# ВПЛИВ РЕЧОВИНИ 5(4){2} (ПОХІДНОЇ ПІРИДИНКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ) НА ПЕРЕБІГ ХРОНІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕПАТИТУ У БІЛИХ ЩУРІВ

*Л.В.Яковлєва, А.О.Сілаєв, Ю.Б.Лар'яновська, Л.В.Гладкова*

Національний фармацевтичний університет

*Ключові слова: речовина 5(4){2}; піридинкарбонові кислоти; амізон; силібор; антиоксидантна дія; хронічний гепатит*

*Об'єктом для досліджень було обрано сполуку під шифром 5(4){2}, синтезовану в лабораторії органічного синтезу НФаУ. Попередніми дослідженнями на моделі гострого тетрахлорметанового ураження печінки встановлено, що речовина 5(4){2} виявляє виражену антиоксидантну дію, відновлює показники білкового та ліпідного обмінів. Метою роботи стало дослідження фармакотерапевтичної дії сполуки під шифром 5(4){2} на перебіг хронічного гепатиту у щурів, викликаного введенням тетрахлорметану та етанолу. Результати дослідження дають підставу вважати, що в умовах хронічного ураження печінки, викликаного тетрахлорметаном та етанолом, речовина 5(4){2} виявила гепатопротекторну активність. Це підтверджується інгібуванням процесів ПОЛ, вірогідним зниженням показників ліпідного та вуглеводного обмінів та усуненням цитолізу гепатоцитів, позитивним впливом на всі ланки жовчоутворення та стимуляцією синтетичних процесів. Слід зазначити, що за антиоксидантною активністю речовина 5(4){2} показала перевагу над препаратами порівняння силібором та амізоном.*

Сучасні вчені продовжують пошук нових високоефективних і малотоксичних НПЗП. При розробці і створенні нових препаратів цієї групи вирішальним фактором є висока безпечність разом з вираженою ефективністю.

Зважаючи на вищевикладене та з урахуванням результатів фармакологічного скринінгу та аналізу даних літератури щодо біологічної активності похідних піридинкарбонових кислот, об'єктом для досліджень було обрано сполуку під шифром 5(4){2}, синтезовану в лабораторії органічного синтезу НФаУ.

В попередніх порівняльних дослідженнях показано, що речовина 5(4){2} при застосуванні в дозі 0,8 мг/кг виявляє виражену аналгезуючу, протизапальну, жарознижуючу та імунотропну активність та перевищує за ефективністю препарат порівняння з подібною хімічною структурою — таблетки "Амізон" [10, 11, 14]. За даними літератури таблетки "Амізон" виявляють виражену гепатопротекторну, мембраностабілізувальну та антиоксидативну активність [1, 2, 3]. Тому метою роботи стало дослідження фармакотерапевтичної дії сполуки під шифром 5(4){2} на перебіг хронічного гепатиту у щурів, викликаного сумішшю тетрахлорметану та етанолу.

## Матеріали та методи

Експеримент проведено відповідно до методичних рекомендацій [4]. Референтними препаратами послужили таблетки "Амізон" та "Силібор". Хронічний гепатит викликали у щурів групи позитивного контролю та дослідних груп введенням 5% розчину етанолу, який тварини отримували замість питної води, та 50% масляного розчину тетрахлорметану в дозі 0,2 мл/100 г маси тіла 3 рази на тиждень протягом 28 днів. Схема експерименту представлена в табл. 1.

Через 24 год після останнього введення досліджуваних препаратів тварин наркотизували 1% розчином барбамілу, оперували і збирали почасово жовч [4]. Потім декапітацією щурів виводили з експерименту, збирали кров, робили резекцію печінки для визначення масового коефіцієнту (МКП) [4] і готували гомогенат з метою проведення біохімічного аналізу. Вплив досліджуваних речовин на функціональний стан печінки при хронічному ураженні оцінювали за біохімічними показниками, наведеними в табл. 2.

Для підтвердження розвитку патології та фармакотерапевтичної дії досліджуваних речовин були проведені гістологічні дослідження морфологічного стану печінки. Для оцінки мікроскопічних змін печінки враховували ступінь ураження печінки в порівнянні з негативним та позитивним контролем [5].

