ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ ДІЇ РОСЛИННОГО ГЕПАТОПРОТЕКТОРА ПІФЛАМІНУ

Л.В.Яковлева, О.О.Герасимова

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: піфламін; антиоксидантна дія, гепатопротекторні препарати; гідроксильні радикали; супероксиданіони; гострий тетрахлорметановий гепатит

Проведено експериментальне дослідження антиоксидантної дії нового гепатопротектора піфламіну з трави гороху посівного в умовах in vitro та in vivo. У модельних системах in vitro визначена сумарна антиоксидантна активність препарату в діапазоні доз 250-1250 мкг/мл і спроможність піфламіну до інактивації супероксидних та гідроксильних радикалів кисню. На моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту визначені ефективні дози препарату за антиоксидантною активністю — 100 та 150 мг/кг. Піфламін завдяки комплексу біологічно активних речовин (БАР) трави гороху посівного пригнічує інтенсифікацію вільнорадикальних процесів через пряму антирадикальну активність та шляхом підвищення активності фізіологічної антиоксидантної системи. За вираженістю антиоксидантних властивостей піфламін переважає поліфенольний гепатопротектор силібор.

Сучасний рівень гепатології дозволив встановити, що основним патогенетичним механізмом уражень печінки незалежно від етіології є інтенсифікація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і як наслідок — порушення структури і функцій клітинних і субклітинних мембран гепатоцитів. У зв'язку з цим для лікування захворювань печінки патогенетично обгрунтованим є використання рослинних препаратів поліфенольної природи [7]. Практичне застосування знайшли поліфенольні гепатопротектори-антиоксиданти: з розторопші плямистої (легалон, карсил, силімарин, флавобіон, лепротек, силібор, гепарсил, дарсил), цміну пісчаного (фламін), конвалії далекосхідної (конвафлавін), скумпії звичайної (флакумін) та інші [6, 7].

Пошук нових гепатопротекторів рослинного походження привів до створення препарату "Піфламін" з трави гороху посівного, розробленого на кафедрі фармакогнозії НФаУ доцентом А.М.Ковальовою. Субстанція піфламіну містить комплекс БАР: флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, амінокислоти, полісахариди, мікроелементи та інші.

Враховуючи багатокомпонентність впливу природних антиоксидантів фенольної структури на гіперліпопероксидацію [7, 12], ми вважали за доцільне проведення експериментального вивчення в системах in vitro та in vivo можливих механізмів антиоксидантної дії нового рослинного гепатопротектора піфламіну.

Матеріали та методи

Визначення сумарної антиоксидантної активності піфламіну проводили у модельній системі in vitro, яка містить жовточні ліпопротеїди (ЖЛП) [4]. Складовими показника сумарної антиокиснювальної активності є антирадикальна, антиперекисна дія, а також можлива спрямованість досліджуваних препаратів на взаємодію з каталізаторами ПОЛ — іонами заліза (II). Інтенсивність ПОЛ визначали за вмістом продуктів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою. Антиокиснювальну активність визначали за % інгібування процесу окиснення ЖЛП. Дослідження проводили у порівнянні з класичними антиоксидантами — іонолом і α-токоферолом, а також з аналогом за фармакологічною дією — поліфенольним гепатопротектором силібором.

Вивчення антиоксидантних властивостей субстанції піфламіну в системі in vivo проводили на білих мишах масою 25-30 г в умовах гострого тетрахлорметанового гепатиту, провідною патогенетичною ланкою якого є інтенсифікація процесів ПОЛ [8]. Дослідження проведене у порівнянні з антиоксидантом вітаміном Е в дозі 50 мг/кг [9] (в одній серії дослідів) і гепатопротектором силібором в дозі 25 мг/кг [2]. Після попереднього 24-годинного голодування без обмеження прийому води дослідні тварини одержували перорально субстанцію піфламіну в діапазоні доз від 25 до 150 мг/кг і референс-препарати, а тварини групи інтактного контролю — еквівалентну кількість води. Через 1 годину тваринам дослідних груп і групи контроль-

