

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ФИТОСРЕДСТВА НА ПРОЦЕССЫ СВЕРТЫВАНИЯ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У БЕЛЫХ КРЫС

¹ Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ

² Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ

Убеева Е.А.¹, Николаев С.М.^{1,2}, Оленников Д.Н.², Убеева И.П.¹

Цель работы заключалась в определении нарушений гемостаза при остром экспериментальном токсическом гепатите, вызванном введением D-галактозамина гидрохлорида у белых крыс, и возможности коррекции с помощью использования нового комплексного фитосредства. Состав исследуемого фитоэкстракта включал гипекоум прямой *Hypocoum erectus* L., копеечник даурский *Hedysarum dauricum*, солодку уральскую *Glycyrrhiza uralensis* Fischer, календулу лекарственную *Calendula officinalis* и шлемник байкальский *Scutellaria baicalensis*. Применение фитополиэкстракта способствовало коррекции функционального состояния печени и проявлений гипokoагуляции.

Ключевые слова: комплексное растительное лекарственное средство, экспериментальный гепатит, гипokoагуляция, гепатопротекторный эффект.

The aim of the study is to determine the hemostasis disorders in acute experimental toxic hepatitis caused by the introduction of D-Galactosamine hydrochloride in white rats and the possibility of correction with the help of the use of a new complex herbal product. The composition of the analysed phytoextract included *Hypocoum erectus* L. (*hypocoum straight*), *Hedysarum dauricum* (*Daur sweetvetch*), *Glycyrrhiza uralensis* Fischer (*Ural licorice*), *Calendula officinalis* (*pot marigold*) and *Scutellaria baicalensis* (*Baikal skullcap*). The use of phytoextract contributed to the correction of the functional state of the liver and hypocoagulation manifestations.

Key words: complex herbal medicine, experimental hepatitis, hypocoagulation, hepatoprotective effect.

Актуальность. Широкое распространение вирусных гепатитов, увеличение частоты токсических, медикаментозных повреждений печени, метаболических нарушений определяет необходимость создания средств, обладающих гепатопротекторными свойствами. При определении тяжести течения заболеваний печени в клинике большое значение имеет выявление нарушений коагуляции, поскольку протромбин и другие факторы свертывания синтезируются в печени. Нарушения гемокоагуляции играют существенную роль в патогенезе повреждений печени, способны приобретать каскадный характер, приводить к диссеминированному внутрисосудистому свертыванию, нарушениям микроциркуляции, отягощать течение патологического процесса, определяя исход заболеваний [1, 2].

Лекарственные средства растительного происхождения привлекают внимание исследователей ввиду широкого спектра фармакотерапевтического воздействия, низкой токсичности, возможности потенцировать эффект благодаря сочетанию различных биологически активных веществ, особенно в комплексных фитосредствах [3, 4, 5].

Цель работы заключалась в определении характера изменений коагуляционного гемостаза у крыс под влиянием нового комплексного растительного средства на модели токсического гепатита, вызванного введением D-галактозамина гидрохлорида.

Материалы и методы

Исследуемое комплексное фитосредство (КФС) представляло собой комбинированный сухой экстракт, состоящий из сухих экстрактов травы гипекоума прямостоячего (*Hypocoum erectum* L.; Paraveraceae), травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.; Leguminosae), цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.; Compositae), корней солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; Leguminosae) и корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi; Lamiaceae) в соотношении 5:5:4:4:2. Количественную стандартизацию средства проводили методом ВЭЖХ-УФ с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа Милихром А-02 (Эконова, Новосибирск, Россия).

Фармакотерапевтическая эффективность комплексного фитосредства КФС определялась при токсическом гепатите, вызванном введением D-галактозамина гидрохлорида. Для определения нарушений процесса коагуляции при повреждении печени гидрохлоридом D-галактозамина использовали общепринятые в гемостазиологии методы и определяли уровень фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс (ПИ), протромбиновое время (ПВ), международное нормализованное отношение (МНО), протромбиновое отношение (ПО) в сыворотке крови белых крыс общепринятыми методами [6]. Состояние коагуляционного звена

системы гемостаза исследовали с помощью серии тестов, выполненных с использованием стандартного набора реактивов АО «Абрис» и «Витал» на анализаторе «Витарей».

