов линии Wistar массой 200–220 г, содержащихся на стандартном рационе вивария Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Крыс распределяли в равные по количеству животных группы методом случайной выборки. Каждая группа включала 10 особей. Все эксперименты выполнялись в соответствии с этическими нормами, а также правилами проведения научных работ с использованием экспериментальных животных в научных исследованиях согласно рекомендациям и требованиям «Всемирного общества защиты животных (WSPA)» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Острое токсическое поражение печени вызывали однократным внутрижелудочным (в/ж) введением парацетамола в крахмальной суспензии в дозе 2 мг/кг массы тела.

Животные экспериментальных групп получали в/ж 0,5 %-ный раствор крахмала, либо берберин (80 мг/кг) в 0,5 %-ном растворе крахмала, либо силимарин (100 мг/кг) в 0,5 %-ном растворе крахмала, либо комбинацию силимарина (50 мг/кг) и берберина (40 мг/кг) в 0,5 %-ном растворе крахмала, либо комбинацию силимарина (50 мг/кг) и берберина (40 мг/кг) в составе разработанной СЭС из расчета 15 мл/кг массы тела. Животным контрольных групп в/ж вводили 0,5 %-ный раствор крахмала из расчета 15 мл/кг массы тела.

Препараты вводили ежедневно один раз в день на протяжении 7 суток до введения парацетамола. Через сутки после введения парацетамола животных декапитировали, брали образцы печени, собирали кровь и получали сыворотку, готовили гомогенаты печени.

О характере и степени выраженности поражения печени судили по активности в сыворотке крови аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ), γ -глутамилтранспептидазы (ГГТП), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержанию триацилглицеролов, показателю тимоловой пробы, определение которых проводили с использованием соответствующих сертифицированных наборов реагентов.

Для оценки состояния антиоксидантной системы печени определяли активность глутатионредуктазы (GR, КФ 1.6.4.2) [11], глутатионпероксидазы (GPx, КФ 1.11.1.9) [11], глутатион-S-трансферазы (GST, КФ 2.5.1.18) [11], каталазы (КФ 1.11.1.6) [11], тиоредоксинредуктазы (TrxR, КФ 1.8.1.9) [12]. Определяли концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (содержание ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов) в печени [11]. Активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИЦДГ, КФ 1.1.1.42) оценивали по скорости восстановления НАДФ в ходе превращения изоцитрата в 2-оксоглутарат [13]. Содержание свободных сульфгидрильных (SH-) групп определяли в классической реакции Элмана. Величины показателей рассчитывали на 1 мг белка, определяемого по методу Лоури.

Для гистологических исследований образцы печени экспериментальных животных фиксировали по Бродскому.

Полученные данные были обработаны с помощью статистического пакета GraphPad Prism v.8 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественного сравнения Тьюки. Полученные результаты проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Количественные данные представлены в виде среднего арифметического (M) и ошибки среднего арифметического ($\pm m$). Различия между сравниваемыми величинами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ выхода общей фракции флаволигнанов из семян расторопши пятнистой при различных экстракционных методах показал наибольший выход флаволигнанов (9,8 %) при их спиртовой экстракции в аппарате Сокслета (табл. 1).

Таким образом, для дальнейших исследований силимарин получали из семян расторопши пятнистой спиртовой экстракцией. Содержание флаволигнанов в выделенной фракции, используемой в данной работе, составило 92,0 %.

Об эффективности совместного применения силимарина и берберина при экспериментальном остром токсическом поражении печени, вызванном парацетамолом, судили по изменению

Т а б л и ц а 1. Выход общей фракции флаволигнанов из семян расторопши пятнистой при экстракции этиловым спиртом, этилацетатом и водой

Table 1. Yield of the total fraction of flavolignans from seeds of milk thistle upon extraction with ethyl alcohol, ethyl acetate or water

Экстрагент Extractant		Выход флаволигнанов (%) Flavolignan yield (%)
70 %-ный этиловый спирт	методом мацерации	2,8
	в аппарате Сокслета	9,8
Этилацетат		2,5
Вода		1,2

маркерных показателей в сыворотке крови. Гепатопротекторное действие оказывали берберин, силимарин, а также их комбинация. При этом сочетанное действие берберина и силимарина, судя по изменению активности АЛат, АсАТ и ГГТП, в большей степени по сравнению с их действием в отдельности способствовало стабилизации мембран гепатоцитов и предотвращению нарушения их целостности (рис. 1).

