

ВПЛИВ РЕЧОВИНИ 5(4){2} (ПОХІДНОГО ПІРИДИНКАРБОНОВИХ КИСЛОТ) НА ПЕРЕБІГ ГОСТРОГО ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТИТУ У БІЛИХ ЩУРІВ

Л.В.Яковлева, А.О.Силаєв, Ю.Б.Лар'яновська, Л.В.Гладкова,
О.С.Ромелашвілі

Національний фармацевтичний університет

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

Проведений порівняльний аналіз фармакотерапевтичної ефективності речовини під шифром 5(4){2} та препарату таблеток "Амізон" дозволив виявити гальмуючий вплив на процеси ПОЛ, нормалізацію активності АОС, відновлення білкового та ліпідного обміну, що підтверджується позитивною динамікою показників та відповідає характеристиці амізону. Однак на тлі вираженої антиоксидантної дії гістоморфологічні дослідження показали, що циркуляторні розлади та виразність запальної клітинної реакції були на рівні контрольної патології, як і під дією препарату "Амізон", що, можливо, пов'язано з коротким терміном введення. Вплив речовини під шифром 5(4){2} на перебіг гострого тетрахлорметанового гепатиту у щурів виражається у пригніченні гіперліпопероксидації та відновленні антиоксидантного захисту; в усуненні цитолізу гепатоцитів; відновленні показників білкового та ліпідного обміну.

В останні роки ріст захворюваності населення пов'язують з несприятливою екологічною ситуацією, неправильним харчуванням, а також токсичними, лікарськими та алергічними ураженнями органів та систем. Згідно з сучасними уявленнями в основі різних за етіологією механізмів уражень внутрішніх органів лежить оксидативний стрес, який призводить до ушкодження генетичного апарату клітин, пошкодження біомембран, пригнічення ендогенної антиокиснювальної системи, порушення метаболізму клітин [7, 11, 12].

Все це обумовлює активізацію пошуку нових речовин, які б володіли мембраностабілізуючими та антиоксидантними властивостями.

Адекватною для комплексного вивчення протизапальної, антиоксидантної та мембраностабілізуючої активності є модель гострого тетрахлорметанового гепа-

титу. Відомо, що при токсичному ураженні печінки однією з основних патогенетичних ланок є активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що призводить до утворення реактивних форм кисню, які пошкоджують біологічні мембрани, ядерний хроматин гепатоцитів, змінюють процеси поділу клітин, викликають пошкодження мітохондрій, порушують обмін речовин, викликають дистрофічні зміни паренхіми органу [6, 8, 9].

Об'єктом даного дослідження послужила речовина з класу похідних піридинкарбонових кислот під шифром 5(4){2}, синтезована в лабораторії органічного синтезу НФаУ. За хімічною структурою досліджувана речовина 5(4){2} є аналогом препарату "Амізон". У попередніх порівняльних дослідженнях показано, що речовина 5(4){2} при застосуванні в дозі 0,8 мг/кг володіє вираженою анальгезуючою,

протизапальною, жарознижуючою та імунотропною активністю та перевищує за ефективністю таблетки "Амізон" у дозі 10 мг/кг [5].

Метою даної роботи стало порівняльне дослідження фармакотерапевтичної ефективності речовини 5(4){2} та препарату таблеток "Амізон" на перебіг гострого тетрахлорметанового гепатиту у білих щурів.

Матеріали та методи

Гострий тетрахлорметановий гепатит у щурів масою 180-200 г (1-а серія досліду) викликали шляхом одноразового внутрішньошлункового введення 50% олійного розчину тетрахлорметану (ТХМ) у дозі 0,7 мл/100 г маси тіла за методичними рекомендаціями протягом 4-х днів [2]. Суспензію речовини під шифром 5(4){2} у дозі 0,8 мг/кг та референтного препарату таблеток "Амізон" у дозі 10 мг/кг вводили внутрішньошлунково в лікувальному режимі протягом 7 діб, починаючи через добу після останнього введення гепатотоксину. Тварини були поді-