По мнению исследователей, D-галактозамина гидрохлорид вызывает нарушения синтеза РНК и белка, формирует острый гепатит, идентичный по морфологическим и биохимическим изменениям в печени вирусному гепатиту человека [7]. Повреждение печени D-галактозамином вызывалось однократным внутрибрюшинным введением в дозе 400 мг/кг белым крысам [7]. КФС, полученный в виде сухого экстракта, растворяли в очищенной воде и вводили внутривентрикулярно трем группам белых крыс за 1 ч до введения гепатотоксина в дозах 100 мг/кг, 200 мг/кг, 300 мг/кг. В дальнейшем сухой экстракт продолжали вводить внутривентрикулярно группам животных в указанных дозах 1 раз в сутки в течение 14 дней эксперимента. Препаратом сравнения являлся карсил (*Carsil*) с международным названием силибинин (*Silibinin*) из расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Карсил вводили внутривентрикулярно в дозе 100 мг/кг в аналогичном режиме. Контрольной группе белых крыс после введения D-галактозамина гидрохлорида вводили эквивалентный объем очищенной воды в аналогичном режиме. Интактная группа животных состояла из белых крыс того же возраста и пола и получала по данной схеме в соответствующем объеме очищенную воду.

Эксперименты проведены на 96 белых крысах обоего пола с исходной массой 180±20 г. Содержание животных осуществляли в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (GLP) и Приказом МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Лабораторные животные, соответствующие требованиям для включения в эксперимент, разделялись на группы с учетом пола, возраста, массы и принципа рандомизации. Экспериментальную работу проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.), «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986 г). Протокол исследования согласован с комитетом по этике Бурятского госуниверситета (№ 2 от 04.12.2016).

Фармакотерапевтическую эффективность исследуемого фитоэкстракта определяли через 7, 14 суток с начала эксперимента. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась на основе современных пакетов прикладных математических программ с использованием критерия Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При введении D-галактозамина гидрохлорида экспериментальным животным в ранние сроки опыта не наблюдалось резкого ухудшения их состояния, у них сохранялись двигательная активность и аппетит. Масса тела белых крыс опытных групп в течение первой недели опыта не менялась, а у интактных животных масса увеличилась на 20–25 г. На второй неделе у опытных животных снижалась двигательная активность, страдал аппетит, масса тела уменьшалась на 10–12% по сравнению с интактными крысами.

Результаты исследований показали, что формирование экспериментального гепатита, вызванного D-галактозамином гидрохлорида, сопровождалось значительными нарушениями гемостаза (таблица 1, 2). На 7 день эксперимента содержание фибриногена, одного из важнейших показателей гемостаза, достоверно снижалось по сравнению с уровнем интактных крыс. В контрольной группе животных показатель фибриногена оставался сниженным и на 14 сутки опыта, указывая на сохранение гипокоагуляции. В группе сравнения на фоне введения карсила у большинства животных данный показатель сохранялся сниженным и отличался от контрольной группы не более чем на 10%. В группе крыс, получавших КФС (таблица 1), уровень фибриногена повышался у 6 из 8 до 2,0 г/л и выше.

Показатель АЧТВ, один из базовых показателей коагулограммы, зависящий от концентрации плазменных факторов (II, V, VIII, IX, X, XI, XII и фибриногена), позволяющий оценить эффективность внутреннего пути свертывания крови, отражал в группе опытных животных существенные изменения системы коагуляции. На 7 день опыта в группе животных, получавших карсил, АЧТВ повышался на 8,21%, а при введении исследуемого полиэкстракта на 15,6%–18,5%, отражая уменьшение проявлений гипокоагуляции.

Протромбиновый индекс (ПИ), используемый в клинических условиях в качестве объективного критерия тяжести повреждения печени и нарушения свертывания, значительно уменьшался при формировании D-галактозаминового гепатита. При введении эталонного гепатопротектора карсила белым крысам отмечалось повышение ПИ у 3 из 8 животных и составило в среднем 9,75% на 7 сутки опыта. При использовании исследуемого фитополиэкстракта увеличение показателя ПИ у белых крыс составило 20,6–23% при введении в дозах 100 мг/кг, 200 мг/кг, 300 мг/кг на 7 сутки опыта.

