

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ФАРМАКОЛОГІЯ

Рекомендована д.м.н., професором С.М.Дроговою

УДК 547.98:57.017.67:616.36-002

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АЛЬТАНУ НА БІОХІМІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ПЕЧІНКИ ЗДОРОВИХ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Л.В.Яковлєва, І.В.Карбушева

Національний фармацевтичний університет

Наведені результати експериментального вивчення впливу альтану на біохімічні та функціональні показники печінки здорових щурів різного віку: інфантильного (1,5 міс.), пубертатного (3 міс.), репродуктивного (6 міс.), зрілого (12 міс.) та старого (24 міс.). Встановлено, що процеси перекисного окиснення ліпідів найбільш інтенсивно перебігають у інтактних інфантильних щурів, що відповідає найбільш виразним функціональним змінам гепатобіліарної системи у цій віковій групі (швидкості секреції жовчі та синтезу жовчних кислот). Процес старіння супроводжувався зниженням інтенсивності процесів ПОЛ, зменшенням функціональної спроможності ФАС, зменшенням швидкості секреції жовчі та підвищеннем її літогенних властивостей. Альтан при введенні в умовно терапевтичній дозі 1 мг/кг щурам усіх вікових груп протягом 1-го місяця сприяв відновленню порушеній з віком рівноваги ПОЛ/ФАС, підвищенню функціональної активності печінки та зменшенню літогенних властивостей жовчі у зрілих та старих щурів практично до рівня тварин репродуктивного віку. Отримані результати свідчать про геропротекторні властивості альтану та переконують у доцільноті проведення подальших досліджень з метою створення на його основі геропротекторного препарату.

Демографічна ситуація, що склалася в Україні в останні десятиріччя, характеризується прискореним темпом постаріння населення, зростанням частоти вікових патологій та смертності від серцево-судинних і онкологічних захворювань в усіх вікових групах [6]. За даними Державного комітету статистики України тільки за останні 8-ми років середня тривалість життя в Україні зменшилась на три роки. На сьогодні цей показник для чоловіків становить 61 рік, для жінок — 73 роки [7]. У зв'язку з цим актуальною медико-соціальну

проблемою є дослідження механізмів старіння та пошук геропротекторних засобів.

Серед існуючих теорій старіння однією з найбільш досліджених є вільнорадикальна теорія, запропонована D.Hartmann у 1957 р. [13]. На сьогоднішній день вона знайшла підтвердження у численних роботах вітчизняних та зарубіжних авторів [2, 12-18]. Згідно з цією гіпотезою причиною вікових уражень клітин є вільні радикали. Останні викликають порушення структури макромолекул колагену, еластину, хромосомних комплексів, мукополісахаридів, а також призводять до накопичення метаболічно інертних продуктів, одним з яких є пігмент ліпофусцин, який вважають свідоцтвом біологічного старіння організму [15-18]. Вказане обумовлює доцільність пошуку геропротекторів, у тому числі серед речовин з антиоксидантними властивостями.

З точки зору наукового пошуку привертає увагу велика група біологічно активних сполук поліфенольної структури — дубильних речовин, що реалізують антиоксидантні властивості за рахунок наявності в структурі великої кількості фенольних гідроксилів [11]. Відомо, що серед різних класів рослинних поліфенолів дубильні речовини виявляють найбільш виражені антиоксидантні властивості, що обумовило їхній вибір як об'єкта для фармакологічного дослідження [8].

З урахуванням вищенаведених даних об'єктом досліджень був обраний препарат “Альтан”, розроблений вченими НФаУ та співробітниками НВЦ “БХФЗ”. За хімічною структурою альтан є комплексом гідролізованих дубильних речовин — елаготанінів. У доклінічних дослідженнях, проведених на базі ЦНДЛ НФаУ в умовах *in vitro*, та *in vivo* встановлені виражені антирадикальні та антиоксидантні властивості альтану, а також проти-віразкова та гепатопротекторна дія у тварин репродуктивного віку [10].

