

Н. А. Цубанова

Вивчення гепатопротекторної дії спіроциклічного похідного оксіндолу за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: спіроциклічне похідне оксіндолу, гострий гепатит, гепатопротекторна дія

У патогенезі переважної більшості захворювань вагома роль відводиться некерованій активації процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) мембранних ліпідів. Формується неспецифічна реакція, яка носить назву «окисного стресу», вільнорадикальної патології або синдрому пероксидації [4, 10]. Наслідком цієї реакції є зростання рівня радикальних інтермедіатів кисню, а також продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), під впливом яких відбувається деградація макромолекулярних компонентів клітини та втрата функціональної діеспроможності органу в цілому. Поряд з активацією при патології процесів ПОЛ відбувається суттєве зниження дії фізіологічної антиоксидантної системи (АОС), яка бере участь у первинних фізико-хімічних процесах адаптації, і до якої входить ферментативна та неферментативна ланки. Зазначені молекулярні механізми патогенезу є типовими для розвитку більшості захворювань людини [4, 9, 11].

Натепер асортимент антиоксидантів, що застосовуються в медичній практиці, досить обмежений [3, 8]. До числа антиоксидантів синтетичного походження належить похідне емоксипіну – мексидол [3], дія якого реалізується завдяки гальмуванню процесів ВРО та відновленню пулу природних компонентів АОС.

Пошук та створення нових препаратів із вираженою антиоксидантною дією та низькою токсичністю є актуальним питанням сучасної медицини та фармації. Перспективною в цьому аспекті

можна вважати нову сполуку – 4,3'-спіро [(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано [3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол] (у подальшому сполука 77), що була синтезована вченими НФаУ (Редькін Р. Г., проф. Шемчук Л. А.) та, згідно з результатами дослідження, має значну антигіпоксантичну активність [6] та низьку токсичність [7].

Мета дослідження – вивчення антиоксидантної та антицитолітичної активності спіроциклічного похідного оксіндолу на тлі гострого тетрахлорметанового гепатиту в щурів.

Матеріали та методи. Для підтвердження антиоксидантних та антицитолітичних властивостей сполуки 77 було обрано модель гострого тетрахлорметанового гепатиту в щурів-самців.

Гострий тетрахлорметановий гепатит у щурів масою 190–230 г викликали шляхом дводенного внутрішньошлункового введення 50 % масляного розчину тетрахлорметану в дозі 0,8 мл/100 г маси тіла [1] один раз на добу. Сполуку 77 у дозі 5 мг/кг, що чинить найбільший антигіпоксантичний ефект [6], вводили в шлунок у лікувальному режимі протягом 3 діб (2 доби на тлі введення тетрахлорметану, 1 доба після моделювання гепатиту). Препарат порівняння мексидол (антигіпоксантичний антиоксидант) виробництва ВАТ «Мир-фарм», Росія, вводили щурам у дозі 100 мг/кг за аналогічною схемою. Ефективність застосування мексидолу на тлі гепатитів доведена в доклінічних та клінічних фармакологічних дослідженнях [5]. Препарат порівняння дарсил (гепатопротектор) виробництва ЗАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна, вводили в дозі 6,3 мг/кг за силіма-рином у тому самому режимі. Контрольні тварини одержували еквівалентну кількість води.

При моделюванні патології печінки через 24 год після останнього введення гепатотоксину й досліджуваних препаратів тварин наркотизували 1 % розчином барбамілу, який не впливає на процес жовчоутворення, оперували та збирали секретовану жовч годинними порціями протягом 3 год [1]. Потім декапітацією щурів виводили з експерименту, збирали кров, робили резекцію печінки для визначення вагового коефіцієнта печінки та приготування гомогенату з метою проведення біохімічного аналізу. Вплив препаратів на функціональний стан печінки при її ураженні оцінювали за біохімічними показниками, які досліджували в тканині печінки, жовчі, сироватці крові. Критерієм інтенсивності процесів ПОЛ і стану АОС був рівень показників сироватки крові та гомогенату печінки: реактанти тіобарбітурової кислоти (ТБК – реактанти), дієнові кон'югати (ДК), відновлений глутатіон (ВГ) [2]. Зовнішньовидільну функцію печінки оцінювали за зміною інтенсивності жовчовиділення: враховували швидкість секретції жовчі за кожну годину спостереження в мг/хв/100 протягом 3 год, і визначали вміст холестерину й жовчних кислот (у мг%) [1, 2]. У сироватці крові за допомогою набору реактивів фірми «Lachema» визначали активність маркерного ферменту цитолізу аланінамінотрансферази (АлАТ) за