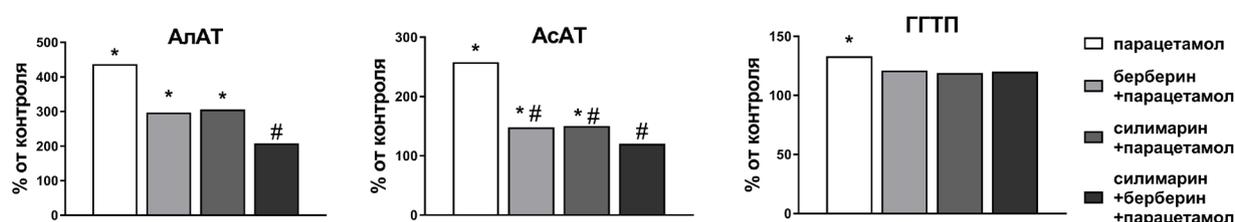


Рис. 1. Изменение активности АЛат, АсАТ и ГГТП в сыворотке крови крыс (в % относительно контрольных значений) с токсическим гепатитом, вызванным введением парацетамола (однократно, 2 мг/кг), при введении силимарина (0,2 ммоль/кг), берберина (0,2 ммоль/кг) и их комбинации (силимарин 0,1 ммоль/кг и берберин 0,1 ммоль/кг). Достоверность различий ($p < 0,05$): * – относительно контроля, # – относительно группы «Парацетамол»

Fig. 1. Change in the activity of ALT, AST and GGT in rat serum (in % relative to control values) with toxic hepatitis caused by the administration of paracetamol (singly, 2 mg/kg), and pretreated with silymarin (0.2 mmol/kg), berberine (0.2 mmol/kg) and their combinations (silymarin 0.1 mmol/kg and berberine 0.1 mmol/kg). * – $p < 0.05$ vs. control; # – $p < 0.05$ vs. “Paracetamol” group

Далее проводили сравнительный анализ гепатопротекторного действия комбинации силимарина и берберина в составе разработанной СЭС доставки и в свободном виде на модели токсического гепатита у крыс, вызванного однократным в/ж введением парацетамола. Согласно полученным результатам, парацетамол оказывал выраженное гепатотоксическое действие на экспериментальных животных. Развивался цитолитический синдром, о чем свидетельствовало повышение в крови активности АЛат и АсАТ соответственно на 197,4 и 74,1 % по сравнению с контрольной группой. На 49,3 % увеличивалась в сыворотке крови активность ГГТП, на 92,3 % – показатель пробы тимолового помутнения, на 22,5 % повышалось содержание триацилглицеролов относительно контрольных значений (табл. 2).

В печени животных отмечено накопление продуктов перекисного окисления липидов (содержание ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов увеличилось соответственно на 28,7 и 40,0 % относительно контроля) с повышением активности каталазы на 31,9 % (табл. 3).

Воздействие парацетамола в токсической дозе (однократно, в/ж, 2 мг/кг) сопровождалось снижением содержания свободных SH-групп, представленных в основном восстановленным глутатионом, в печени крыс на 63,5 % относительно контрольных значений (табл. 3), что, вероятно, связано с образованием больших количеств токсического метаболита парацетамола N-ацетил-п-аминобензохинона. Как известно, парацетамол метаболизируется преимущественно в печени по трем основным путям: глюкуронидирования и сульфатирования с образованием водорастворимых конъюгированных метаболитов, выводимых почками, а также микросомального окисления ферментами печени. В последнем случае образуется токсический промежуточный метабо-

Т а б л и ц а 2. Биохимические показатели в сыворотке крови крыс с токсическим гепатитом, вызванным парацетамолом (однократно, в/ж, 2 мг/кг), при введении силимарина (0,1 ммоль/кг) и берберина (0,1 ммоль/кг) в свободном виде и в составе разработанной СЭС