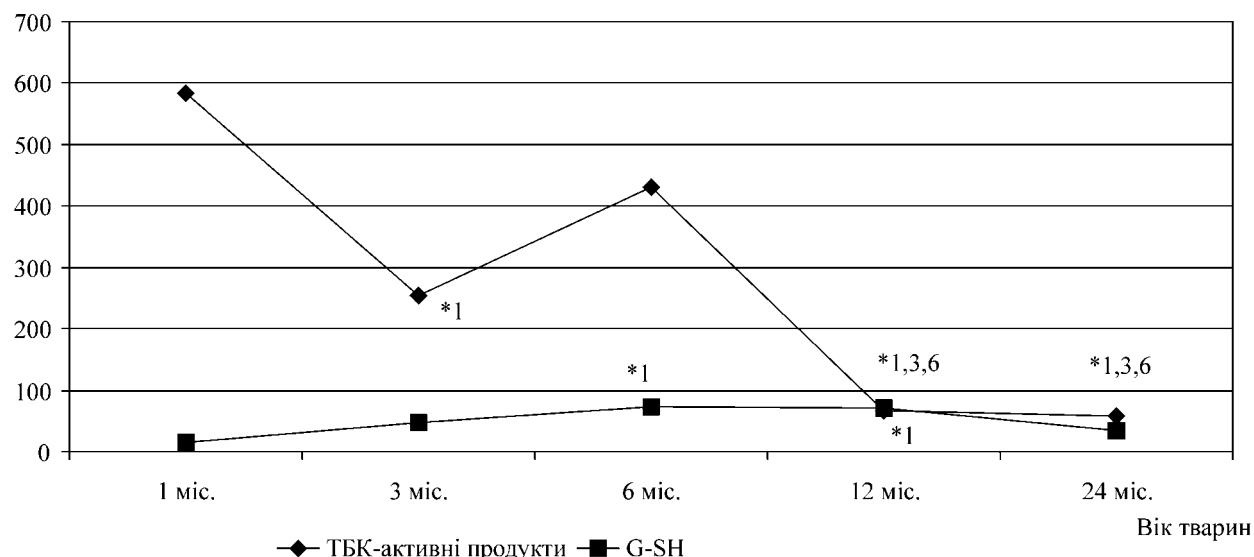


Рис.1. Вміст ТБК-активних продуктів та відновленого глутатіону у гомогенаті печінки інтактних щурів різного віку,  $n=10$ .

Примітки: 1. \* — відхилення достовірне по відношенню до інтактного контролю ( $p \leq 0,05$ );  
 2. \*1 — відхилення достовірне по відношенню до 1-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ );  
 3. \*3 — відхилення достовірне по відношенню до 3-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ );  
 4. \*6 — відхилення достовірне по відношенню до 6-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ ).

Враховуючи високу розповсюдженість захворювань печінки серед людей похилого і старечого віку, а також виражені антиоксидантні та гепатопротекторні властивості альтану, представляло інтерес дослідити, чи впливає препарат на вікові зміни біохімічних та функціональних показників печінки у здорових тварин різного віку, що і стало метою цього дослідження.

#### Матеріали та методи

У дослідах використовували щурів самців, вирощених у розпліднику віварію ЦНДЛ НФаУ. У період експерименту тварини знаходилися у віварії при  $t = 19-24^{\circ}\text{C}$ , вологості не більше 50%, природному світловому режимі “день-ніч” у пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні [5].

Вибір вікових періодів тварин для дослідження проводили відповідно до мети дослідження та з урахуванням їх співвідношення з віком людини [3]:

- інфантильний (0,5-1 місяць) — 4-7 років;
- пубертатний (2,5-4 місяців) — 14-17 років;
- репродуктивний (5-7 місяців) — 20-24 років;
- зрілий ранній (10-15 місяців) — 31-43 роки;
- зрілий пізній (16-20 місяців) — 45-55 років;
- старечий (21-26 місяців) — 56 і більше років.