Показатель протромбинового времени (ПВ) дает возможность быстро оценить не только внешнюю систему гемостаза, но и весь каскад реакций свертывания крови. При повреждении печени белых крыс D-галактозамином показатель ПВ значительно возрастал, причем

Таблица 1

Состояние коагуляционного каскада крови у белых крыс при повреждении печени гидрохлоридом D-галактозамина при использовании комплексного растительного средства на 7 сутки эксперимента (M±0, n=8)

№	Биохимические показатели	Интактные крысы	Опытные группы животных (D-галактозаминоый гепатит)				
			Контроль + H ₂ O	Группа сравнения + карсил	Группа 1 + 100 мг/кг КФС	Группа 2 + 200 мг/кг КФС	Группа 3 +300 мг/кг КФС
1	Фибриноген, г/л	2,43±0,13	1,51±0,11* ¹	1,67±0,18	1,92±0,13* ²	1,97±0,12* ²	1,99±0,11* ²
2	АЧТВ, сек	23,04±1,9	34,24±1,7* ¹	31,4±1,53	28,9±1,4* ²	28,2±1,3* ²	27,89±1,25* ²
3	ПИ, %	84,4±4,7	51,3±2,4* ¹	56,3±3,7	62,1±3,16* ²	61,9±2,8* ²	60,8±3,2* ²
4	ПВ, сек	19,5±1,6	33,7±1,7* ¹	27,8±1,9	26,8±1,9* ²	25,9±1,7* ²	26,3±2,1* ²
5	МНО, усл. ед.	1,22±0,12	2,93±0,14* ¹	2,57±0,18 *	2,34±0,17* ²	2,32±0,19* ²	2,16±0,17* ²
6	ПО, %	1,16±0,12	2,53±0,17* ¹	2,17±0,19	2,05±0,11 ²	2,02±0,13* ²	2,04±0,11* ²

Примечание. Здесь и далее: *¹ – различия статистически достоверны между интактной и контрольной группами животных при p<0,05;

*² – различия статистически достоверны между контрольной и опытной группами;

n – число животных в группе.

существенные отличия от интактной группы сохранялись и на 14 день опыта (таблица 2). На 7-е сутки опыта в группе сравнения, получавшей карсил, у половины животных отмечалась тенденция к повышению ПВ. При использовании КФС на 7 сутки опыта в группах животных при остром гепатите в дозах 100 мг/кг, 200 мг/кг, 300 мг/кг отмечалось отчетливое снижение ПВ по сравнению с контрольной группой (21–23%).

При D-галактозаминоом гепатите протромбиновое отношение (ПО), неотъемлемая часть исследования протромбинового комплекса крови, значительно возрастало в группе контрольных животных. На фоне введения карсила белым крысам отмечалось снижение ПО в сравнении с контрольной группой у 2 из 8 животных, и в среднем уменьшение составило 14,2%. Использование исследуемого полиэкстракта у белых крыс отчетливо уменьшало ПО и проявление гипокоагуляции по сравнению с контрольной группой – выявлялось у 6 из 8 животных.

Для оценки состояния протромбинового комплекса при повреждении печени D-галактозамином использовали показатель международного нормализованного отношения (МНО), который подтверждал развитие значительных гипокоагуляционных нарушений в контрольной группе животных. В группе сравнения при введении карсила белым крысам в данные сроки отмечено отличие этого показателя от контроля на 12%. При использовании изучаемого фитосредства в дозах 100 мг/кг, 200 мг/кг, 300 мг/кг в группах животных в ранние сроки эксперимента отличие МНО составило 20% и более по сравнению с контролем.

На 14 сутки эксперимента в контрольной группе животных при повреждении печени D-галактозамином сохранялись значительные отличия показателей, указывающих на нарушение

коагулограммы (таблица 2). При введении карсила у животных наблюдалась тенденция к повышению протромбинового индекса, фибриногена и АЧТВ, но достоверных значений в данной группе животных не выявлялось.

На второй неделе наблюдения при введении исследуемого полиэкстракта в дозах 100 мг/кг, 200 мг/кг, 300 мг/кг у белых крыс содержание фибриногена повышалось на 27–30% по сравнению с контрольной группой. Использование КФС способствовало повышению протромбинового индекса (таблица 2) на 25–27% по сравнению с контролем. На 2-ой неделе опыта уровень АЧТВ снижался на 21,5 % и у большинства животных приближался к уровню интактной группы. При этом показатели ПО и МНО достоверно снижались, подтверждая уменьшение гипокоагуляционных нарушений в группе животных, получавших КФС.

Заключение

Экспериментальный гепатит, вызванный введением D-галактозамина гидрохлорида, характеризовался развитием гипокоагуляционных нарушений, связанных со снижением уровня фибриногена, факторов протромбинового комплекса ввиду нарушений синтезирующей функции гепатоцитов. Динамика дополнительных показателей коагулограммы, АЧТВ, ПИ, ПО и МНО, подтверждала нарушения свертывания.

