

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 619:616:615.3+635.322

**Биохимические показатели крови, характеризующие
функциональную активность печени, в условиях
применения фракций гидропонического
*Teucrium polium Lamiaceae***

**А. М. Галстян¹, А. А. Пепанян², С. С. Дагбашян²,
Н. Б. Чичоян¹, К. В. Симонян³, В. А. Чавушян³**

¹ ЕГМУ им. М. Гераци, кафедра фармакогнозии

² Гематологический центр им. Р. О. Еоляна МЗ РА

³ Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА
0025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: гидропонический *Teucrium polium*, аспартамино-
трансфераза, аланинаминотрансфераза

В системе здравоохранения лекарственные растения играют важную роль и могут служить основным источником новых химических веществ с потенциальными терапевтическими эффектами. Биологически активные соединения растений определены как вторичные растительные метаболиты, вызывающие, в зависимости от дозы, фармакологические или токсикологические эффекты у животных и людей.

Дубровник беловойлочный (*Teucrium polium Lamiaceae*) еще с давних пор применялся в народной медицине восточных, средиземноморских стран, а также в Армении. В Иране *Teucrium polium* применяли при сахарном диабете в виде спиртового экстракта. В Армении народ использует это растение при расстройствах желудочно-кишечного тракта, а также женских заболеваниях (бесплодие, миома и т. д.) [1].

За последние 40 лет из надземной части растения были выделены такие биологически активные соединения, как терпеноиды, иридоиды, флавоноиды [6]. Было установлено, что эти соединения обладают широким спектром фармакологических эффектов, включая антиоксидантные, противораковые, противовоспалительные, гипогликемические, гепатопротекторные, гиполипидемические, антибактериальные, кардиотонические, антихолинэстеразные и противогрибковые [6, 8, 15].

Обзор литературных данных позволяет заключить, что на биосинтез биологически активных соединений влияют различные климатические

условия, местность и состояние окружающей среды, в которых произрастает растение. Свидетельством служит тот факт, что произрастающий в Армении *Teucrium polium* имеет уникальный фитохимический состав [2, 4].

В 1990-е годы Галстян А.М. и соавт. детально изучили химический состав *Teucrium polium*, произрастающего на территории Армении. Было установлено, что растение содержит небольшое количество дитерпеновых фуролактонов (теполин А и В), составляющих 0,9%. Основными соединениями растения являются фенилпропаноидные гликозиды – вербаскозид, полиумозид и теуполиозид (до 6,0 %) [4, 5, 12].

Учитывая значение *Teucrium polium* и существование рассеянных популяций растения в Армении, с 2007 года Галстян А.М. и соавторы изучали возможность и целесообразность выращивания данного растения в открытых гидропонических условиях. В период 2007-2014гг. была разработана биотехнология выращивания *Teucrium polium* в условиях открытой гидропоники [3, 11].

Благодаря исследованиям и скринингу дикорастущих, почвенных и гидропонических вариантов *Teucrium polium*, было показано, что экологически чистый гидропонический *Teucrium polium* отличается высоким содержанием биоактивных веществ и менее токсичен. Исследования токсикологических эффектов *Teucrium polium*, произрастающего в диких и культивируемых условиях, показали, что спиртовые экстракты менее токсичны [13]. Для каждого варианта – дикого, гидропонического и почвенного – LD100 соответственно составила 1000, 2000 и 4000 мг/кг. Бензольные и этилацетатные фракции (клеродановые дитерпеновые фуролактоны) были наиболее токсичными. LD100 для бензольной фракции дикого *Teucrium polium* составила 250 мг/кг; для бензольной фракции гидропонического *Teucrium polium* – 500 мг/кг; для бензольной фракции почвенного *Teucrium polium* – 1000 мг/кг; для этилацетатной фракции дикого *Teucrium polium* – 840 мг/кг; для этилацетатной фракции гидропонического *Teucrium polium* – 1470 мг/кг; для этилацетатной фракции почвенного *Teucrium polium* – 3000 мг/кг [13]. Наименее низкий уровень токсичности проявили полярные водные фракции (флавоноидные и фенилпропаноидные гликозиды). LD100 водной фракции дикого *Teucrium polium* составила 1000 мг/кг; LD100 водной фракции гидропонического *Teucrium polium* – 1500 мг/кг; LD100 водной фракции почвенного *Teucrium polium* – 4000 мг/кг [9].