**Л.В.Яковлєва** — доктор фармац. наук, професор, завідувачка Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Таблиця 1

**Схема проведення експерименту**

| Група, № | n | Група тварин | Доза, мг/кг | Шлях введення | Термін введення | Режим введення |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 8 | Негативний контроль | — | — | — | — |
| 2 | 8 | Позитивний контроль (гепатит) | — | — | — | — |
| 3 | 8 | Гепатит + речовина 5(4){2} | 0,8* | Внутрішньо-шлунково | 28 діб | Профілактично-лікувальний, паралельно з введенням токсинів |
| 4 | 8 | Гепатит + амізон | 10** | | | |
| 5 | 8 | Гепатит + силібор | 25** | | | |

Примітки:
1) * — враховуючи результати попередніх досліджень;
2) ** — розраховували за допомогою коефіцієнту видової стійкості Ю.Р.Риболовлєва, виходячи з добової дози для людини.

Статистичну обробку результатів проводили параметричним методом з використанням коефіцієнту Стьюдента при рівні імовірності $p \leq 0,05$ [6]. Для статистичної обробки використовували програму Statistica 6.0. Мікроскопічне вивчення мікропрепаратів проводили під мікроскопом Micros 400. Фотографування зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nicon Col Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 4GH за допомогою програми Nicon View 5.

## Результати та їх обговорення

Як видно з табл. 3, комбіноване введення тетрахлорметану та етанолу тваринам групи позитивного контролю призвело до достовірного відносно негативного контролю збільшення МКП, що свідчить про наявність запального процесу. Результати біохімічних досліджень показали розвиток цитолізу гепатоцитів (достовірне відносно негативного контролю підвищення активності АлАТ); порушення ліпідного обміну: достовірне щодо негативного контролю підвищення вмісту загальних ліпідів та холестерину в сироватці крові; розвиток холестазу: достовірне відносно негативного контролю підвищення рівня ЛФ, ЖК в жовчі на тлі достовірного зниження інтенсивності жовчовиділення (табл. 3).

На тлі патології також спостерігали інтенсивність розвитку процесів ПОЛ: вірогідно зростав рівень ТБК-реактантів у печінці і підвищувалась концентрація холестерину в сироватці крові та знижувалась в жовчі. Відповідно включались захисні механізми АОС: вірогідно знижувався рівень ВГ в порівнянні з негативним контролем (табл. 3).

Проведене патоморфологічне дослідження ураженої печінки підтвердило вищевикладене (рис. 1-6). У перипортальних та перивенулярних зонах часто спостерігали некроз гепатоцитів з запальною лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією різної потужності. Кровоносні судини повнокровні, гемокапіляри поширені, містять збільшену кількість лімфоцитів, місцями спостерігались дрібні крововиливи. Ге-

Таблиця 2

**Схема гематологічних та біохімічних досліджень**

| Показник, що вивчається | Об'єкт дослідження | Метод | Клінічне значення показника | Літературне джерело |
|---|---|---|---|---|
| АлАТ, ммоль/год·л | Сироватка крові | За допомогою тест-набору "Lachema" виробництва Чехії | Маркерні ферменти цитолізу, що супроводжують запальні процеси та характеризують стан мембран | 6 |
| ЛФ | | | Маркерний фермент ураження печінки та холестазу | |
| Загальні ліпіди, г/л | | | Характеристика обміну ліпідів | |
| Холестерин, ммоль/л | | | | |
| ТБК-активні речовини | Гомогенат печінки | Згідно з методичними рекомендаціями [5] | Активність перекисного окиснення ліпідів; інтенсивність процесів ПОЛ і стану АОС | 14 |
| ВГ | | | | 20 |
| Швидкість секреції жовчі | Жовч | | Зовнішньовидільна функція печінки Інтенсивність жовчовідділення | 13 |
| Холестерин | | | | 8 |
| Жовчні кислоти | | | | |
| МКП | Печінка | | Наявність гострого запального процесу в печінці | 5 |