Таблиця 1

Вплив речовини під шифром 5(4){2} і таблеток “Амізон” на функціонально-біохімічні показники печінки щурів в умовах гострого токсичного гепатиту (n = 28)

Показники	Умови досліджу			
	негативний контроль	позитивний контроль (гепатит)	гепатит + речовина 5(4){2}	гепатит + амізон
МКП, % \bar{X} ($X_n \pm X_x$)	3,05 (2,86-3,28)	4,09 (3,39-5,00)*	3,66 (3,36-3,86)*/**	3,49 (3,20-3,96)*/**
Загальний холестерин, ммоль/л ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	1,63±0,09	2,37±0,08*	1,92±0,09**	1,89±0,13**
Загальний білок, г/л ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	52,01±1,26	68,39±1,38*	56,05±0,53**	54,69±1,16**
Загальні ліпіди, ммоль/л ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	1,84±0,17	2,98±0,26*	1,98±0,11**	2,06±0,11**
Лужна фосфатаза, мкмоль/с·л ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	1,1±0,07	1,52±0,03**	1,11±0,03**	1,08±0,03**
АлАТ, ммоль/год·л ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	0,3±0,04	0,79±0,04*	0,51±0,03*/**	0,61±0,07*/**
АсАТ, ммоль/год·л ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	0,43±0,02	0,53±0,03	0,57±0,06	0,54±0,06
ДК, мкмоль/г ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	10,65±0,54	30,06±1,43*	16,7±0,86*/**	25,23±0,77*/**
ТБК-активні речовини, ммоль/г ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	56,62±1,12	86,81±2,21*	58,76±2,35**	63,67±1,50**
ВГ, ум. од. ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	3,94±0,26	2,24±0,33	4,51±0,33	4,40±0,19

Примітки:

- 1) * — відхилення вірогідне щодо негативного контролю;
- 2) ** — відхилення вірогідне щодо позитивного контролю;
- 3) *** — відхилення вірогідне щодо групи тварин, які отримували речовину 5(4){2}.

лені на дослідні та контрольні групи по 7 особин у кожній. Виведення тварин з експерименту проводили на 11-й день від початку експерименту шляхом декапітації під легким наркозом.

При ураженні печінки у залежності від природи токсичного агента спостерігається підвищення процесів ПОЛ. На цьому ґрунтується доцільність дослідження показників, що характеризують стан ПОЛ і фізіологічної антиоксидантної системи (ФАС) у печінці. Зокрема у гомогенаті печінки вивчали вміст продуктів ПОЛ — ТБК-реактивів, ДК і рівень одного з компонентів ФАС відновленого глутатіону (ВГ). У сироватці крові визначали активність АлАТ і АсАТ (методом Райтмана-Френкеля за допомогою тест-набору “Lachema”, виробництва Чехії) як маркерних ферментів цитолізу, що супроводжують запальні процеси і характеризують стан мембран гепатоцитів. Також визначали інтегральні показники, які характеризують стан обміну речовин в організмі: рівень загального білка (біуретовим методом, тест-набір “Lachema” виробництва Чехії), рі-

вень лужної фосфатази (ЛФ), концентрацію холестерину та загальних ліпідів у сироватці крові. На тлі патології спостерігали також розвиток запального процесу в печінці, який супроводжується інфільтрацією органу і як наслідок збільшення масового коефіцієнта печінки (МКП).

Також 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 [3]. На зрізах печінки, пофарбованих гематоксиліном та еозином, проводили напівкількісну оцінку потужності патологічного процесу та впливу на його перебіг речовини під шифром 5(4){2} та таблеток “Амізон” за такими ознаками: виразність жирової та білкової дистрофії, некротичні прояви, виразність зон порушення рисунка тканини, циркуляторні розлади, клітинна запальна реакція за бальною системою. Згідно зі схемою оцінки: 0 балів —

ознака відсутня, 1 бал — ознака слабка, 2 бали — ознака помірна, 3 бали — ознака виразна, 4 бали — ознака дуже виразна. Для отримання статистичних висновків застосовували дисперсійний аналіз (критерій Краскала-Уолеса), при порівнянні вибірок — критерій Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні при рівні імовірності $p < 0,05$ [4]. Для статистичної обробки використовували програму Statistica 6.0. Мікроскопічне вивчення мікропрепаратів проводили під мікроскопом Micros 400. Фотографування зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 4GH за допомогою програми Nikon View 5.