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

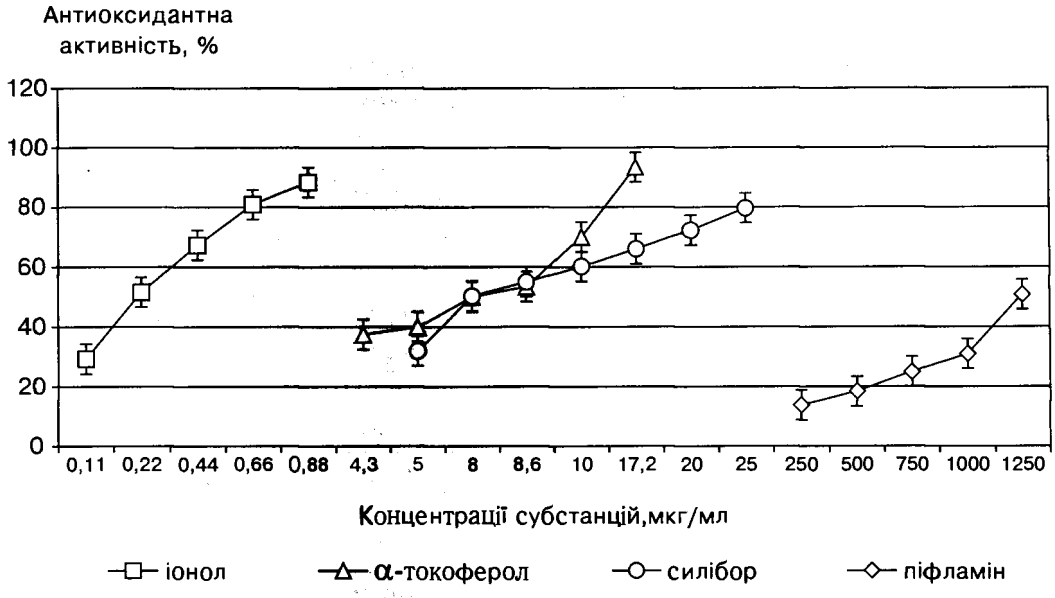

Рис. 1. Результати визначення сумарної антиокиснювальної активності піфламіну

ної патології вводили внутрішньошлунково 50% олійний розчин тетрахлорметану з розрахунку 0,04 мл на 10 г маси. Процедуру повторювали щодня. Через 3 дні тварин наркотизували і виводили з експерименту дислокацією шийних хребців. Потім відділяли у них печінку і зважували її для розрахунку показника гемодинаміки органу — масового коефіцієнта печінки (МКП). Інтенсифікацію вільнорадикальних процесів у печінці оцінювали за вмістом у гомогенаті органа продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів (ДК) [10] та малонового діальдегіду (МДА) [10]. Ступінь антиоксидантного захисту визначали за рівнем відновленого глутатіону (GSH) [11].

Для з'ясування механізмів антиоксидантної дії піфламіну в системі **in vitro** досліджували його прямі антирадикальні властивості. Вплив піфламіну на процес генерації супероксидних радикалів визначали за його здатністю гальмувати реакцію переходу адреналіну в адренохром при pH= =10,2, яка відбувається за участю супероксиданіонів [13]. Антирадикальну активність визначали у % інгібування окиснення адреналіну. Ефективність піфламіну відносно інактивації OH-радикалів оцінювали за його здатністю гальмувати руйнування дезоксирибози гідроксильним радикалом, який генерується модельною системою, до якої входять Fe-ЕДТА, H_2O_2 і аскорбат [14]. Антирадикальну активність визначали у % інгібування руйнування дезоксирибози. Дослідження проводили у порівнянні з модельною речовиною GSH препаратом з антирадикальною дією — манітом і гепатопротектором — силібором.