При тяжелом течении патологического процесса в печени особое значение приобретает возможность развития синдрома диссеминированного внутрисудистого свертывания (ДВС), имеющего общепатологическую направленность, способного приобретать каскадный характер. ДВС, как известно, может протекать не только в выраженной клинической форме, но и в виде компенсированного или субкомпен-

сированного процесса, существенно отягощать течение патологического процесса. Выявляемые гипокоагуляционные нарушения у экспе-

риментальных животных соответствуют второй фазе ДВС-синдрома.

Таблица 2

Состояние коагуляционного каскада крови у белых крыс при повреждении печени гидрохлоридом D-галактозамина при введении комплексного растительного средства на 14 сутки эксперимента (M±o, n=8)

№№	Биохимические показатели	Интактные крысы	Опытные группы животных (D-галактозаминоый гепатит)				
			Контроль + H ₂ O	Группа сравнения + карсил	Группа 1 + КФС 100 мг/кг	Группа 2 + КФС 200 мг/кг	Группа 3 + КФС 300 мг/кг
1	Фибриноген, г/л	2,43±0,13	1,64±0,11* ¹	1,85±0,19	2,01±0,10* ²	2,04±0,12* ²	1,99±0,11* ²
2	АЧТВ, сек	23,04±1,9	29,7±2,1* ¹	25,7±1,9	23,5±1,17* ²	23,4±1,21* ²	23,3±1,11 ²
3	ПИ, %	84,4±4,7	62,1±3,4* ¹	75,4±6,4	79,5±3,9* ²	80,7±6,2* ²	79,8±5,7* ²
4	ПВ, сек	19,9±1,6	25,9±1,2* ¹	23,2±1,7	21,83±1,1* ²	21,6±1,3* ²	21,46±1,2* ²
5	МНО, усл. ед.	1,22 ± 0,12	2,13 ± 0,15* ¹	1,97 ± 0,19	1,58 ± 0,12* ²	1,62 ± 0,14* ²	1,57 ± 0,15* ²
6	ПО, %	1,16±0,12	1,87±0,11* ¹	1,48±0,13	1,41±0,12* ²	1,38±0,13 * ²	1,37±0,10* ²

Нарушения гемостаза при повреждении печени D-галактозамином гидрохлорида могут вызываться сочетанием недостаточности синтетической функции гепатоцитов в образовании факторов свертывания и возможностью развития ДВС-синдрома. Определение коагуляционных нарушений свидетельствует о диагностической ценности данных отклонений в оценке степени тяжести, вероятном прогнозе и необходимости коррекции при повреждениях печени.

При использовании эталонного гепатопротектора карсила в группе экспериментальных животных с D-галактозаминоый гепатитом можно отметить отчетливую тенденцию к уменьшению проявлений нарушений свертывания, но достоверных отличий не наблюдалось. Введение КФС приводило к достоверному уменьшению гипокоагуляции, причем с ранних сроков эксперимента, но отчетливого дозозависимого эффекта при этом не выявлено.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы:

1. *Инфекционные болезни. Национальное руководство.* Под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова. М., 2010: 1056.
2. Шерлок Ш., Дули Д. *Заболевания печени и желчных путей.* Под ред. З.Г. Апросиной, Н.А. Мухина. М., 2002: 864.
3. Никонов Г.К., Мануйлов Б.М. *Основы современной фитотерапии.* М., 2005: 520.
4. Николаев С.М. *Фитофармакотерапия и фитофармакопрофилактика заболеваний.* Улан-Удэ, 2012: 286.
5. Лесиовская Е.Е. *Доказательная фитотерапия.* М., 2014.

6. Баркаган З.С., Момот А.П. *Основы диагностики нарушений гемостаза.* М., 1999: 290.
7. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* Под ред. Р.У. Хабриева. М., 2012: 832.

Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Убеева Елена Александровна, аспирант кафедры фармакологии Бурятского государственного университета, г. Улан-Удэ.
670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а.
Тел.: 8 (9021) 612296.
E-mail: ubeeva.ip@mail.ru

Информация об авторах

Николаев Сергей Матвеевич, д.м.н., профессор кафедры фармакологии и традиционной медицины Бурятского государственного университета, в.н.с. ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ.
670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а.
Тел.: (3012) 297170.
E-mail: univer@bsu.ru

Оленников Даниил Николаевич, д.б.н., с.н.с. ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д.6
Тел.: 8 (9021) 600627.
E-mail: olennikovdn@mail.ru

Убеева Ираида Поликарповна, д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней Бурятского государственного университета, г. Улан-Удэ.
670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а.
Тел.: (3012) 297170.
E-mail: univer@bsu.ru