Райтманом та Френзелем. Стан ліпідного обміну характеризували за рівнем у сироватці крові холестерину за реакцією Лібермана-Бурхардта.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistika 6.0. з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Внутрішньошлункове введення тетрахлорметану, класичного мембранотропного токсину, викликає активацію ВРО в мембранах гепатоцитів.

Результати дослідження наведено в таблицях 1–3.

Гострий токсичний гепатит, викликаний тетрахлорметаном, супроводжувався виразним порушенням функцій печінки. Швидкість секретції жовчі в тварин з патологією зменшилася в 3,6 разу, концентрація холестерину жовчі в 2,1 разу, жовчних кислот у 1,8 разу, у той самий час вміст холестерину в сироватці крові збільшився в 1,8 разу (табл. 2). Гіперхолестеринемія на фоні зниження вмісту холестерину й жовчних кислот у жовчі, свідчать про розвиток синдрому холестазу. Крім того, підвищення вмісту холестерину в сироватці є компенсаторною реакцією при інтенсифікації процесів ПОЛ, тому що, при гіперхолестеринемії холестерин легше вбудовується в мембрани клітин і стабілізує їх.

Таблиця 1

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу (сполуки 77) та препаратів порівняння на масовий коефіцієнт печінки та активність аланінамінотрансферази при гострому тетрахлорметановому гепатиті в щурів, (n = 8)

Умови досліджу	Масовий коефіцієнт печінки, %	АлАТ у гомогенаті печінки, мккат/л	АлАТ сироватки крові, мккат/л
Інтактний контроль	2,71±0,02	1,07±0,02	0,79±0,02
Контрольна патологія	3,67±0,08*	2,90±0,04*	2,19±0,05*
Сполука 77, 5 мг/кг	3,01±0,03* # \$	1,72±0,04* # \$ ^	1,38±0,02* # ^^
Мексидол, 100 мг/кг	3,20±0,03* #	2,09±0,03* # ^^	1,32±0,02* #
Дарсіл, 6,3 мг/кг	2,95±0,04** #	2,31±0,03* #	1,60±0,04* #

Примітка. 1) * P < 0,001, ** P < 0,01 – достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю;

2) # P < 0,001 достовірні відмінності з показниками контрольної патології;

3) \$ P < 0,001 достовірні відмінності з показниками групи мексидолу;

4) ^ P < 0,001, ^^ P < 0,01 достовірні відмінності з показниками групи дарсілу.

Таблиця 2

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу (сполуки 77) та препаратів порівняння на функціональні та біохімічні показники печінки при гострому тетрахлорметановому гепатиті в щурів, (n = 8)

Умови досліджу	Швидкість секреції жовчі, мг/хв/100	Холестерин сироватки крові, ммоль/л	Холестерин жовчі, мг/%	Жовчні кислоти, мг/%
Інтактний контроль	4,79±0,09	1,50±0,06	29,50±0,91	825,0±13,5
Контрольна патологія	1,32±0,09 *	2,78±0,11*	13,70±0,37*	464,0±24,9*
Сполука 77, 5 мг/кг	2,97±0,09* #§	2,13±0,08* #	18,10±0,25* #^	590,0±20,1* ##^
Мексидол, 100 мг/кг	2,62±0,06* #^	2,26±0,07* ##	17,50±0,35* #	562,0±23,0* ###
Дарсіл, 6,3 мг/кг	3,81±0,03* #^	1,97±0,06* #	21,60±0,49* #	712,0±23,4* ##

Примітка. 1) * P < 0,001, ** P < 0,01 достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю; 2) # P < 0,001, ## P < 0,01, ### P < 0,05 достовірні відмінності з показниками контрольної патології; 3) § P < 0,05 достовірні відмінності з мексидолом; 4) ^ P < 0,01 достовірні відмінності з дарсілом.