Отримані результати дослідження обробляли статистичним методом, використовуючи критерій Ст'юдента (t) [3].

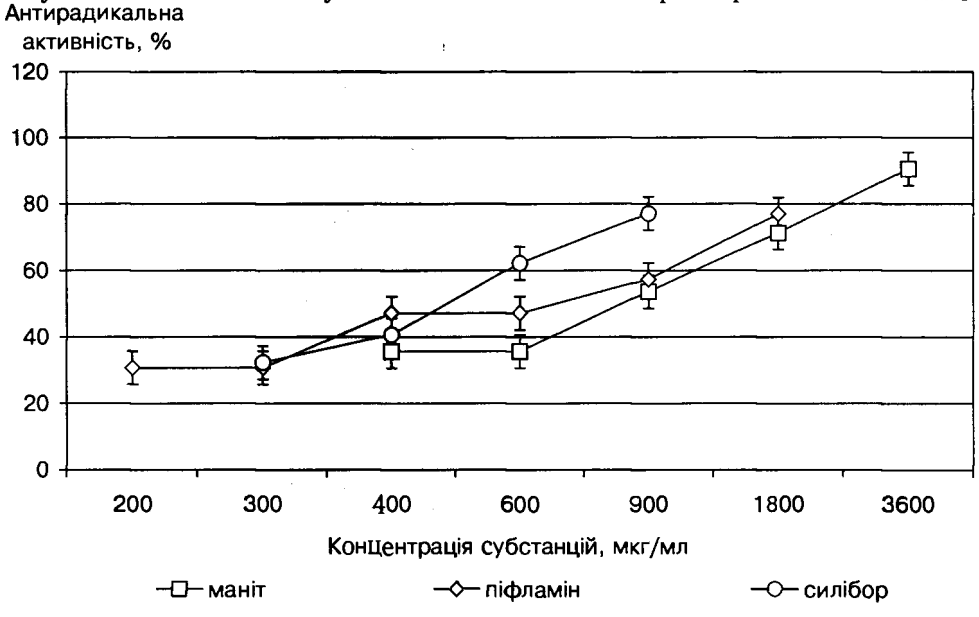

Рис. 2. Результати вивчення антирадикальної активності піфламіну відносно гідроксильних радикалів

Таблиця

Вплив субстанції піфламіну на процеси перекисного окиснення ліпідів при токсичному гепатиті у мишей у порівнянні з вітаміном Е (перша серія дослідів) і силібором (друга серія дослідів)

Умови досліду	Доза, мг/кг	n	МКП	GSH, ум.од.	ДК, мкмоль/г	МДА, мкмоль/г
Перша серія дослідів						
Інтактний контроль	-	5	5,62±0,21	36,76±5,48	0,102±0,007	42,92±5,71
Контрольна патологія	-	7	6,54±0,18*	8,13±0,92*	0,143±0,002*	64,87±4,76*
Вітамін Е	50	6	5,55±0,16**	20,24±2,27*/**	0,121±0,002*/**	38,03±5,22**
Піфламін	25	7	6,10±0,26	14,65±0,97*/**/***	0,115±0,002**	58,46±6,06***
	50	7	6,05±0,19	16,74±1,75*/**	0,111±0,001**/***	51,72±5,81
	100	6	5,81±0,20**	19,69±1,85*/**	0,097±0,009**/***	40,81±3,23**
	150	7	5,70±0,31**	22,06±3,09*/**	0,108±0,002**/***	42,06±6,08**
Друга серія дослідів						
Інтактний контроль	-	5	4,64±0,24	21,22±0,74	0,080±0,01	55,13±3,82
Контрольна патологія	-	6	7,14±0,26*	16,59±0,77*	0,130±0,01*	80,77±2,94*
Силібор	25	6	6,47±0,31*/**	18,42±1,42	0,10±0,01**	58,55±5,26**