Table 2. Biochemical indicators in blood serum of rats with paracetamol-induced toxic hepatitis (singly, i. g., 2 mg/kg), with silymarin (0.1 mmol/kg) and berberine (0.1 mmol/kg) in the free form and in the SEDDS treatments

Показатель Indicator	Экспериментальная группа Experimental group				
	Контроль Control	СЭС (основа) SEDDS (base)	Парацетамол Paracetamol	Силимарин + берберин в крахмале + парацетамол Silymarin + berberine in starch + paracetamol	Силимарин + берберин в СЭС + парацетамол Silymarin + berberine in SEDDS + paracetamol
АлАТ, Е/л	45,69 ± 6,15	46,50 ± 4,69	135,90 ± 11,8 ^{а*}	99,39 ± 15,93 ^{а*}	83,24 ± 16,31 ^б
АсАТ, Е/л	162,60 ± 10,96	165,00 ± 11,29	283,10 ± 33,7 ^{а*}	254,00 ± 45,63	228,60 ± 26,90
ГГТП, Е/л	8,91 ± 0,79	9,22 ± 0,58	13,30 ± 0,92 ^{а*}	11,91 ± 0,98	11,67 ± 2,78
ЩФ, Е/л	394,70 ± 19,19	438,00 ± 26,93	342,00 ± 21,91	342,00 ± 26,61	397,60 ± 20,50
Тимоловая проба, ед. S-N	0,52 ± 0,10	0,73 ± 0,06	1,00 ± 0,07 [*]	0,89 ± 0,09 [*]	0,82 ± 0,13
Триацил-глицеролы, ммоль/л	1,38 ± 0,07	1,53 ± 0,05	1,69 ± 0,10 [*]	1,58 ± 0,05	1,63 ± 0,04

П р и м е ч а н и е. * – $p < 0,05$ относительно контроля; а – $p < 0,05$ относительно группы «СЭС (основа)»; б – $p < 0,05$ относительно группы «Парацетамол».

Note. * – $p < 0.05$ vs. control; а – $p < 0.05$ vs. the “SEDDS (base)” group; б – $p < 0.05$ vs. the “Paracetamol” group.

Т а б л и ц а 3. Биохимические показатели в печени крыс с токсическим гепатитом, вызванным парацетамолом (однократно, в/ж, 2 мг/кг), при введении силимарина (0,1 ммоль/кг) и берберина (0,1 ммоль/кг) в свободном виде и в составе разработанной СЭС

Table 3. Biochemical indicators in the rat liver with paracetamol-induced toxic hepatitis (singly, i. g., 2 mg/kg), after administration of silymarin (0.1 mmol/kg) and berberine (0.1 mmol/kg) in free form and in the SEDDS treatments

Показатель Indicator	Экспериментальная группа Experimental group				
	Контроль Control	СЭС (основа) SEDDS (base)	Парацетамол Paracetamol	Силимарин + берберин в крахмале + парацетамол Silymarin + berberine in starch + paracetamol	Силимарин + берберин в СЭС + парацетамол Silymarin + berberine in SEDDS + paracetamol
ТБК-активные продукты, нмоль/мг белка	64,27 ± 2,28	69,53 ± 3,60	82,69 ± 4,79 [*]	75,39 ± 5,97	77,37 ± 4,29
Дниевые конъюгаты, нмоль/г белка	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01 [*]	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /мг белка	217,70 ± 11,71	201,50 ± 12,41	287,10 ± 18,67 ^{а*}	245,80 ± 11,24	242,80 ± 16,62
GR, нмоль НАДФН/мин/мг белка	66,81 ± 2,75	48,28 ± 6,27 [*]	45,57 ± 4,51 [*]	44,07 ± 4,58 [*]	46,09 ± 3,76 [*]
GPx, мкмоль GSH/мин/мг белка	58,07 ± 6,27	52,91 ± 4,71	36,78 ± 4,32 [*]	42,47 ± 3,66	49,08 ± 4,54
GST, нмоль ХДНБ/мин/мг белка	378,9 ± 19,92	355,40 ± 24,58	285,10 ± 5,73 [*]	310,60 ± 19,12	307,20 ± 34,18
ГxR, нмоль ДТНБ/мин/ мг белка	71,77 ± 3,44	68,30 ± 3,19	47,81 ± 3,99 ^{а*}	62,93 ± 4,85	68,46 ± 3,30 ^б
SH-группы свободные, нмоль/мг белка	18,36 ± 1,29	17,93 ± 1,82	6,71 ± 0,65 ^{а*}	9,04 ± 1,38 ^{а*}	10,70 ± 1,74 ^{а*}
НАДФ-ИЦДГ, нмоль НАДФН/мин/мг белка	6,78 ± 0,31	6,91 ± 0,21	5,96 ± 0,29 ^{а*}	5,58 ± 0,33 ^{а*}	6,18 ± 0,15