Таблиця 3

**Результати біохімічних показників в умовах експериментального хронічного гепатиту у щурів, викликаного тетрахлорметаном у поєднанні з етанолом (n = 40)**

| Показники | Умови досліду | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | негативний контроль | позитивний контроль (гепатит) | гепатит + речовина 5(4){2} | гепатит + амізон | гепатит + силібор |
| МКП, % | 3,43±0,1 | 4,39±0,21* | 3,61±0,15** | 3,92±0,10* | 3,52±0,12** |
| Сироватка крові | | | | | |
| АлАТ, ммоль/год·л | 0,65±0,04 | 1,15±0,06* | 0,82±0,05** | 0,87±0,09*/** | 0,72±0,07** |
| ЛФ, мкмоль/с·л | 0,75±0,05 | 1,86±0,19* | 1,13±0,06*/** | 1,12±0,15*/** | 1,00±0,06*/** |
| Загальні ліпіди, г/л | 1,19±0,14 | 2,36±0,21* | 1,77±0,07*/** | 1,92±0,12*/** | 1,54±0,16*/** |
| Холестерин, ммоль/л | 1,48±0,14 | 2,78±0,24* | 2,05±0,08*/** | 2,17±0,14*/** | 1,77±0,12** |
| Гомогенат печінки | | | | | |
| ТБК-активні речовини, мкмоль/г | 53,7±4,5 | 90,85±4,9* | 57,8±3,6**/*** | 85,3±3,6* | 65,24±6,52*/** |
| ВГ, ум. од. | 3,75±0,2 | 1,18±0,2* | 3,69±0,22**/*** | 2,7±0,17*/** | 2,84±0,4*/** |
| Жовч | | | | | |
| Швидкість секреції жовчі, мг/хв/100 | 5,93±0,35 | 3,34±0,29* | 5,34±0,40** | 5,50±0,30** | 6,40±0,54** |
| Жовчні кислоти, мг% | 817,54±49,43 | 498,94±45,77** | 721,46±26,16** | 725,04±41,74** | 771,62±37,29** |
| Холестерин жовчі, мг% | 41,75±4,57 | 24,58±1,89** | 38,21±3,67** | 36,07±3,44** | 39,58±2,91** |

Примітки:
1) * — відхилення показника достовірне стосовно групи негативного контролю, $p \leq 0,05$;
2) ** — відхилення показника достовірне стосовно групи позитивного контролю (патологія), $p \leq 0,05$;
3) *** — відхилення показника достовірне стосовно групи патологія + амізон.

патоцити часто набряклі, помітне коливання ядер за розміром. Доволі часто в уражених портальних трактах була помітна проліферація холангіол, помірна проліферація біліарного епітелію (рис. 4-6). Все це свідчило про хронічний перебіг патологічного процесу, високий ступінь його активності. Всі наведені зміни функціонально-біохімічних та патоморфологічних показників є свідоцтвом

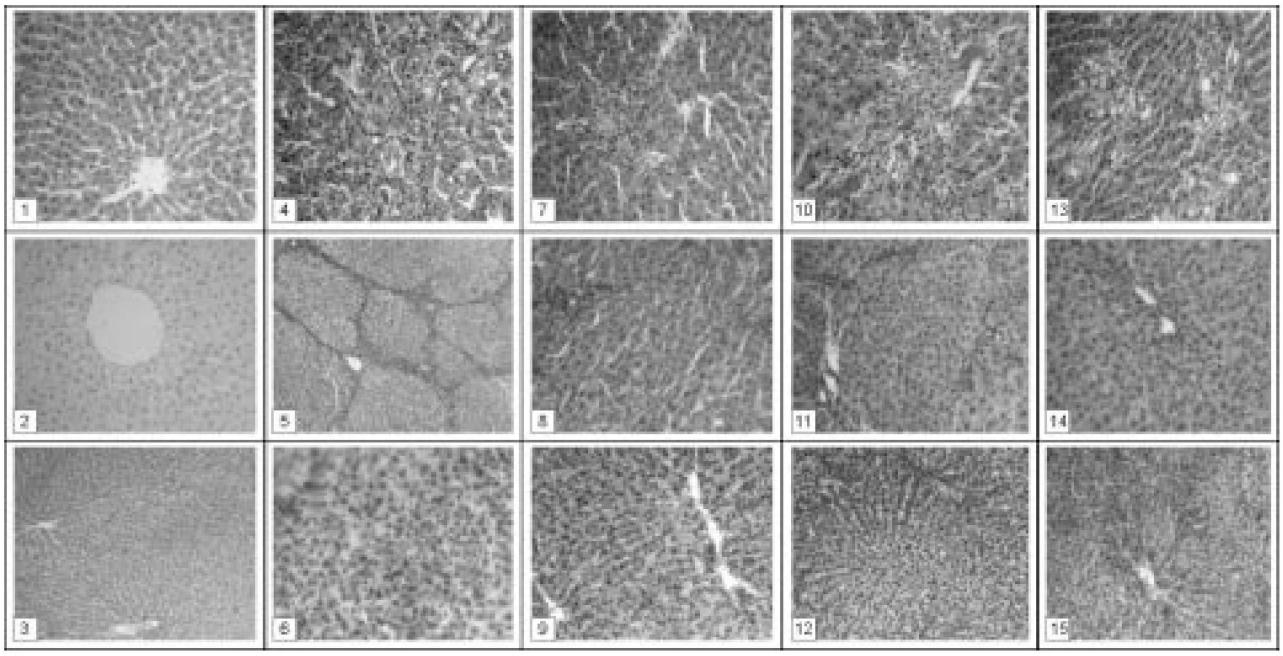
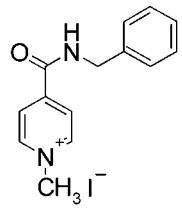
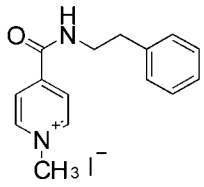