Результати та їх обговорення

Як видно з табл. 1, гостре отруєння ТХМ викликало у тварин групи контрольної патології значні зміни біохімічних показників, характерні для даної патології. На фоні 100% виживання тварин токсична дія вказаного ксенобіотика проявилась активацією процесів ПОЛ, а саме —

Таблиця 2

Корекція речовиною під шифром 5(4){2} та амізном патологічного процесу у паренхімі печінки щурів з тетрахлорметановим ураженням (напівкількісна оцінка, бали) (n = 28)

Умови експерименту	Ознаки, ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)					
	виразність жирової дистрофії	виразність білкової дистрофії	некротичні зміни гепатоцитів	поширеність зон деструкцій	судинні розлади	клітинна реакція
Негативний контроль	0	0	0	0	0	0
Позитивний контроль (гепатит)	3,14 (2*4)	2,42 (2*3)	2,14 (2+3)	2,71 (2+4)	1,28 (1+2)	0,85 (0*1)
Гепатит + речовина 5(4){2}	2,33 (К3)	1,66 (К3)	1,50** (1+2)	1,66** (0*2)	1,16 (1+2)	0,83 (0+1)
Гепатит + амізон	2,28 (0-4)	1,42** (0*3)	1,43** (0+2)	1,57** (0*2)	1,14 (1+2)	0,71 (0+1)

Примітка. ** — достовірно по відношенню до позитивного контролю.

достовірним накопиченням ТБК-активних речовин на 53% та ДК на 200% у порівнянні з негативним контролем у тканині печінки і розвитком цитолізу гепатоцитів: вірогідним підвищенням ферментів у сироватці крові — АлАТ на 150% та АсАТ на 100%. Виразність патологічного процесу в печінці підтвердилась і включенням захисних механізмів АОС організму експериментальних тварин, які перешкоджають ініціації вільнорадикального ПОЛ. На це вказувало достовірне виснаження системи глутатіону на 44% у тварин контрольної патології в порівнянні з негативним контролем.

Ураження печінки ТХМ супроводжувалось значним підвищенням МКП на 32%, що є результатом зростаючого з розвитком патології набряку печінкової тканини і вказує на порушення гемодинаміки. Наслідком розвитку деструктивних змін у гепатоцитах під дією вільнорадикальних метаболітів ТХМ стало порушення функціонального стану органу. Підтвердженням запального процесу в печінці було також достовірне зростання на 40% активності ЛФ у сироватці крові тварин групи контрольної патології. Відомо, що ЛФ знаходиться переважно в каналікулярних і синусоїдальних мембранах гепатоцитів. При непроникності жовчних протоків на будь-якому рівні ЛФ синтезується в мембранах печінкових клітин і переходить у кров. Тому збільшення її активності в сироватці

крові розглядається як ознака холестатичного синдрому, який сприяє прогресуванню гепатиту і погіршує його перебіг. Гострі некротичні зміни гепатоцитів можуть не супроводжуватись збільшенням активності ЛФ до тих пір, поки в патологічний процес не включаються жовчні каналці. На початку розвитку внутрішньопечінкового стазу підвищення активності ЛФ може бути наслідком посилення синтезу білка в гепатоцитах. Підвищення активності ЛФ у сироватці крові пов'язано з порушенням цілісності клітин жовчних каналців [1]. Метаболічні порушення в органі відбилися у вірогідному підвищенні рівня загального білка на 31%, що характерно для розвитку гострого запального процесу, та вмісту загальних ліпідів на 62%, а холестерину на 45% у сироватці крові. Всі наведені зміни функціонально-біохімічних показників є свідченням формування у тварин гострого гепатиту [8, 10].