Примітки:
1) * — відхилення показника достовірне стосовно групи інтактного контролю (P≤0,05);
2) ** — відхилення показника достовірне стосовно групи контрольної патології (P≤0,05);
3) *** — відхилення показника достовірне стосовно вітаміну Е (P≤0,05);
4) n — кількість тварин у групі.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження сумарної антиокиснювальної активності піфламіну представлені на рис. 1. Пригнічення піфламіном Fe^{2+}-індукованого переокиснювання ЖЛП спостерігалось у діапазоні концентрацій 250-1250 мкг/мл. З підвищенням концентрації препарату інгібування піфламіном процесів ПОЛ посилювалось і в концентрації 1250 мкг/мл було на рівні 50%. Значення ізоефективних концентрацій референс-препаратів, в яких вони зменшували накопичення МДА у межах 50%, склали: для іонолу — 0,22 мкг/мл, для α-токоферолу — 8,6 мкг/мл, для силібору — 8 мкг/мл.

Наявність сумарної антиоксидантної активності піфламіну у більш високих концентраціях, ніж у препаратів порівняння обумовлена комплексним складом піфламіну і невисоким вмістом в ньому поліфенолів, що вказує на доцільність використання досліджуваного об'єкту в умовах in vivo у більш високих дозах, ніж референс-препарати.

Це припущення ми підтвердили на моделі гострого токсичного гепатиту у мишей, який викликали класичним мембранотоксином — тетрахлорметаном. Активуючись на цитохромі Р-450, цей ксенобіотик утворює радикали $CCl_3^{\bullet}$ і $CCl_3O_2^{\bullet}$, які посилюють вільнорадикальне і перекисне окиснювання [1].

В наших дослідах (табл.) свідченням прооксидантної дії тетрахлорметану було накопичення проміжного (ДК) і кінцевого (МДА) продуктів ПОЛ, значне виснаження пулу показника АОС — GSH (у 4,5 рази) у гомогенаті печінки, а також достовірне збільшення МКП у порівнянні з інтактним контролем внаслідок порушення гемодинаміки органу.

Застосування піфламіну на тлі гепатотоксину виявило дозозалежний ефект і дозволило визначити ефективні за антиоксидантною дією дози препарату, які склали 100 і 150 мг/кг. Під впливом піфламіну в цих дозах динаміка МКП, показників ПОЛ і АОС була спрямована на відновлення їх вихідного рівня і була близькою до дії на них класичного антиоксиданту вітаміну Е у дозі 50 мг/кг. За спроможністю корегувати стан АОС в умовах аномального ПОЛ піфламін переважав гепатопротектор силібор у дозі 25 мг/кг, достовірно підвищуючи вміст GSH, що вказує на його виражені відновлювальні властивості і спроможність опосередковано впливати на гіперліпопероксидацію через підвищення антиоксидантного захисту організму.

Відомо, що вираженість вільнорадикальних процесів та ініціація ПОЛ обумовлена рівнем генерації активних форм кисню, утворення яких при аеробному метаболізмі є фізіологічним явищем. Підвищення інтенсивності цього процесу призводить до накопичення вільних радикалів кисню, які є ушкоджуючим фактором для біологічних мембран [5]. Це стало підгрунтям для вивчення прямих антирадикальних властивостей піфламіну.

У модельній системі, яка створює умови до генерації $OH^{\bullet}$-радикалів і містить Fe-ЕДТА, H_2O_2 і аскорбат, досліджувані субстанції виявили антирадикальну активність у широких діапазонах