П р и м е ч а н и е. * – $p < 0,05$ относительно контроля; а – $p < 0,05$ относительно группы «СЭС (основа)»; б – $p < 0,05$ относительно группы «Парацетамол».

Note. * – $p < 0.05$ vs. control; а – $p < 0.05$ vs. the “SEDDS (base)” group; б – $p < 0.05$ vs. the “Paracetamol” group.

лит N-ацетил-п-аминобензохинон, с действием которого связана гепатотоксичность парацетамола. N-ацетил-п-аминобензохинон в норме связывается с глутатионом и затем экскретируется. Повышенное его образование при больших дозах парацетамола приводит к истощению запасов глутатиона, а сам метаболит ковалентно связывается с альтернативными мишенями, в особенности с белками, с образованием комплексов, вызывающих некроз [14].

Одновременно регистрировали уменьшение активности ферментов редокс-системы глутатиона (активность GR и GPx снижалась соответственно на 31,8 и 36,7 %), снижение активности GST на 24,8 % и активности TrxR на 33,4 % относительно контрольных значений (табл. 3).

Установлено, что силимарин и берберин в составе разработанной СЭС превосходят по эффективности гепатопротекторного действия силимарин и берберин в свободном виде при токсическом гепатите, вызванном парацетамолом. Введение экспериментальным животным силимарина и берберина в составе разработанной СЭС доставки в большей степени по сравнению с их введением в свободном виде препятствовало выходу в кровь АЛАТ (активность фермента была на 38,7 % ниже таковой у крыс без лечения), предупреждало повышение тимоловой пробы (ее уровень в данной экспериментальной группе соответствовал контрольным значениям) (табл. 2). У животных, получавших берберин и силимарин в составе СЭС, активность TrxR в печени соответствовала контрольным значениям и на 43,2 % превышала таковую у животных, не получавших лечения (табл. 3). Это в определенной степени может быть связано с большим ослаблением самоэмульгирующейся композиции с силимарином и берберинотоксического действия парацетамола на активность НАДФН-продуцирующих ферментов, в частности НАДФ-ИЦДГ (табл. 3), поскольку лимитирующим фактором эффективной работы системы Trx/TrxR и глутатионовой антиоксидантной системы является уровень НАДФН.

Изученные биохимические показатели сыворотки крови и печени крыс, получавших в течение 7 суток СЭС доставки без силимарина и берберина (основу СЭС), не показали заметных отклонений по сравнению с контрольной группой животных.

Выявленные изменения биохимических показателей, характеризующие функциональное состояние печени крыс при токсическом поражении парацетамолом, были подтверждены данными