Рис. 1-3 — негативний контроль; 4-6 — позитивний контроль (патологія); 7-9 — патологія + речовина 5(4){2}; 10-12 — патологія + амізон; 13-15 - патологія + силібор (пояснення у тексті). 1, 4, 7, 10, 13 — гематоксилін-еозин; 2, 5, 8, 11, 14 — пікрофуксин за Ван-Гізоном; 3, 6, 9, 12, 15 — заморозка, судан IV. x100, 200, 250



4-(бензилкарбамоїл)-1-метилпіридинію йодид

**Амізон**



1-метил-4-[(2-фенілетил)карбамоїл]піридинію йодид

**Речовина 5(4){2}**

Рис. 16. Структура амізону та досліджуваної речовини 5(4){2}

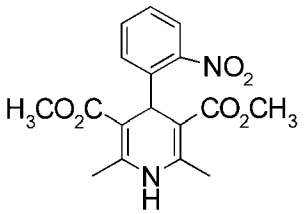


Рис. 17. Структура ніфедипіну

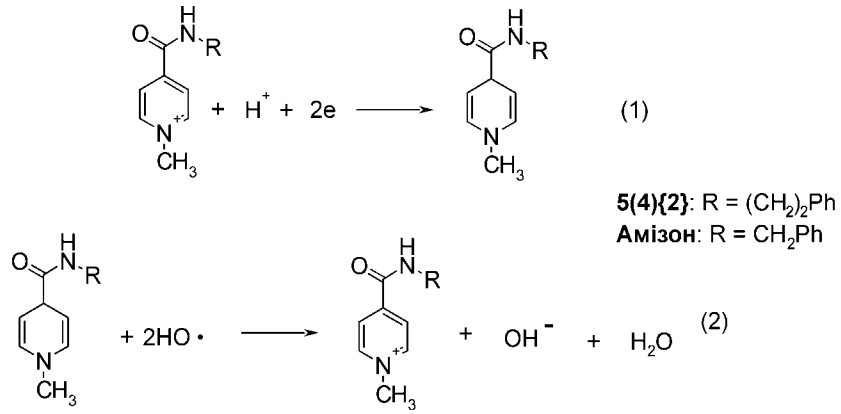
формування у дослідних тварин хронічного гепатиту доволі високого ступеня активності, що відповідає ряду досліджень [7].

Фармакотерапія хронічного гепатиту речовиною 5(4){2} та препаратами "Амізон" та "Силібор" приводить до суттєвого зниження запальних проявів — знижується показник МКП (табл. 3). Дослідження вмісту продуктів ПОЛ — ТБК-реактантів в гомогенаті печінки свідчили про зниження швидкості вільнорадикальних реакцій під дією речовини 5(4){2}, вірогідно, відносно показників групи позитивного контролю та амізону (табл. 3). Наслідком пригнічення процесів ПОЛ стало зниження проявів цитолізу: активності ферменту АлАТ (табл. 3). Значно підвищився рівень ВГ під дією речовини 5(4){2}, вірогідно відносно показників групи позитивного контролю та амізону (табл. 3), що свідчить про посилення антиоксидантного захисту.