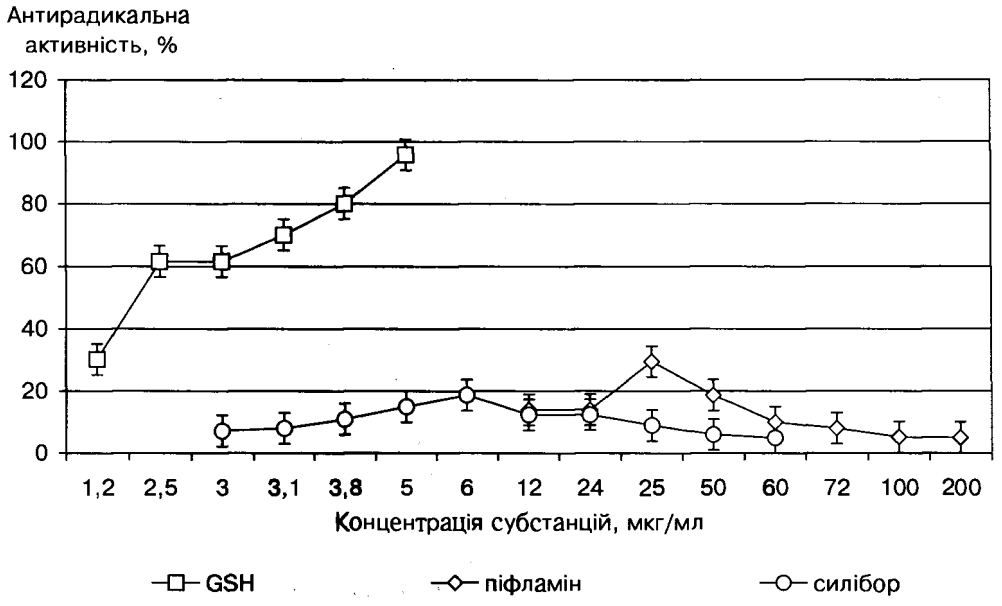

Рис. 3. Результати вивчення антирадикальної активності піфламіну відносно супероксиданіонів

концентрацій: піфламін — при 200-1800 мкг/мл, маніт — при 400-3600 мкг/мл, силібор — при 300-900 мкг/мл (рис. 2). При цьому підвищення концентрацій препаратів супроводжувалось посиленням їх антирадикальної активності. За величиною ізоефективної концентрації, в якій субстанції гальмували окиснення дезоксирибози на 50%, піфламін виявив перевагу перед референс-препаратами. Так, для піфламіну ця концентрація склала — 400 мкг/мл, для силібору — 600 мкг/мл, для маніту — 900 мкг/мл.

У системі, яка містить супероксидні радикали, утворені при окисненні адреналіну, найвираженіша антирадикальна активність спостерігалась у модельної речовини GSH, яка вже в малих концентраціях (2,5 мкг/мл) досягала 60%. Результати вивчення впливу піфламіну на супероксиданіони показали, що у обраній модельній системі його дія, як і силібору, була менш виразною і виявлялась у менших концентраціях, ніж у попередньому досліді (рис. 3). Максимум інгібування реакції переходу адреналіну в адренохром, яка проходить за участю супероксиданіонів, у був піфламіну на рівні 29,5% у концентрації 25 мкг/мл, у силібору складав лише 18,7% у концентрації 6 мкг/мл. При подальшому підвищенні доз піфламіну і силібору їх активність знижувалась.

Аналіз літературних джерел [1, 7] дозволяє стверджувати, що антиоксидантна дія піфламіну забезпечується поліфенольними сполуками і амінокислотами гороху посівного. Наявність легкорухомого атому водню в структурі поліфенолів дозволяє їм безпосередньо взаємодіяти з вільними радикалами, відновлювати та поповнювати фонд компонентів АОС. Це зменшує інтенсивність процесів ПОЛ, усуває деструкцію мембранних структур і підвищує опірність організму до різних негативних факторів зовнішнього середовища [7]. Природні амінокислоти можуть вбудовуватися у білки і, як ендогенні метаболіти з антиоксидантною активністю (цистеїн, метіонін, гістидин, аргінін), вносити додатковий вклад у захист організму від радикальних пошкоджень [1].