В последнее время в Иране стали широко применять спиртовые экстракты дубровника беловойлочного при сахарном диабете [7,15]. Однако ученые обнаружили, что большие дозы спиртовых экстрактов дубровника вызывают гепатотоксичный эффект. Итальянские ученые объясняют, что гепатотоксичность может быть выражена в присутствии боль-

ших доз фурулактонов, в частности, если они в спиртовом экстракте составляют около 7 % [10].

Наша работа направлена на исследование гепатотоксичности максимально допустимых доз этанольного экстракта гидропонического *Teucrium polium* и его водной и этилацетатной фракций путем определения активности ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в крови белых крыс, с целью выявления компонентов, обуславливающих гепатотоксичность растения. Эти же биохимические показатели крови оценивали у женщин-добровольцев, принимавших перорально в течение 20 дней терапевтическую дозу этанольного экстракта гидропонического *Teucrium polium*.

Материал и методы

Исследование проведено на крысах-самках в соответствии с руководящими принципами местного комитета по этике для использования подопытных животных. Крысы содержались в поликарбонатных клетках в стандартном режиме (температура $20 \pm 2^\circ\text{C}$ с 12-часовым циклом свет/темнота) и были обеспечены стандартным кормом и свободным доступом к питьевой воде.

24 крысы-самки альбиносы массой $220 \pm 10\text{г}$ были разделены на четыре группы по 6 в каждой. Животные контрольной группы (К) однократно получали внутримышечно 1мл физиологического раствора. Животные первой опытной группы (ОГ-I) получали внутримышечно максимально допустимую дозу этанольного экстракта (530 мг/кг), растворенного в 1мл физиологического раствора; вторая опытная группа (ОГ-II) получала внутримышечно максимально допустимую дозу водной фракции этанольного экстракта (400 мг/кг), растворенного в 1мл физиологического раствора; третья опытная группа (ОГ-III) получала внутримышечно максимально допустимую дозу этилацетатной фракции этанольного экстракта (385 мг/кг), растворенного в 1мл диметилсульфоксида. По истечении 24 часов под нембуталовым глубоким наркозом (50 мг/кг, в/б) животных забивали и забирали кровь из сердца для определения активности ферментов АЛТ и АСТ в сыворотке крови.

Для экспериментов из гидропонического *Teucrium polium* были получены растворимые экстракты 50% этилового спирта. Высушивание до сухого веса проводили на роторном вакуумном аппарате. Этилацетатные, хлороформ-метанольные (3:1) и водные фракции были отделены по полярности и также высушены до сухого веса. Для определения гепатотоксических эффектов были использованы спиртовые экстракты гидропонического *Teucrium polium*, а также этилацетатные (клеродановые дитерпеноиды) и водные (фенольные гликозиды) фракции его этанольного экстракта.

Образцы крови получены путем декапитации через 24 часа после внутримышечной инъекции максимально допустимых доз исследуемого экстракта и его фракций. Образцам крови давали свернуться в течение 40 мин при комнатной температуре. Сыворотку отделяли центрифугированием при 2500 об./мин при 30°C в течение 15 мин. Активность АСТ и АЛТ в сыворотке определяли спектрофотометрическим методом с использованием комплектов Биокон.

В медицинской диагностике для дифференциации причин повреждения печени или гепатотоксичности полезным является оценка соотношения концентраций АСТ и АЛТ в крови (АСТ/АЛТ) [14]. У здоровых людей уровень АЛТ больше АСТ, и когда АСТ больше АЛТ вероятна патология. В норме АСТ/АЛТ меньше 1, и если $1 < \text{АСТ/АЛТ} < 2$, то вероятен цирроз печени [16].