Згідно з наведеними даними у досліді використовували щурів наступних вікових груп: інфантильні (1,5 місяці), пубертатного періоду (3 місяці), репродуктивного віку (6 місяців), зрілого віку (12 місяців) і старечого віку (24 місяці). Усього в досліді використано 100 більших щурів. Кожна вікова група включала 2 дослідні групи по 10 тварин: перша — інтактні тварини; друга — тварини, які протягом 1-го місяця одержували альтан у дозі 1 мг/кг. Доза альтану встановлена у доклінічних дослідженнях як найбільш ефективна за противи-

разковою та гепатопротекторною дією [10]. Альтан вводили внутрішньошлунково щоденно у вигляді водної суспензії з твіном-80 натще.

Активність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за рівнем ТБК-активних продуктів, стан фізіологічної антиоксидантної системи (ФАС) — за рівнем відновленого глутатіону (G-SH) у гомогенаті печінки [1]. Про функціональність печінки судили за швидкістю секреції жовчі (ШСЖ) та за вмістом жовчних кислот і холестерину в жовчі. На основі цих показників визначали холато-холестериновий коефіцієнт (ХХК) — показник, який характеризує літогенні властивості жовчі, що значною мірою відображають вікові зміни гепатобіліарної системи [5]. Інтегральним показником, який характеризує стан гепатобіліарної системи, служив масовий коефіцієнт печінки (МКП) [13]. Усі отримані результати обробляли за спеціальною програмою Statistica 5,0 for Windows на РК Pentium 200. Статистична обробка отриманих результатів здійснена за допомогою коефіцієнта Стьюдента ( $t$ ).

#### Результати та їх обговорення

Результати експериментальних досліджень з вивчення впливу альтану на біохімічні та функціональні показники печінки здорових тварин різного віку наведені на рис. 1-4.

Серед інтактних тварин досліджених вікових груп найбільшу активність процесів ПОЛ спостерігали в печінці інфантильних щурів, що можна пояснити високою активністю метаболічних процесів, пов’язаною з активним ростом і оновленням клітин у дитячому віці. На тлі високої активності процесів ПОЛ у інфантильних інтактних щурів спостерігали зниження рівня G-SH у порівнянні зі старшими віковими групами, що, ймо-