ВИСНОВКИ

1. В умовах in vitro та in vivo доведена антиоксидантна дія у нового рослинного гепатопротектора піфламіну, яку забезпечує комплекс БАР з трави гороху посівного.

2. Встановлені ефективні за антиоксидантною активністю дози препарату 100 та 150 мг/кг, які рекомендуються для використання у подальших дослідженнях фармакологічної активності піфламіну в системі in vivo.

3. Визначена пряма антирадикальна дія піфламіну по відношенню до гідроксильного та супероксидного радикалів та його здатність підвищувати активність антиоксидантного захисту організму щурів, за яким він переважає поліфенольний гепатопротектор силібор.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. — Л.: Медицина, 1986. — С. 156-160.*

2. *Дейнеко М.Ф., Шапоренко А.И. //Гастроэнтерология. — 1985. — Вып. 17. — С. 7-9.*

3. *Иванов Ю.И., Погорелюк Р.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.*

4. *Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. / Лабораторное дело. — 1988. — №5. — С. 59-62.*
5. *Логинов А.С., Матюшин Б.Н. //Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1996. — №4. — С. 3-5.*
6. *Свинцицкий А.С., Бабак О.Я. Фармакотерапевтический справочник гастроэнтеролога. Лекарственные препараты. Практическое пособие по гастроэнтерологии. — К.: Продюсерский центр "Плеяда", 2000. — 422 с.*
7. *Скакун Н.П., Шманько В.В., Охримович Л.М. Клиническая фармакология гепатопротекторов. Монография (справочник). — Тернополь: "Збруч", 1995. — 272 с.*
8. *Слышков В.В.//МОЗ Украины. Гастроэнтерология. Республиканский межведомственный сборник. — Вып. 27. — К.: "Здоров'я", 1992.— С. 45-48.*
9. *Слышков В.В. Поиск и фармакологическое изучение веществ с желчегонным и гепатозащитным действием среди производных оксикоричных кислот и 1Н-1,2-диазафеналена: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Х., 1996. — 23 с.*
10. *Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 42-44, 66-68.*
11. *Bentler E.D., Duron Q., Kelly B.M. //J. Laboratories Clin. Med. — 1963. — Vol. 61, №5. — P. 882.*
12. *Ferguson L.R. //Mutation Research. — 2001. — №475. — P. 89-111.*
13. *Fridovich I. //J. Biol. Chem. — 1972. — Vol. 247, №10. — P. 3170-3175.*
14. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.,'Aruoma O.I. //Anal. Biochem. — 1987. — Vol. 165, №1. — P. 215-219.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (0572) 14-27-15.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 03.12.2002 р.

Інформаційне повідомлення відділу фармакологічного нагляду Державного фармакологічного центру МОЗ України

Про побічну дію препарату **"Коринфар®"** (табл. в/плівкою по 20 мг) виробництва фірми "AWD" (Німеччина)

У хворого 75 років на гіпертонічну хворобу призначення в комплексній фармакотерапії (одночасно пацієнт отримував гіпотіазид, рибоксин, цинаризин, пірацетам) коринфару® (перорально по 10 мг 3 рази на добу) через 3 дні після першого прийому призвело до свербіння шкіри. Препарат був відмінений. Додатково призначений діазепін. Зазначені явища зникли без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому не відомі.

Інформація надійшла від Вінницького регіонального відділення ДФЦ МОЗ України.

Про побічну дію препарату **"Клацид"** (табл. по 250 мг) виробництва фірми "Abbott Lab. S.A." (Італія)

У хворого 46 років на хронічний обструктивний бронхіт, хламідіоз органів дихання призначення в комплексній фармакотерапії (одночасно пацієнт отримував лазолван, ацц-лонг, ербісол) клациду (перорально по 250 мг 2 рази на добу) через 30 днів після першого прийому призвело до появи нудоти, проносу. Препарат був відмінений. Зазначені явища зникли без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому не відомі.

Інформація надійшла від Вінницького регіонального відділення ДФЦ МОЗ України.