Проведений гістологічний аналіз кількісних та якісних характеристик патологічного процесу, що розвинувся у печінці щурів після внутрішньошлункового введення ТХМ, показав наступне (табл. 2): ТХМ викликав у печінці щурів гостре токсичне ураження, яке характеризувалося виразними альтеративними зсувами (некрозом, жировою та білковою дистрофією на тлі помірних циркуляторних розладів та запальної реакції), які порушували нормальну гістоар-

хітектоніку печінкової паренхіми. Компенсаторні регенераторні процеси в тканині виражені мляво — популяція двоядерних клітин явно знижена, поліморфізм клітин та ядер доволі помірний.

Одержані результати відповідають дослідженням ряду авторів [9, 10]. Некрозогенна дія ТХМ обумовлена швидше за все ураженням ендоплазматичного ретикулу, лізосом та інших мембранних структур клітин внаслідок активації перекиснення ліпідів, індукованих утворенням вільнорадикальних метаболітів гепатотоксину [11, 12].

Речовина 5(4){2} в дозі 0,8 мг/кг протягом 7 діб в умовах розвинутого гострого гепатиту сприяла зниженню гіперліпопероксидації. Вірогідне на 50% зниження рівня ДК, відновлення рівня ТБК-активних речовин та відновлення запасів ВГ у гомогенаті печінки до рівня негативного контролю свідчать про спроможність речовини 5(4){2} пригнічувати процеси ПОЛ за рахунок підвищення компенсаторних можливостей АОС. Аналізуючи хімічну структуру молекули речовини під шифром 5(4){2}, можна дійти висновку, що антиоксидантні властивості цієї сполуки пов'язані з наявністю у її складі піридинового та фенольного кілець, в яких є ненасичені зв'язки. Таким чином, речовина 5(4){2} виступає як перехоплювач активних форм кисню, перешкоджаючи їхньому пошкодуючому впливу на ліпиди мембран, а