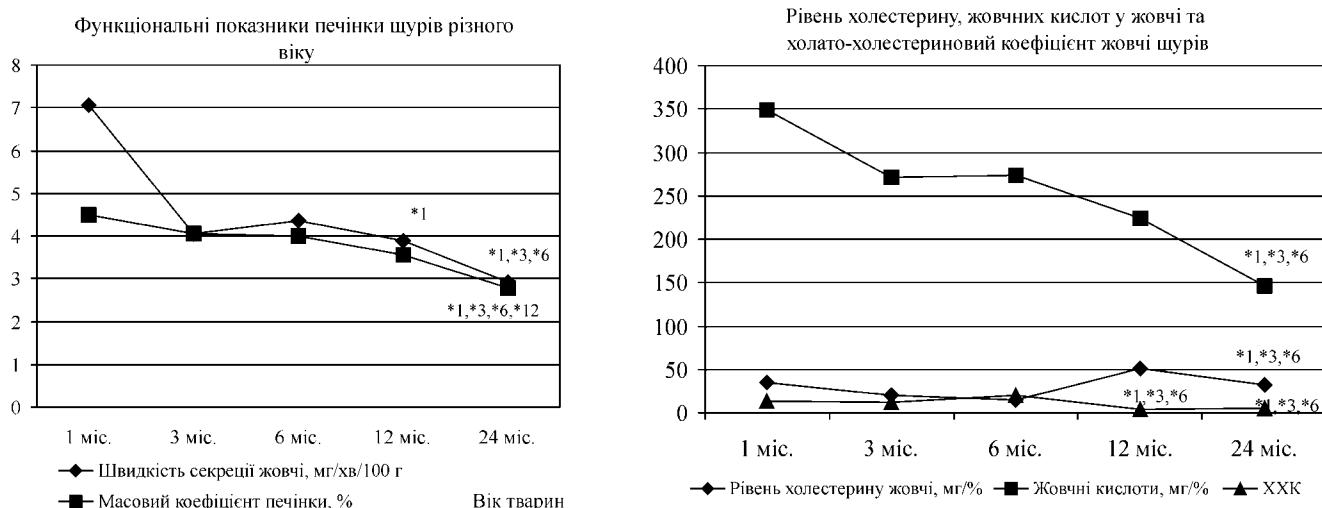


Рис. 2. Функціональні та біохімічні показники печінки інтактних щурів різного віку,  $n=10$ .  
 Примітки: 1. \* — відхилення достовірне по відношенню до інтактного контролю ( $p \leq 0,05$ );  
 2. \*1 — відхилення достовірне по відношенню до 1-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ );  
 3. \*3 — відхилення достовірне по відношенню до 3-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ );  
 4. \*6 — відхилення достовірне по відношенню до 6-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ );  
 5. ХХК — холато-холестериновий коефіцієнт.

вірно, пов’язано з недостатнім розвитком ферментативних білковосинтетичних систем печінки і високим рівнем споживання G-SH (рис. 1). Максимальні активності процесів ПОЛ у інфантільному віці у порівнянні з іншими віковими групами відповідають найбільш виражені функціональні зміни у печінці, про що свідчить найвищий показник швидкості секреції жовчі та вмісту жовчних кислот у жовчі в одномісячних щурів у порівнянні з іншими віковими групами (рис. 2).

При переході тварин у пубертатний період розвитку відбувається достовірне зменшення активності процесів ПОЛ на тлі підвищення захисної функції ФАС, яка зберігається на достатньо високому рівні до 12-місячного віку. При цьому активність ПОЛ у 12-місячних тварин знаходилася на достовірно нижчому рівні, ніж у печінці одно-, 3-ї та 6-ти місячних щурів. У печінці старих 24-місячних щурів спостерігали найменший вміст як ТБК-активних продуктів, так і G-SH у порівнянні з іншими віковими групами (рис. 1).

Результати наших досліджень корелюють з даними інших авторів і відповідають уявленням вільнорадикальної теорії старіння, згідно з якою цей процес супроводжується зниженням інтенсивності ПОЛ на тлі послаблення захисної функції ФАС [12, 13].

На функціональному рівні вікові зміни характеризувались достовірним зменшенням швидкості секреції жовчі (рис. 2). Так, найбільша швидкість відмічена у інфантільних 1-місячних щурів, найменша — у старих 24-місячних тварин (достовірно менша по відношенню до усіх інших вікових груп). Це можна пояснити, з одного боку, зниженням інтенсивності обмінних процесів з віком, а з іншо-

го — значним зменшенням кількості функціонально активних гепатоцитів, що описано іншими авторами [5, 9]. У свою чергу, зниження функціонального навантаження у 24-місячних тварин супроводжується зменшенням відносної маси печінки у порівнянні з іншими віковими групами, що також може свідчити про розвиток дистрофічних процесів.

Важливим показником, що характеризує вікові зміни гепатобіліарної системи, є літогенні властивості жовчі. У зв’язку з цим представляло інтерес дослідження холато-холестеринового коефіцієнта (ХХК), який є показником інтенсивності обміну жовчних кислот та холестерину у жовчі [4]. Зменшення показника ХХК свідчить про порушення обміну холестерину та його перетворення на жовчні кислоти, що призводить до підвищення літогенних властивостей жовчі.

Представлені дані (рис. 2) доводять, що з віком відбувається підвищення літогенних властивостей жовчі, про що свідчить достовірне зменшення ХХК у 12-ти та 24-х місячних щурів у порівнянні з іншими віковими групами. Підвищення літогенних властивостей жовчі при старінні та збільшення ризику розвитку жовчнокам’яної хвороби з віком підтверджується даними інших авторів [9]. Це зумовлено, з одного боку, порушенням процесу гідроксилювання холестерину та перетворенням його на жовчні кислоти, а з іншого, як описано у роботах Фролькіса В.В. — порушенням процесів перерозподілу холестерину та збільшенням вмісту атерогенних ліпопротеїдів низької щільності у печінці при старінні [9].