У 10 женщин-добровольцев в возрасте 45-55 лет определяли АЛТ и АСТ в сыворотке крови до и после перорального применения в течение 20 дней терапевтической дозы (5% от максимально переносимой) этанольного экстракта *Teucrium polium*. Настойка растения в 50% этиловом спирте получена из расчета терапевтической дозы: суточная доза – 40 капель два раза в день.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы SigmaPlot 11.00 (one-way ANOVA). Результаты биохимических показателей представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM.

Результаты и обсуждение

Результаты биохимических анализов обобщены в табл. 1, 2 и на рисунке. Как показано в табл. 1, существуют значительные изменения между контрольной группой и всеми тестируемыми фракциями *Teucrium polium*. Данные показали, что через 24 часа после экспериментальной процедуры у крыс опытных групп уровень АСТ в крови был значительно выше, чем в группе К (соответственно $17,194 \pm 2,76$; $15,67 \pm 2,65$; $22,05 \pm 3,69$ и $10,017 \pm 0,745$; $p < 0,05$). Как показано в табл. 2, сывороточная АЛТ была значительно увеличена в ОГ-III ($18,00 \pm 1,98$; $p = 0,0058$) и ОГ-I ($17,23 \pm 1,93$; $p = 0,0094$) по сравнению с группой К ($10,417 \pm 0,885$), тогда как в ОГ-II уровень АЛТ составлял $16,520 \pm 1,92$ ($p = 0,0162$).

Оценка соотношения АСТ/АЛТ (коэффициент Де Ритиса) в качестве диагностического маркера показала, что в ОГ-I коэффициент Де Ритиса составляет 0,99 против 0,96 в группе К, а в ОГ-III – 1,23 против 0,96 в группе К, тогда как в ОГ-II соотношение Де Ритиса составляло 0,95, что соответствует группе К и указывает на отсутствие гепатотоксичности в группе водной фракции спиртового экстракта *Teucrium polium*.

Таблица 1

Показатели активности фермента аспаратаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови крыс, получавших однократную внутримышечную инъекцию максимально переносимой дозы этанольного экстракта *Teucrium polium* и его водной и этилацетатной фракций ($n=6$, $p < 0.05$)

Группы	АСТ (U/L)						m±SEM
К контрольные животные	10	6,7	10	10	11,7	11,7	10,017±0,745
ОГ-I этанольный экстракт <i>Teucrium polium</i> (530 мг/кг)	10	26	20	13,3	16,67	27,5	17,194±2,76 p=0,0309
ОГ-II водная фракция этанольного эк- тракта <i>Teucrium polium</i> (400 мг/кг)	25	15	16,67	9,2	12,5	16	15,67±2,65 p=0,0671
ОГ-III этилацетатная фрак- ция этанольного экстракта <i>Teucrium</i> <i>polium</i> (385 мг/кг)	23,3	15	14	36	15	29	22,05±3,69 p=0,0095

Таблица 2

Показатели активности фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови крыс, получавших однократную внутримышечную инъекцию максимально переносимой дозы этанольного экстракта *Teucrium polium* и его водной и этилацетатной фракций ($n=6$, $p < 0.05$)

Группы	АЛТ (U/L)						m±SEM
К контрольные животные	8,3	7,5	12,5	10	11,7	12,5	10,417±0,885
ОГ-I этанольный экстракт <i>Teucrium polium</i> (530 мг/кг)	13,3	20	23,3	13,3	21	12,5	17,23±1,93 p=0,0094
ОГ-II водная фракция этанольного эк- тракта <i>Teucrium polium</i> (400 мг/кг)	11,7	12,5	20	15,8	24	15	16,520±1,92 p=0,0162
ОГ-III этилацетатная фракция этанольного экстракта <i>Teucrium</i> <i>polium</i> (385 мг/кг)	15	20	20	10	19	24	18,00±1,98 p=0,0058