Патоморфологічні дослідження підтверджують результати біохімічних досліджень. Під впливом речовини 5(4){2} показано (рис. 7-9), що осередки некрозу якщо і мали місце, були поодинокі, здебільшого ізольовані, дрібні. Запальна реакція у портальних трактах та периваскулярних зонах знижена або відсутня. На тлі фармакотерапії препаратом "Амізон" (рис. 10-12) осередки некрозу паренхіми печінки здебільшого ізольовані, зменшені за розміром, часто з явними ознаками організації. Запальна реакція варіювала, але в цілому зменшена порівняно з позитивним контролем. Під дією препарату "Силібор" (рис. 13-15) не спостерігали розвиток некрозу паренхіми або він носив невиразний, дрібноосередковий, ізольований характер. Запальна реакція відсутня, гемокапілярні розлади виразно знижені.

Досліджені препарати помірно впливали на ліпідний обмін: вміст загальних ліпідів та холестерину. Найбільш виражені вірогідні зміни відмічались під дією силібору (табл. 3). Патоморфологічні дослідження показали, що для печінки тварин, які отримували лікування речовиною 5(4){2} (рис. 7-9) та препаратом "Амізон" (рис. 10-12), характерна помірна жирова дистрофія, що носила дифузний дрібнокрапельний характер, не пошкоджувала цілісність гепатоцитів, у той час як у тварин, які отримували "Силібор", жирова дистрофія відсутня (рис. 13-15) приблизно у 75% щурів, у решти вона мала переважно помірний осередковий характер. Відомо, що жирова дистрофія гепатоцитів виникає як захисно-компенсаторна реакція на порушення ліпідного обміну, але цей процес має зворотний характер. Початковий етап розвитку хронічного запалення печінки під впливом тетрахлорметану та етанолу супроводжується розвитком жирової дистрофії [7]. Під дією досліджених речовин включаються захисно-компенсаторні механізми організму (відновлення балансу системи ПОЛ — АОС), яка призупиняє перехід гострого процесу в хронічний. Хронічний процес, що характеризується некрозом, запальною інфільтрацією та ознаками початкового фіброзу, змінюється на менш виражену патологію — жирову дистрофію гепатоцитів та відновлення нормальної морфологічної структури печінкової паренхіми. Наявність гіперхолестеринемії та гіперліпідемії, що супроводжується жировою дистрофією гепатоцитів, вказує на активацію захисно-компенсаторних механізмів [7].

Про підвищення функціональної активності печінки при фармакотерапії речовиною 5(4) та референтними препаратами свідчили також результати дослідження жовчовидільної та жовчоутворювальної функції органу: вірогідно підвищувалась секреція жовчі, вміст жовчних кислот та холестерину в жовчі — найважливіших компонентів зовнішнього секрету печінки (табл. 3). Активність маркера холестазу ЛФ вірогідно зменшувалась, але не досягала норми (табл. 3). Патоморфологічні дослідження показали, що для печінок щурів, які отримували речовину 5(4){2} (рис. 7-9), характерна відносно помірна проліферація жовчних канальців; під впливом амізону — проліферація жовчних канальців різного ступеня; силібор — проліферація жовчних канальців невиразна. Морфологічні дослідження щодо стану жовчних канальців дають змогу пояснити підвищену в різному ступені активність ЛФ, що зберігалась у дослідних тварин на тлі лікування (табл. 3).




1,4-дигідропіридиній (1); неактивні продукти відновлення (2)

Рис. 18. Механізм антиоксидантної дії речовини 5(4){2} та амізону

За хімічною будовою речовина 5(4){2} та амізон дуже подібні та являють собою кватернізовані похідні амідів ізонікотинової кислоти. Відмінністю структури речовини 5(4){2} від амізону є наявність додаткової метиленової ланки у ланцюгу, що з'єднує амідну групу з фенілом (рис. 16).