Таким чином, процес старіння гепатобіліарної системи інтактних тварин супроводжується порушенням рівноваги системи ПОЛ/ФАС у бік при-



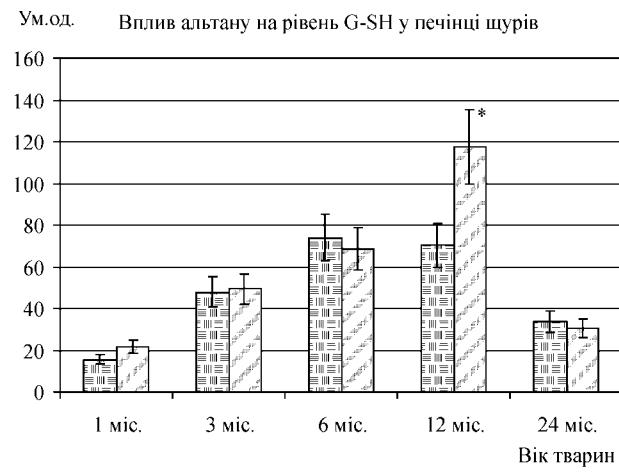
Рис. 3. Вплив альтану на активність процесів перекисного окиснення ліпідів та стан фізіологічної антиоксидантної системи здорових щурів різного віку,  $n=10$ .  
Примітка: \* — відхилення достовірне по відношенню до інтактного контролю ( $p \leq 0,05$ ).

гнічення активності ПОЛ та зменшення вмісту компонентів ФАС, зниженням функціональної активності печінки, а також підвищеннем літогенних властивостей жовчі.

Як показали результати нашого досліду, введення альтану в дозі 1 мг/кг здоровим щурам різних вікових груп протягом 1-го місяця достовірно не впливало на активність процесів ПОЛ у печінці тварин (рис. 3). Разом з тим відмічали виразну тенденцію до її змін практично у кожній віковій групі. Так, у інфантильних щурів відбувалось зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 11%, тоді як базальний рівень ПОЛ у цій групі був значно підвищений у порівнянні з іншими віковими групами (рис. 1, 3). У тварин з фізіологічно зниженим внаслідок вікових змін рівнем ТБК-активних продуктів у печінці (6, 12 та 24 місяці) альтан сприяв його підвищенню: на 14%, 36% і 18% відповідно. Таким чином, відбувається вирівнювання активності ПОЛ у напрямку до значення у щурів пубертатного віку.

З боку системи глутатіону під впливом досліджуваного препарату відбувалась аналогічна динаміка, спрямована на усунення вікових коливань ФАС. Це характеризувалось достовірним підвищением рівня G-SH у статевонезрілих та зрілих щурів у порівнянні з інтактними тваринами. Цей ефект альтану можна розглядати як підвищення резистентності організму шляхом активації системи антиоксидантного захисту, активність якої зменшується у дитячому віці та при старінні.

Необхідно відмітити, що незважаючи на аналогічну динаміку базального рівня ПОЛ/ФАС у зрілих та старих щурів, альтан по-різному впливав на цю систему. Так, у зрілих щурів відбувалось підвищення вмісту G-SH у печінці, у старих — виразна тенденція до його зниження. Вказана динаміка свідчить про збереження адаптаційних процесів у зрілому віці та їх зниження при старінні.