Таблиця 3

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу (сполуки 77) та препаратів порівняння на показники системи ПОЛ-АОС при гострому тетрахлорметановому гепатиті в щурів, (n = 8)

Показник	Умови експерименту				
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Сполука 77, 5 мг/кг	Мексидол, 100 мг/кг	Дарсіл, 6,3 мг/кг
Гомогенат печінки					
ТБК-реактанти, мкмоль/г	80,30±1,04	240,00±5,81*	131,00±4,68* #§^	160,00±4,21* #	187,00±6,37* #§
ДК, мкмоль/г	5,38±0,31	10,4±0,56*	6,24±0,43* ##^	7,74±0,32* ##	7,69±0,27* ##
ВГ, у. о.	115,00±3,23	64,40±3,37*	100,00±1,75** #§^	83,90±3,42* ##	83,30±1,68* ##
Сироватка крові					
ТБК-реактанти, мкмоль/л	1,12±0,05	3,03±0,06*	1,91±0,06* #§^	2,29±0,04* #	2,42±0,06* #
ВГ, у. о.	65,90±1,72	31,20±1,67*	62,10±2,66* ##^	55,40±1,75* #	45,10±2,09* ##§

Примітка. 1) * P < 0,001, ** P < 0,01 достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю; 2) # P < 0,001, ## P < 0,01 достовірні відмінності з показниками контрольної патології; 3) § P < 0,01; §§ P < 0,05 достовірні відмінності з мексидолом; 4) ^ P < 0,001, ^^ P < 0,05 достовірні відмінності з дарсілом.

Гострий гепатит характеризувався вираженим синдромом цитолізу, концентрація АлАТ збільшилася в гомогенаті печінки в 2,7 разу, у сироватці крові – у 2,8 разу. Достовірне підвищення масового коефіцієнта печінки на 35 % свідчить про важку інтоксикацію та розвиток запального процесу в тканині органу під впливом тетрахлорметану (табл. 1).

Експериментальний гепатит супроводжувався активацією процесів ПОЛ, про що свідчить достовірне підвищення проміжних (ДК) і кінцевих (ТБК – активні речовини) продуктів окиснення ліпідів у 1,9 і 3 рази відносно показників інтактного контролю. У групі контрольної патології спостерігали також суттєве зниження активності системи

АОС, про що свідчить зменшення запасів ВГ у середньому в 2 рази в гомогенаті печінки та сироватці крові порівняно з інтактним контролем (табл. 3).

Уведення сполуки 77 сприяло нормалізації біохімічних і функціональних показників печінки. Вірогідно зменшилися прояви синдрому цитолізу (рівень АЛАТ зменшився в 1,6–1,7 разу в сироватці крові та в гомогенаті печінки) та загального запального процесу (показника масового коефіцієнта печінки) (табл. 1). Також необхідно відзначити, що протизапальний та антицитолітичний ефект досліджуваної сполуки достовірно перевищує активність референс-препаратів.

На тлі введення сполуки 77 відбувається нормалізація процесів жовчоутворення, але за впливом на швидкість секреції жовчі, концентрацію жовчних кислот та холестерину жовчі, сполука 77, як і мексидол, вірогідно поступаються гепатопротектору дарсілу (табл. 2).

Сполука 77 виявляє виражену антиоксидантну активність, на що вказує достовірне зниження ДК (у 1,7 разу) і ТБК-активних речовин (у 1,8 разу) у печінці відносно групи контрольної патології, тоді як референс-препарати мексидол і дарсіл знижували процеси пероксидації зі значно меншою ефективністю (у середньому в 1,3–1,4 разу). Сполука 77 сприяла відновленню функції АОС, про що свідчить достовірне

збільшення рівня ВГ у гомогенаті печінки на 56 %, у сироватці крові на 100 % відносно групи контрольної патології. Вплив мексидолу та дарсілу на відновлення пулу ВГ був вірогідно нижчим (табл. 3).