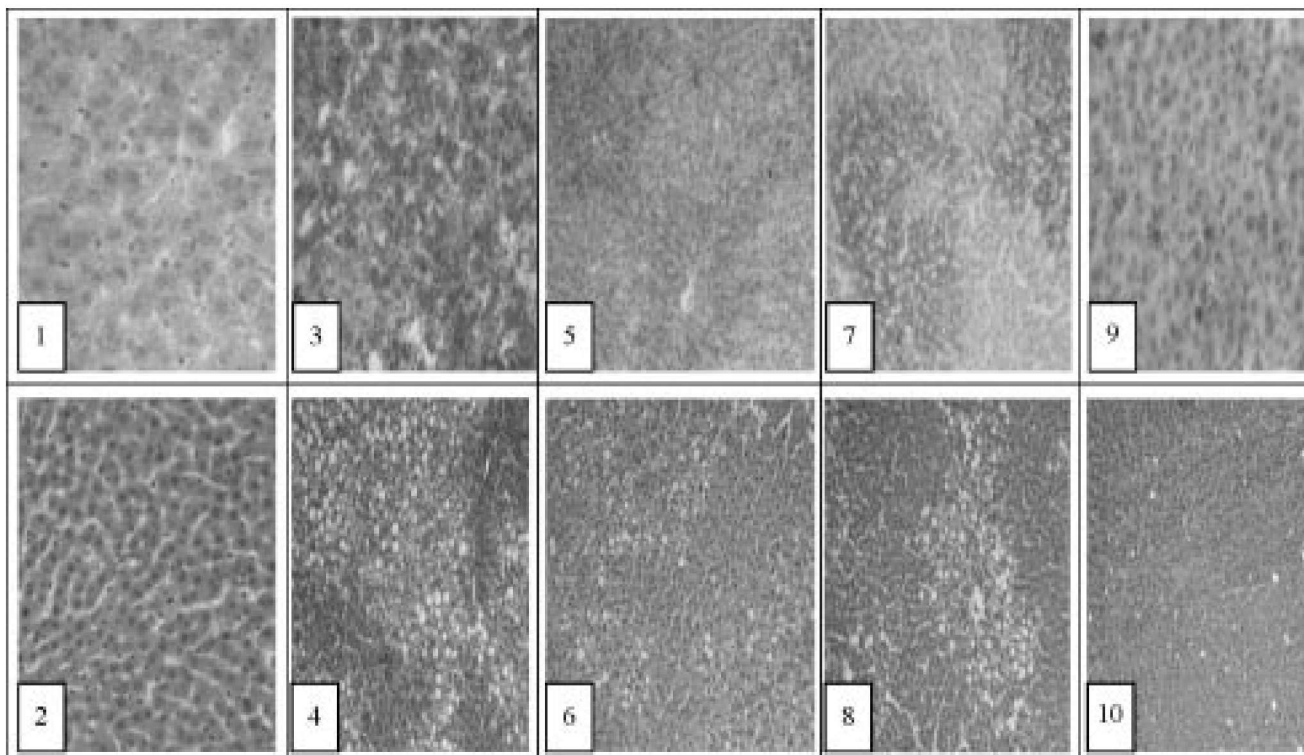


Рис. Печінка щура: 1-2 — інтактного (негативний контроль); 3-4 — якому вводили ТХМ; 5-6 — як ому вводили речовину під шифром 5(4){2} на тлі ТХМ; 7-10 — якому вводили амізон на тлі ТХМ. 1, 3, 5, 7, 9 — заморожений зріз, фарбування суданом IV. 2, 4, 6, 8, 10 — фарбування гематоксином та еозином. x200.

також обриваючи ланцюги вільнорадикальних реакцій.

Під дією таблеток “Амізон” у дозі 10 мг/кг відзначено дещо менше виражений вплив на процеси ПОЛ у печінці. Показник ДК зменшувався лише на 20%, що, ймовірно, обумовлено меншою спроможністю цього препарату обривати вільнорадикальні реакції.

Результати проведених досліджень свідчать, що на тлі фармакотерапії гострого токсичного гепатиту речовиною під шифром 5(4){2} у білих щурів збільшуються функціональні можливості печінки. Дещо зменшується ступінь запальної реакції (табл. 1) у пошкодженому органі, про що свідчить вірогідне зменшення МКП на 20% відносно позитивного контролю.

Речовина під шифром 5(4){2} запобігала розвитку цитолізу гепатоцитів на одному рівні з амізонам: вірогідно знижувала активність АлАТ та АсАТ у сироватці крові на 32% та маркерного ферменту холестазиу ЛФ на 27%. Вважається, що холестатичні ура-

ження печінки важко піддаються лікуванню і спектр антихолестатичних засобів обмежений [1]. Тому навіть помірне зменшення активності ферментів-маркерів холестазиу можна розцінювати як прояв позитивного впливу речовини під шифром 5(4){2}.

Речовина під шифром 5(4){2} у дозі 0,8 мг/кг на одному рівні з таблетками “Амізон” виявила вплив і на ліпідний обмін. При застосуванні речовини під шифром 5(4){2} у тварин у сироватці крові рівень загального холестерину та загальних ліпідів знижувався на 34 та 30% відносно показників позитивного контролю. Продукти ліпопероксидації через свою високу прооксидантну активність посилюють розпад білків, викликають жирову дистрофію паренхіматозних органів, особливо печінки, яка найбільш чутлива до дії токсичних продуктів ПОЛ, та зменшують синтез білків. Тому відновлення вмісту загального білка свідчить про нормалізацію стану АОС.

Гістологічні дослідження підтвердили, що лікування речови-

ною під шифром 5(4){2} виявило нормалізуючий вплив на паренхіму печінки тварин (табл. 2).

Некротичні зміни гепатоцитів зменшені на 30%, характерні зони ураження часточок звужено на 38,74%. Зменшена виразність жирової та білкової дистрофії (на 25,79% та 21,7% відповідно). Циркуляторні розлади та виразність запальної клітинної реакції були на рівні контрольної патології. Помірно активізувалися процеси фізіологічної регенерації (простежується виразний поліморфізм ядер, збільшення пулу двоядерних клітин (рис.).

Препарат порівняння амізон також достатньо виразно сприяв усуненню та поліпшенню патологічних змін і фізіологічній регенерації клітин. Ефект позитивного впливу амізону не поступався речовині під шифром 5(4){2}. Так, виразність некрозу гепатоцитів зменшена на 33,17%, жирової та білкової дистрофії — на 27,38% та 33%. Зони деструкції звужувалися на 42%.