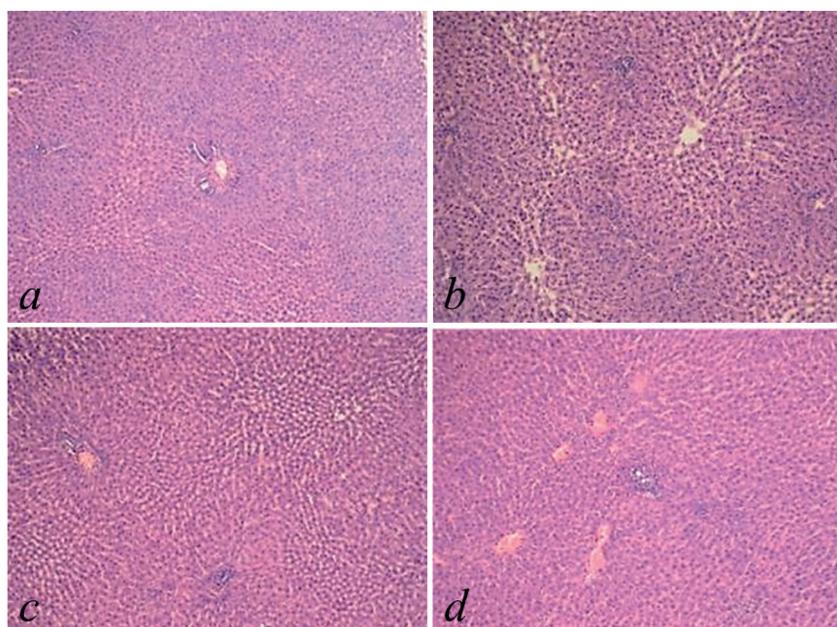


Рис. 2. Гистологическая картина печени контрольных животных (a) и крыс с острым токсическим поражением печени парацетамолом (b), при введении опытными животными силимарина и берберина в свободном виде (c) и в составе разработанной самоэмульгирующейся композиции (d). Окраска гематоксилином и эозином ($\times 40$)

Fig. 2. Liver histology of the control animals (a) and rats with acute toxic liver damage with paracetamol (b), after treatment of experimental animals with free silymarin and berberine (c) and as part of the developed self-emulsifying composition (d). Hematoxylin and eosin stain ($\times 40$)

гистологического исследования данного органа. У животных контрольной группы структура паренхимы печени была типичной для нормального органа. Введение животным парацетамола в токсической дозе вызвало у всех животных появление очагов некроза, значительную диффузную и фокальную лимфоцитарную инфильтрацию, наблюдалось полнокровие центральных вен, расширение синусоидных капилляров (рис. 2, *b–d*).

Нарушения структуры ткани печени в меньшей степени были выражены у группы животных, получавших силимарин и берберин в крахмале, – участки зернистой дистрофии гепатоцитов выявлялись у 88 % животных, участки некрозов – у 60 %. Появление большого количества гипертрофированных двуядерных клеток отмечено у 75 % животных, тогда как в паренхиме печени у животных без лечения эти нарушения обнаруживали в 100 % случаев. Значительное улучшение гистологической картины ткани печени по сравнению с группой без лечения обнаружены у животных, получавших силимарин и берберин в составе СЭС, – участки некрозов выявлялись лишь у 25 % животных и только у 50 % животных отмечено появление значительного количества гипертрофированных двуядерных клеток.

Можно полагать, что большая эффективность силимарина и берберина в составе СЭС при остром токсическом поражении печени парацетамолом у крыс по сравнению с их действием в свободном виде связана с повышением их биодоступности. Так, проведенное нами ранее исследование фармакокинетики берберина и силимарина в свободном виде и в составе полученной СЭС показало увеличение биодоступности берберина при его применении в комбинации с силимарином, а также увеличение биодоступности берберина и силимарина в составе разработанной СЭС [15].

Заключение. Проведена оптимизация условий экстракционного извлечения флаволигнанов из семян расторопши пятнистой (силимарина) с целью достижения максимального выхода флаволигнанов. Установлено, что оптимальными условиями получения флаволигнанов является их однократная экстракция в аппарате Сокслета с применением в качестве экстрагента 70 %-ного этилового спирта. В ходе эксперимента показано, что сочетанное действие силимарина и берберина в большей степени по сравнению с их действием в отдельности стабилизирует мембраны гепатоцитов и предотвращает нарушение их целостности при токсическом поражении печени парацетамолом. Предварительное введение силимарина и берберина в составе самоэмульгирующей композиции при остром токсическом поражении печени парацетамолом у крыс в большей степени по сравнению с их введением в свободном виде ослабляет гепатотоксическое действие парацетамола, что связано с увеличением их биодоступности в составе СЭС при пероральном применении. Результаты проведенного исследования могут служить обоснованием дальнейшего изучения эффективности сочетанного применения гепатопротекторов разной природы и разработки готовых лекарственных форм на основе СЭС, обладающих повышенной биодоступностью.