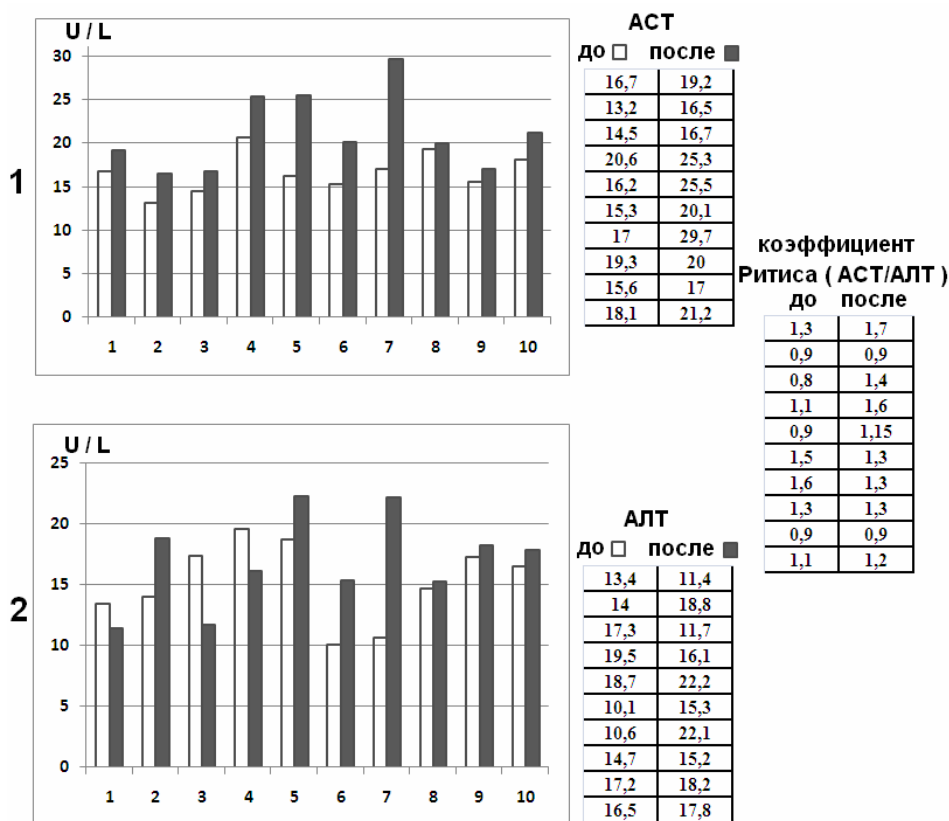


Рисунок. Показатели активности ферментов (U/L) аспартатаминотрансферазы (АСТ) (1), аланинаминотрансферазы (АЛТ) (2) и коэффициента Ритиса (АСТ/АЛТ) в сыворотке крови 10 женщин, получавших в течение 20 дней терапевтическую дозу этанольного экстракта *Teucrium polium*

Оценка тех же биохимических показателей крови у добровольцев-женщин, принимавших перорально в течение 20 дней терапевтическую дозу этанольного экстракта *Teucrium polium* приведена на рисунке. Показатели активности ферментов АСТ и АЛТ в сыворотке крови отдельных индивидуумов после приема этанольного экстракта *Teucrium polium* претерпевали изменения различной степени, оставаясь в пределах, соответствующих нормальному физиологическому состоянию (рисунок). Анализ этих же показателей позволяет сделать заключение об отсутствии гепатотоксичности у женщин-добровольцев, применявших терапевтическую дозу этанольного экстракта *Teucrium polium*, поскольку показатели активности АСТ и АЛТ, коэффициента Де Ритиса, спустя 20 дней после применения экстракта *Teucrium polium*, остаются в пределах нормы.

Таким образом, этанольный экстракт *Teucrium polium* и его этила-

цетатная фракция, содержащая фуролактоновые кислоты, в максимально допустимых дозах вызывают повышение соотношения АСТ/АЛТ у крыс, что свидетельствует о гепатотоксичности. Водная фракция спиртового экстракта, не содержащая фуролактоновые кислоты, не является гепатотоксичной, это дает основание для следующего заключения: гепатотоксичность обусловлена фуролактоновыми кислотами. Активность АЛТ, АСТ и коэффициент Де Ритиса в сыворотке крови женщин, принимавших перорально в течение 20 дней терапевтическую дозу этанольного экстракта *Teucrium polium*, оставались в пределах нормы, что указывает на отсутствие гепатотоксичности.