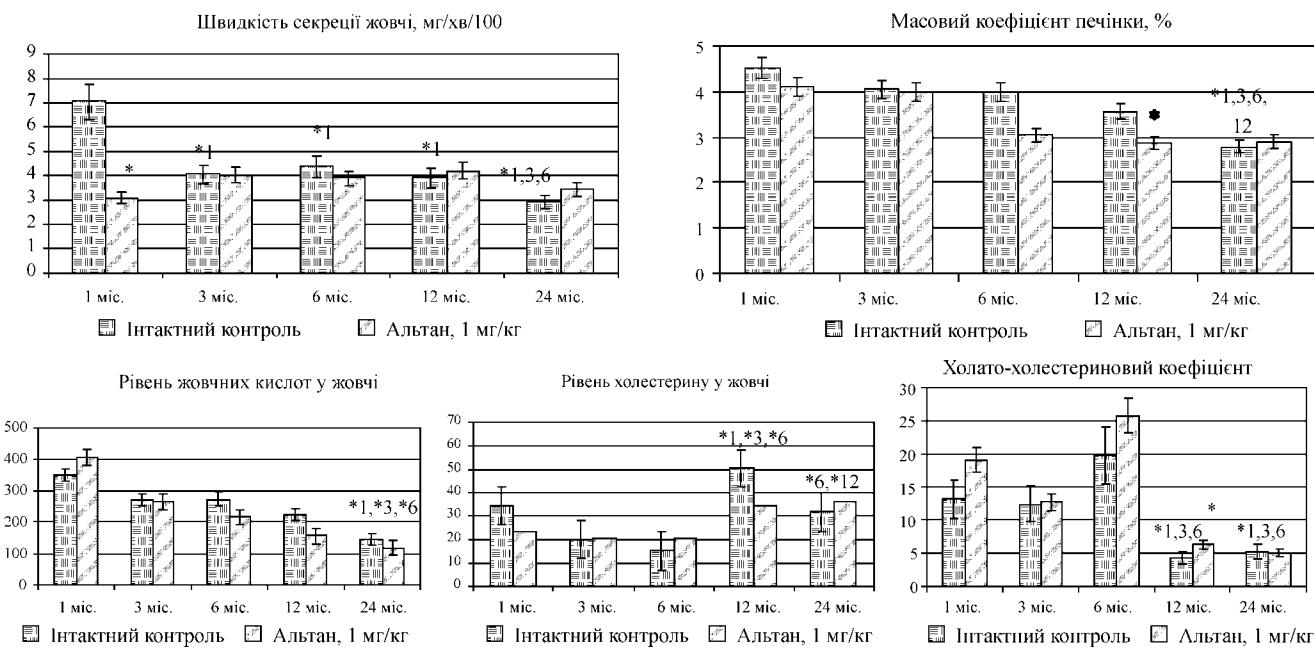


Очевидно, для більш вираженого впливу альтану у пізньому віковому періоді (24 міс.) необхідне триваліше застосування препарату, а саме, починаючи з періоду, який відповідає початку розвитку вікових змін, що було підтверджено у нашему досліді на 12-місячних тваринах. Це твердження співпадає з даними інших авторів про пряму кореляцію між геропротекторними властивостями антиоксидантів і терміном початку їх застосування [9, 14, 16].

Таким чином, вплив альтану на активність ПОЛ та ФАС печінки щурів різних вікових груп можна охарактеризувати як такий, що спрямований на збереження балансу співвідношення ПОЛ/АОС на рівні тварин репродуктивного віку (6 міс.).

Функціональна активність гепатобіліарної системи під впливом альтану корелює зі змінами біохімічних показників. Як описано вище, найбільша швидкість секреції жовчі спостерігалась у інтактних інфантильних щурів. З віком відбувається зниження базального рівня цього показника з мінімальним значенням у старих 24-місячних тварин. Альтан приводив до достовірного зменшення швидкості секреції жовчі у тварин інфантильного віку практично до рівня пубертатної вікової групи та проявив тенденцію до її підвищення у зрілих та старих щурів (рис. 4).

З боку синтетичних процесів у печінці під впливом альтану відмічали зміни холестерину жовчі, спрямовані на збереження його вмісту на рівні тварин репродуктивного віку: у 1- та 12-місячних — тенденція до зниження, у 3-, 6- та 24-місячних — показники залишались без змін практично на одному рівні (рис. 4). Вплив альтану на обмін холестерину у жовчі знайшов відображення на показнику ХХК (рис. 4). В інфантильних щурів під впливом альтану відбувалось зменшення літогенних властивостей жовчі, що підтверджувалось збільшенням ХХК на 44,3% у порівнянні з інтакт-

Рис. 4. Вплив альтану на функціональну активність печінки та літогенні властивості жовчі різного віку,  $n=10$ .