Список использованных источников

1. Gillessen, A. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: a narrative review / A. Gillessen, H. H. Schmidt // *Adv. Ther.* – 2020. – Vol. 37, N 4. – P. 1279–1301. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01251-y>
2. Javed, S. Reassessing bioavailability of silymarin / S. Javed, K. Kohli, V. Ali // *Altern. Med. Rev.* – 2011. – Vol. 16, N 3. – P. 239–249.
3. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects / K. Wang [et al.] // *Drug Metab. Rev.* – 2017. – Vol. 49, N 2. – P. 139–157. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1306544>
4. The effect of berberine administration to rats on the functional state of liver after common bile duct ligation / I. V. Zverinsky [et al.] // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* – 2012. – Vol. 6, N 2. – P. 159–163. <https://doi.org/10.1134/s1990750812020163>
5. Влияние берберина на восстановление активности ферментов биотрансформации ксенобиотиков печени крыс после частичной гепатэктомии / И. В. Зверинский [и др.] // *Биомед. химия.* – 2015. – Т. 61, № 3. – С. 381–383. <https://doi.org/10.18097/pbmc20156103381>
6. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability / C. S. Liu [et al.] // *Fitoterapia.* – 2016. – Vol. 109. – P. 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.02.001>
7. Zhou, S. Herbal modulation of P-glycoprotein / S. Zhou, L. Y. Lim, B. Chowbay // *Drug Metab. Rev.* – 2004. – Vol. 36, N 1. – P. 57–104. <https://doi.org/10.1081/dmr-120028427>
8. Dokania, S. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) – challenges and road ahead / S. Dokania, A. K. Joshi // *Drug Deliv.* – 2015. – Vol. 22, N 6. – P. 675–690. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.896058>

9. Вергун, О. М. Острые отравления парацетамолом, диагностика / О. М. Вергун, С. Н. Борисевич, В. С. Камышников // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2015. – № 2 (14). – С. 113–118.
10. Bhushan, B. Liver regeneration after acetaminophen hepatotoxicity: mechanisms and therapeutic opportunities / B. Bhushan, U. Apte // *Am. J. Pathol.* – 2019. – Vol. 189, N 4. – P. 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.12.006>
11. Современные проблемы биохимии. Методы исследований / Е. В. Барковский [и др.]; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск, 2013. – С. 158–192.
12. Tamura, T. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity / T. Tamura, T. C. Stadtman // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – Vol. 93, N 3. – P. 1006–1011. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1006>
13. Balamir, A. NADP-linked isocitrate dehydrogenase from beef liver: a new method of purification and the effect of metal ion cofactor on its stability / A. Balamir // *Biochem. Med.* – 1983. – Vol. 29, N 2. – P. 194–206. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(83\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0006-2944(83)90040-6)
14. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity // C. I. Ghanem [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2016. – Vol. 109. – P. 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.020>
15. Экспериментальная оценка эффективности совместного применения берберина и силимарина в составе самоэмульгирующей системы доставки с целью повышения их гепатопротекторной активности при токсическом гепатите / И. П. Сутько [и др.] // *Вестн. Смоленской гос. мед. акад.* – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 31–39.