Установлено, що сполука 77 виявляє потужний антиоксидантний ефект, вищий за активність препаратів порівняння:

- пригнічує активність процесів ПОЛ, про що свідчить зменшення рівня ТБК-реактивних, ДК у середньому в 2 – 2,5 разу;
- відновлює функції антиоксидантної системи, що характеризується зростанням рівня ВГ (табл. 3).

Таким чином, на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту сполука 77 значно знижує активність процесів цитолізу та гіпертрофію печінки, нормалізує процеси жовчоутворення, виявляє виражений антиоксидантний ефект: знижує інтенсифікацію процесів ПОЛ, нормалізує активність системи АОС.

Висновки

Встановлено виражений гепатопротекторний ефект оригінального спіроциклического похідного оксидолу. У механізмі захисної дії нової сполуки на гепатоцити є значна антицитолітична активність та антиоксидантна дія, що значно перевищують дію препаратів порівняння мексидолу та дарсілу.

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод. рекомендації за редакцією О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2-х томах / В. С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2002. – 463 с.
3. Комpendиум 2009 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К.: МОРИОН, 2009. – С. 11575–1576.
4. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
5. Фаращук Н. Ф. Мексидол и гепатит: результаты в эксперименте и перспективы в клинике // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Приложение № 1. – С. 2–7.
6. Цубанова Н. А. Скринінгові дослідження антигіпоксичної дії спіроциклических 2-оксидольних похідних 2-аміно-3-ціано-4н-пірану / Цубанова Н. А. // Клінічна фармація. – 2009. – Т. 13, № 2. – С. 62–64.
7. Цубанова Н. А. Дослідження церебропротекторної дії та гострої токсичності нової сполуки, спіроциклического похідного оксидолу / Цубанова Н. А., Штриголь С. Ю. // Укр. біофармацевтичний журнал. – 2010. – № 1 (6). – С. 36–41.
8. Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency / Diego-Otero Y, Romero-Zerbo Y, el Bekay R, Decara J. [et al.] // Neuropsychopharmacology. – 2009. – № 34 (4). – P. 1011–26.
9. Patel VP. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration / Patel VP, Chu CT. // Int J Clin Exp Pathol. – 2011. – № 4 (3). – P. 215–29.

-
10. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia / Ramond A., Godin-Ribuot D., Ribuot C. [et al.] // *Fundam Clin Pharmacol.* – 2011, December. – V. 4. – P. 136–40.
11. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease/ Valko M., Leibfritz D., Moncol J. [et al.] // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2007. – № 39 (1). – P. 44–84.

Н. А. Цубанова

Изучение гепатопротекторного действия спироциклического производного оксиндола в условиях острого тетрахлорметанового гепатита

Изучено влияние спироциклического производного оксиндола и препаратов сравнения мексидола и дарсила на процессы желчеобразования, активность цитолиза и свободнорадикальное окисление в условиях острого гепатита. Установлено выраженное антиоксидантное, антицитолитическое действие спироциклического производного оксиндола в дозе 5 мг/кг. Установлено, что гепатопротекторная активность нового соединения превышает активность препаратов сравнения мексидола и дарсила.

Ключевые слова: спироциклическое производное оксиндола, острый гепатит, гепатопротекторное действие

Tsubanova N. A.

Study of hepatoprotective effect on spirocyclic oxindolic derivate in the conditions of acute tetrachloromethane hepatitis

It has been the studied influence of the spirocyclic oxindolic derivate and preparations of comparison mexidol and darsil on bicification processes, activity of cytolysis and free-radical oxidation in the conditions of acute hepatitis. It has been established expressed antioxidant, anticytolytic action of spirocyclic oxindolic derivate in dose 5 mg/kg. It is set that hepatoprotective effect of new substance exceeds activity of preparations of comparison such as mexidol and darsil.

Key words: spirocyclic oxindolic derivate, acute hepatitis, hepatoprotective effect

Надійшла: 27.02.2012 р.

Контактна особа: Цубанова Наталя Анатоліївна, канд. фарм. наук, доцент кафедри технології та безпеки ліків, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, пл. Повстання, 17, м. Харків, 61001. Тел.: (50) 538-14-45.
E-mail: tsubanova@rambler.ru