Поступила 24.02.15

Հիդրոպոնիկ *Teucrium polium Lamiaceae*-ի ֆրակցիաների կիրառման պայմաններում լյարդի ֆունկցիոնալ ակտիվությունը բնութագրող արյան կենսաքիմիական ցուցանիշները

**Հ. Մ. Գալստյան, Ա. Ա. Պեպանյան, Ս. Ս. Դադբաշյան, Ն. Բ. Զիչոյան,
Կ. Վ. Սիմոնյան, Վ. Ա. Զավուշյան**

Կենդանիների և մարդկանց մոտ դեղաբույսերի կենսաբանական ակտիվ միացությունները կախված դեղաչափից դրսևորում են դեղաբանական կամ թունաբանական ազդեցություններ: Մանրամասն ուսումնասիրվել է Հայաստանում աճող *Teucrium polium*-ի քիմիական բաղադրությունը: Հաշվի առնելով *Teucrium polium*-ի դեղաբանական արժեքը և Հայաստանում նրա ցրված պոպուլյացիաների առկայությունը բաց հիդրոպոնիկ պայմաններում մշակվել է նրա աճեցման կենսատեխնոլոգիան: Տվյալ աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել՝ 1) ուսումնասիրել ալբինո տեսակի առնետների արյան կենսաքիմիական ցուցանիշները, որոնք բնութագրում են լյարդի ֆունկցիոնալ ակտիվությունը՝ հիդրոպոնիկ *Teucrium polium*-ի էթանոլային էքստրակտի և նրա առանձին բաղադրիչների առավելագույն տանելի դեղաչափերի համակարգային կիրառման պայմաններում, որպեսզի բացահայտվեն այն բաղադրիչները, որոնցով պայմանավորված է բույսի հեպատոտոքսիկությունը, 2) որոշել տվյալ կենսաքիմիական ցուցանիշները կին կամավորների մոտ, որոնք բերանային ճանապարհով 20 օր տևողությամբ ընդունել են հիդրոպոնիկ *Teucrium polium*-ի էթանոլային էքստրակտի թերապևտիկ դեղաչափը:

Հետազոտության արդյունքների վերլուծությունը ցույց տվեց, որ կենդանիների մոտ էթանոլային էքստրակտը, ինչպես նաև էթիլացետատային ֆրակցիան, առավելագույն տանելի դեղաչափ կիրառելիս

ցուցաբերում է հեպատոտոքսիկություն: Էթանոլային էքստրակտի ջրային ֆրակցիայի առավելագույն տանելի դեղաչափը, որը չի պարունակում ֆուրոլակտոնային թթուներ, չի ցուցաբերում հեպատոտոքսիկ հատկություններ: Սա հիմք է հանդիսանում եզրակացնելու, որ *Teucrium polium*-ի հեպատոտոքսիկությունը պայմանավորված է ֆուրոլակտոնային թթուներով:

20 օրվա ընթացքում էթանոլային էքստրակտի թերապևտիկ դեղաչափի կիրառումից հետո կանանց մոտ ալանին ամինատրանսֆերազ և ասպարտատ ամինատրանսֆերազ ֆերմենտների ցուցանիշները և Դե Ռիտիսի գործակիցը գտնվում էին նորմալի սահմաններում:

The effect of administration of fractions of hydroponic *Teucrium polium* Lamiaceae on the blood biochemical parameters characterizing the functional activity of the liver

**H. M. Galstyan, A. A. Pepanyan, S. S. Dagbashyan, N. B. Chichoyan,
K. V. Simonyan, V. A. Chavushyan**

Bioactive plant compounds exhibit dose-dependent pharmacological or toxicological effects in animals and humans. The chemical composition of *Teucrium polium* (Feltly germander) growing in Armenia was studied in detail. Considering the pharmacological value and scattered populations of Armenian *Teucrium polium*, a biotechnology was developed for its cultivation in open-air hydroponic conditions.

The purpose of our present investigation was: 1) to study blood biochemical parameters in albino rats characterizing the functional activity of liver, a systemic administration of the maximum tolerated dose of ethanol extract of hydroponic *Teucrium polium* and its fractions to detect hepatotoxicity caused by components of plant; 2) to determine the same blood biochemical parameters in female volunteers taking orally for 20 days a therapeutic dose of ethanol extract of *Teucrium polium*.