Структурний фрагмент кватернізованого піридину входить до коферментів нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (NADPH). Ці коферменти входять до складу ферментів дегідрогеназ I і II, що каталізують окисно-відновні реакції; виконують функцію переносників електронів та протонів від сполук, що окиснюються. Дегідрогенази беруть участь у метаболізмі жирів, протеїнів, амінокислот, пуринів, тканинному диханні, гліколізі, синтетичних процесах. Показано, що N-заміщені та N-незаміщені 1,4-дигідропіридини, які можна розглядати як продукти відновлення піридинів, кількісно нейтралізують супероксидіон [14]. Так, блокатори кальцієвих каналів ніфедипін, нісолдипін та інші аналоги показали антиоксидантну активність [12, 13] (рис. 17). Опираючись на наведені властивості піридинвмісних сполук, можна запропонувати механізм антиоксидантної дії речовини 5(4){2} та амізону. Подібно до нікотинаміду у складі NAD кватернізовані ізонікотинаміди у клітині можуть відновлюватися до відповідних 1,4-дигідропіридинів (1), які реагують з активними радикалами (супероксидіон, гідроксидний радикал та інші), переводячи їх у неактивні продукти відновлення (2), обриваючи тим самим ланцюг вільнорадикальних реакцій (рис. 18).

Згідно з запропонованою схемою речовина 5(4){2} та амізон подібно до NAD виконують роль переносників двох електронів та протону від клітинних відновників до радикалу. Відмінність у встановлених активностях речовини 5(4){2} та амізону вірогідно пояснюється дещо більшою біодоступністю метаболіту речовини 5(4){2}.

ВИСНОВОК

Таким чином, результати дослідження дають підставу вважати, що в умовах хронічного ураження печінки, викликаного тетрахлорметаном та етанолом, речовина 5(4){2} виявила гепатопротекторну активність. Це підтверджується інгібуванням процесів ПОЛ, вірогідним зменшенням показників ліпідного та вуглеводного обмінів та усуненням цитолізу гепатоцитів, позитивним впливом на всі ланки жовчоутворення, стимуляцією синтетичних процесів. Слід зазначити, що за антиоксидантною активністю речовина 5(4) показала перевагу над препаратами порівняння силібором та амізоном.

## ЛІТЕРАТУРА


1. *Голубєва М.Г. //Вісник фармації. — 2004. — №3 (39). — С. 80-82.*
2. *Губський Ю.І., Горюшко Г.Г., Курапова Т.М. //Ліки. — 2004. — №1-2. — С. 119-123.*
3. *Гудивок Я.С., Даниленко В.П., Голубєва М.Г. //Одес. мед. журн. — 2004. — №1 (81). — С. 95-98.*
4. *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. О.В.Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.*
5. *Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. — М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. — 424 с.*
6. *Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Ремедиум, 2000. — С. 349-354.*
7. *Подымова С.Д. Болезни печени: Руководство для врачей. — 3-е изд. — М.: Медицина, 1998. — 703 с.*
8. *Рахманин Ю.А., Кушнерова Н.Ф., Гордейчук Т.Н. и др. //Гигиена и санитария. — 1997. — №1. — С. 30-32.*
9. *Сілаєв А.О., Шаповал О.М. Вивчення жарознижуючої дії ряду нових похідних амідопіридинкарбонових кислот //Матер. VIII Всеукр. наук.-практ. конф. "Клінічна фармація в Україні". — Х., 2008. — С. 107.*

10. *Яковлєва Л.В., Ромелашвілі О.С., Коваленко С.М. та ін. Вивчення аналгезуючої дії ряду нових похідних амідів піридинкарбонових кислот // Сьогодення та майбутнє фармації: Тези доп. Всеукр. конгр. "Сьогодення та майбутнє фармації" (16-19 квітня 2008 р., м. Харків). — Х.: Вид-во НФаУ, 2008. — С. 422.*

11. *Яковлєва Л.В., Сілаєв А.О., Кошова О.Ю. Вивчення впливу нових похідних амідопіридинкарбонових кислот на фагоцитарну активність нейтрофілів //Проблеми синтезу біологічно активних речовин та створення на їх основі лікарських субстанцій: Матер. Укр. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д-ра хім. наук, проф. П.О.Петюніна, 26 лютого 2009 р., м. Харків / За ред. В.П.Черних. — Х.: Вид-во НФаУ, 2009. — С. 137.*

12. *Aruoma O., Smith C., Cecchini R. et al. //Biochem. Pharmac. — 1991. — Vol. 42. — P. 735-743.*

13. *Mason R.P., Mak I.T., Trumbore M.W., Mason P.E. //Am. J. Cardiol. — 1999. — Vol. 84. — P. 16L-22L.*

14. *Ortiz M.E., Nunez-Vergara L.J., Camargo C., Squella J.A. //Pharmacol. Res. — 2004. — Vol. 21, №3. — P. 428-435.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 714-27-15.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 15.04.2011 р.