References

1. Gillessen A., Schmidt H. H. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: a narrative review. *Advances in Therapy*, 2020, vol. 37, no. 4, pp. 1279–1301. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01251-y>
2. Javed S., Kohli K., Ali V. Reassessing bioavailability of silymarin. *Alternative Medicine Review*, 2011, vol. 16, no. 3, pp. 239–249.
3. Wang K., Feng X., Chai L., Cao S., Qiu F. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metabolism Reviews*, 2017, vol. 49, no. 2, pp. 139–157. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1306544>
4. Zverinsky I. V., Melnichenko N. G., Poplavsky V. A., Sutsko I. P., Telegin P. G., Shlyahutun A. G. The effect of berberine administration to rats on the functional state of liver after common bile duct ligation. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2012, vol. 6, no. 2, pp. 159–163. <https://doi.org/10.1134/s1990750812020163>
5. Zverinsky I. V., Zverinskaya H. G., Sutsko I. P., Telegin P. G., Shlyahutun A. G. Effects of berberine on the recovery of rat liver xenobiotic-metabolizing enzymes after partial hepatectomy. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2015, vol. 61, no. 3, pp. 381–383 (in Russian). <https://doi.org/10.18097/pbmc20156103381>
6. Liu C.-S., Zheng Y.-R., Zhang Y.-F., Long X.-Y. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. *Fitoterapia*, 2016, vol. 109, pp. 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.02.001>
7. Zhou S., Lim L. Y., Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metabolism Reviews*, 2004, vol. 36, no. 1, pp. 57–104. <https://doi.org/10.1081/dmr-120028427>
8. Dokania S., Joshi A. K. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) – challenges and road ahead. *Drug Delivery*, 2015, vol. 22, no. 6, pp. 675–690. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.896058>
9. Vergun O., Borisevich S., Kamyschnikov V. Acute paracetamol intoxication, diagnostics. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa = Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, 2015, no. 2 (14), pp. 113–118 (in Russian).
10. Bhushan B., Apte U. Liver regeneration after acetaminophen hepatotoxicity: mechanisms and therapeutic opportunities. *American Journal of Pathology*, 2019, vol. 189, no. 4, pp. 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.12.006>
11. Barkovskii E. V., Bokut' S. B., Borodinskii A. N., Buko V. U., Valentyukevich O. I., Gritsuk A. I. [et al.]. *Modern problems of biochemistry. Research methods*. Minsk, 2013, pp. 158–192 (in Russian).
12. Tamura T., Stadtman T. C. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties and thioredoxin activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, vol. 93, no. 3, pp. 1006–1011. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1006>
13. Balamir A. NADP-linked isocitrate dehydrogenase from beef liver: a new method of purification and the effect of metal ion cofactor on its stability. *Biochemical Medicine*, 1983, vol. 29, no. 2, pp. 194–206. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(83\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0006-2944(83)90040-6)
14. Ghanem C. I., Pérez M. J., Manautou J. E., Mottino A. D. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacological Research*, 2016, vol. 109, pp. 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.020>
15. Sut'ko I. P., Shlyahutun A. G., Titko O. V., Yankevich N. V., Kolodko A. V., Telegin P. G., Zverinsky I. V. Experimental evaluation of berberine and silymarin efficiencies in the self-emulsifying drug delivery system for enhancing their hepatoprotective activities under toxic hepatitis. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii = Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*, 2019, vol. 18, no. 6, pp. 31–39 (in Russian).

Информация об авторах

Сутько Ирина Петровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: irina_sutsko@list.ru.

Шляхтун Алексей Генрихович – заведующий лабораторией. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: a.shlyhtun@gmail.com.

Титко Оксана Викторовна – мл. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: o.titko@mail.ru.

Янкевич Надежда Викторовна – науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: aurika@tut.by.

Колодко Анастасия Васильевна – мл. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: askamatyulkoz@mail.ru.

Телегин Павел Геннадьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: p.telegin@tut.by.

Зверинский Игорь Владимирович – канд. биол. наук, заведующий отделом. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: zverinsky@tut.by.

Семененя Игорь Николаевич – д-р мед. наук, профессор, директор. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: insemenenya@yandex.by.

Information about the authors

Sutsko Iryna P. – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: irina_sutsko@list.ru.

Shlyhtun Alexej G. – Researcher, Head of the Laboratory. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: a.shlyhtun@gmail.com.

Titko Aksana V. – Junior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: o.titko@mail.ru.

Yankevich Nadezhda V. – Researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: aurika@tut.by.

Kolodko Anastasia V. – Junior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: askamatyulkoz@mail.ru.

Telegin Pavel G. – Junior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: p.telegin@tut.by.

Zverinsky Igor V. – Ph. D. (Biology), Head of the Department. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: zverinsky@tut.by.

Semenenya Igor N. – D. Sc. (Medicine), Professor, Director. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, Lenin Komsomol Boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: insemenenya@yandex.by.