The results obtained suggest that the ethanol extract as well as the ethyl acetate fraction show hepatotoxicity at the maximum tolerated dose. The maximum tolerated dose of aqueous fraction of ethanol extract without furo lactone acids showed no hepatotoxicity, which is the basis to conclude that hepatotoxicity of *Teucrium polium* is conditioned by furo lactone acids. ALT, AST levels and De Ritis ratio were within the normal range in women after 20- days treatment with therapeutic dose of ethanol extract.

Литература

1. Варданян С. А. Амирдовлат Амасиаци. Ненужное для неучей. М., 1990.

2. Галстян А. М. Исследование химического состава *Teucrium polium* L., *T. orientale* и *Ziziphora clinopodioides* Lam. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пятигорск, 1992.
3. Галстян А. М. Культивирование дубровника беловойлочного в почве и открытой гидропонике. Изв. Аграрного университета Армении, 2010, 1, с. 141-145.
4. Галстян А. М., Оганесян Г. Б., Мнацаканян В. А. и соавт. Строение двух новых дитерпеноидов *Teucrium polium* L. Химия природных соединений, 1992, 5, с. 503-508.
5. Оганесян Г. Б., Галстян А. М., Мнацаканян В. А. и соавт. Фенилпропаноидные гликозиды *Teucrium polium* L. Химия природных соединений, 1991, 5, с. 630-634.
6. Чачоян А. А., Алексанян Р. А., Галстян А. М. и соавт. Исследование биологической активности дубровника беловойлочного (*Teucrium polium* L., Lamiaceae). Растительные ресурсы, 1992, 3, с. 81-85.
7. Bahramikia S., Yazdanparast R. Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). Phytother. Res., 2012;26(11): p.1581-1593.
8. Capasso F., Cerri R., Morrica P., Senatore F. Chemical composition and anti-inflammatory activity of an alcoholic extract of *Teucrium polium* L. Boll. Soc. Ital. Biol., 1983; 59 (11): 1639-1643.
9. Chavushyan V., Simonyan K., Galstyan H. Toxicity studies of *Teucrium polium* Lamiaceae growing in nature and in culture. The Second International Symposium "Biopharma 2010: from science to industry". May 17-20, Armenia, Yerevan, 2010, p.45.
10. Fiorentino A., D'Ambrosia B., Pacifico S., Scognamiglio M., D'Angelo G. et al. Structure elucidation and hepatotoxicity evaluation against Hep G2 human cells of neo-clerodane diterpenes from *Teucrium polium* L. Phytochemistry, 2011,72: p. 2037- 2044.
11. Galstyan H. M. Soilness cultivation and application perspectives of Germander in medicine. Vestnik KazNMU, 2012, p. 303-306.
12. Galstyan H. M. Standardization of *Teucrium polium* L. by natural phytoestrogens-phenylpropanoid glycosids and flavonoids. NAMJ, 2014, 8(2), p. 53-58.
13. Galstyan H. M., Chavushyan V. A., Simonyan K. V. Phytochemical and pharmacological properties of wild and cultural Germander (*Teucrium polium* L.) and prospects of application in conditions of ovariectomy. Материалы Международной конференции Горисского Университета, Горис, июнь 2011, с. 200-204.
14. Gopal D.V., Rosen H. R. Abnormal findings on liver function tests. Interpreting results to narrow the diagnosis and establish a prognosis. Postgrad. Med. (February 2000), 107 (2): 100-2, 105-9, 113-114.
15. Nosrati N., Aghazadeh S., Yazdanparast R. Effects of *Teucrium polium* on Insulin Resistance in Nonalcoholic Steatohepatitis. J.Acupunct. Meridian Stud., 2010 Jun;3(2):104-110.
16. Siddiqi A.I., Siddiqeh M., Mehmood A., Siddiqui A.M. Alanine aminotransferase/aspartate aminotransferase ratio reversal and prolonged prothrombin time: a specific indicator of hepatic cirrhosis. J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad., 2007, 19 (3).