Примітки: 1. \* — відхилення достовірне по відношенню до інтактного контролю ( $p \leq 0,05$ );  
2. \*1 — відхилення достовірне по відношенню до 1-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ );  
3. \*3 — відхилення достовірне по відношенню до 3-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ );  
4. \*6 — відхилення достовірне по відношенню до 6-місячних тварин ( $p \leq 0,05$ ).

ним контролем (рис. 4). У 12-місячних тварин альтан також сприяв достовірному зменшенню літогенних властивостей жовчі (на 44,6%), які у цьому віці збільшуються. При цьому у зрілих і старих щурів відбувались зміни МКП, спрямовані на підтримання гомеостазу печінки на рівні тварин репродуктивного віку.

Введення альтану у дозі 1 мг/кг протягом 1-го місяця тваринам пубертатного (3 міс.) та репродуктивного (6 міс.) віку не викликало достовірних змін ні біохімічних, ні функціональних показників печінки (рис. 3, 4).

Таким чином, введення альтану приводить до відновлення порушеній з віком рівноваги ПОЛ/ФАС, функціональної активності печінки та зменшенню літогенних властивостей жовчі, що свідчить про його геропротекторні властивості.

Згідно з результатами нашого дослідження альтан проявив властивості неспецифічного регулятора адаптивних процесів незалежно від віку. Це проявилося компенсацією недостатності ферментативних систем гепатобіліарної системи як у ін-

фантильному віці внаслідок їх недостатнього розвитку, так і у зрілому та старому внаслідок вікових дегенеративних змін.

#### ВИСНОВКИ

1. Процес старіння супроводжується порушенням рівноваги ПОЛ/ФАС у печінці у бік зниження активності ПОЛ та вмісту компонентів ФАС.

2. У зрілих (12 місяців) та старих (24 місяці) тварин інтактних груп відмічено зниження функціональної активності печінки, а також підвищення літогенних властивостей жовчі.

3. Альтан компенсував недостатній розвиток ферментативних систем печінки у інфантильних щурів, що характеризувалось змінами біохімічних і функціональних показників до рівня статевозрілих тварин.

4. Альтан відновлював порушені з віком біохімічні та функціональні показники печінки до рівня молодих тварин репродуктивного віку (6 місяців), а також зменшував літогенні властивості жовчі у старих щурів, що свідчить про його геропротекторні властивості.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. рекоменд.* — С.Пб.: ИКФ Фолиант, 2000. — 104 с.
2. Биологические проблемы старения. Замедление старения антиоксидантами / Под ред. Е.Б.Бурлаковой, Т.Л.Наджаряна. Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы биологии. — М., 1986. — Т. 5. — 231 с.
3. Гуськова Т.А. *Токсикология лекарственных средств.* — М.: Изд. дом Русский врач. — 2003. — 154 с.
4. Дроголов С.М., Губський Ю.І., Скакун М.П. та ін. *Експериментальне вивчення жовчогінної, холелітіазної та гепатопротекторної активності нових лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. О.В.Степанова.* — К.: Вид. дім “Авіценна”, 2001. — С. 334-351.