Результати гістологічних досліджень підтвердили фармакотера-

пептичну ефективність речовини під шифром 5(4){2} у дозі 0,8 мг/кг при застосуванні в лікувальному режимі при розвиненому гострому тетрахлорметановому гепатиті у білих щурів. Речовина під шифром 5(4){2} на моделі гострого ураження печінки, викликаного у щурів ТХМ, виявляє антинекротичну, антидистрофічну дію, прискорює процеси фізіологічної регенерації гепатоцитів. За потужністю впливу речовина під шифром 5(4){2} практично не поступається препарату порівняння амізону.

Дані проведеного дослідження свідчать, що на тлі розвиненої патології прискорювались вільнорадикальні процеси в печінці. Причому інтенсивність вільнорадикальних процесів у печінці відповідає ступеню функціональних порушень та вираженості деструктивних процесів, що відповідає

даним літератури [11]. В цілому проведений порівняльний аналіз фармакотерапевтичної ефективності речовини під шифром 5(4){2} та препарату таблеток "Амізон" дозволили виявити пригнічуючий вплив на процеси ПОЛ, часткове зниження цитолізу, нормалізацію активності АОС, відновлення білкового та ліпідного обмінів, що підтверджується позитивною динамікою показників і відповідає дії амізону. Необхідно відзначити важливість впливу речовини під шифром 5(4){2} та амізону на рівень ВГ, тому що при запальних захворюваннях печінки інтенсифікація ПОЛ значною мірою визначається ступенем порушень антиоксидантного захисту, який не в змозі цілком запобігти ушкоджуючій дії продуктів ПОЛ на мембранні структури клітин. Біохімічні показники підтверджуються гістологічними досліджен-

нями, які вказують на поліпшення морфологічного стану печінки під впливом речовини під шифром 5(4){2}. Однак на тлі вираженої антиоксидантної дії за даними гістоморфологічних досліджень доведено, що циркуляторні розлади та виразність запальної клітинної реакції були на рівні контрольної патології, як і під дією препарату "Амізон", що, можливо, пов'язано з коротким терміном введення.

ВИСНОВКИ

Вплив речовини 5(4){2} (похідного піридинкарбонових кислот) на перебіг гострого тетрахлорметанового гепатиту у білих щурів виражається у:

- пригніченні гіперліпопероксидації та відновленні антиоксидантного захисту;
- усуненні цитолізу гепатоцитів;
- відновленні показників білкового та ліпідного обмінів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабак О.Я. // Лікування та діагностика. — 2003. — №2. — С. 27-34.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. О.В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.
3. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. — М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. — 424 с.
4. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Ремедиум, 2000. — С. 349-354.
5. Силаев А.О., Шаповал О.М. Вивчення жарознижжучої дії ряду нових похідних амідопіридинкарбонових кислот // Матер. VIII Всеукр. наук.-практ. конф. "Клінічна фармація в Україні". — Х., 2008. — С. 107.
6. Barbare J.C., Imbert A., Benkirane A. // Presse Med. — 2001. — Vol. 30 (14). — P. 673-676.
7. Britton R.S., Bacon B.R. // Hepato-Gastroenterol. — 1994. — Vol. 41, №4. — P. 343-348.
8. Crouch M.A., Brophy D.F. // Ann. Pharmacother. — 1998. — Vol. 32 (3). — P. 386.
9. Desmet V.J. // Acta Gastroenterol. Belgica. — 1997. — Vol. 60, №4. — P. 259-267.
10. Desmet V.J. Mechanism of inflammation. Liver Cirrosis and its Development. — Dordrecht/Boston/London: Kluwer academic publishers, 2000. — P. 13-19.
11. Fecher J., Lengyel G., Blazovic S. // Scand. J. of Gastroenterol. — 1998. — Vol. 33 (228). — P. 38-46.
12. Hoofnagle J.H. // Digestion. — 1998. — Vol. 59, №5. — P. 563-578.

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

Надійшла до редакції 15.04.2011 р.