5. Западнюк М.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Использование в эксперименте. — К.: Вища школа, 1983. — 878 с.
6. Коркушко О.В., Шатило В.Б., Ярошенко Ю.Т. Передчасне старіння. Фактори ризику. Діагностика. Засоби попередження. Метаболічна терапія. — К., 2003. — 52 с.
7. Медична статистика України (аналітично-статистичний довідник). — К., 2000. — 120 с.
8. Сахарова Т.С. // Клінічна фармація. — 2001. — Т. 5, №1. — С. 64-67.
9. Фролькис В.В., Мурадян Х.К. Старение, эволюция и продление жизни. — К.: Наукова думка, 1992. — 334 с.
10. Яковлєва Л.В., Карбушева І.В., Сахарова Т.С. Możliwości wykorzystania preparatu dубильних речовин альтану dla leczenia kolitów. — X: Złotyi stórińki, 2003. — 136 s.
11. Bravo L. // Nutr. Rev. — 1998. — №56. — Р. 317-333.
12. Cutler R.G. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1991. — Vol. 621. — P. 1-28.
14. Harman D. // J. Anti-Aging Med. — 1999. — Vol. 2. — P. 15-36.
13. Emanuel N.M. Kinetics and free-radical mechanismus of aging and carcinogenesis // In.: Age-Related Factors in Carcinogenesis. Likhachev A.J., Anisimov V.N., Montesano R., Eds. (IARS Sci.Publ.No.58). — IARS: Lyon, 1985. — P. 127-149.
15. Lee C.M., Weindruch R., Aiken J.M. // Free Rad. Biol. Med. — 1997. — Vol. 22. — P. 4159-4164.
16. Papa S., Skulachev V.P. // Molec. Cell. Biochem. — 1997. — Vol. 174. — P. 305-319.
17. Shigenaga M.K., Hogen T.M., Ames B.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1994. — Vol. 91. — P. 10771-10778.
18. Sohal R.S., Weindruch R. // Science. — 1996. — Vol. 273. — P. 59-63.

УДК 547.98:57.017.67:616.36-002

## ІЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЛЬТАНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ ЗДОРОВЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Л.В.Яковлева, И.В.Карбушева

Приведены результаты экспериментального изучения влияния альтана на биохимические и функциональные показатели печени здоровых крыс разного возраста: инфантального (1,5 мес.), пубертатного (3 мес.), репродуктивного (6 мес.), зрелого (12 мес.) и старого (24 мес.). Установлено, что процессы перекисного окисления липидов наиболее интенсивно протекают у интактных инфантальных крыс, что соответствует наиболее выраженным функциональным изменениям гепатобилиарной системы в этой возрастной группе (скорость секреции желчи и синтез желчных кислот). Процесс старения сопровождается снижением интенсивности процессов ПОЛ, уменьшением функциональной активности ФАС, снижением скорости секреции желчи и повышением ее литогенных свойств. Альтан при введении в условиях терапевтической дозе 1 мг/кг крысам всех возрастных групп на протяжении 1-го месяца приводил к восстановлению нарушенного с возрастом равновесия ПОЛ/ФАС, повышению функциональной активности печени и уменьшению литогенных свойств желчи у зрелых и старых крыс практически до уровня животных репродуктивного возраста. Полученные результаты свидетельствуют о геропротекторных свойствах альтана и целесообразности проведения дальнейших исследований с целью создания на его основе геропротекторного препарата.

UDC 547.98:57.017.67:616.36-002

## THE STUDY OF ALTAN'S INFLUENCE ON BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF LIVER OF HEALTHY RATS OF DIFFERENT AGE

L.V.Yakovleva, I.V.Karbusheva

The results of the experimental study of Altan's influence on biochemical and functional parameters of healthy rats liver of different age: infantile (1,5 months), puberty (3 months), reproductive (6 months), mature (12 Months) and old (24 months) are given in the article. It has been found that lipid peroxide oxidation processes are the most intensive in intact infantile rats, it corresponds the most marked functional changes of hepatobiliary system in this age group (the rate of bile secretion and synthesis of biliary acids). The ageing process is accompanied by decrease in intensity of lipid peroxide oxidation, reduction of the functionality of physiological anti-oxidative system, reduction of the rate of bile secretion and increase of its lithogenic properties. Introducing Altan to rats in a relatively therapeutic dose of 1 mg/kg all age groups for a month led to the restoration of the balance of lipid peroxide oxidation and physiological anti-oxidative system disturbed by age, the increase of functional activity of the liver and the decrease of lithogenic properties of the bile in mature and old rats to the level of reproductive age animals. The results obtained prove hepatoprotective properties of Altan and the expediency of the further research with the aim of creating a hepatoprotector on its basis.