

Рекомендована д.ф.н., професором Л.В.Яковлевою

УДК 615.012/014:616.36-053.2/6:577.125.53] 001.89

ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ МЕТАЛО-ЛІПОСОМАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ

С.М.Дроговоз, О.В.Стефанов, В.В.Слишков,
Г.С.Григор'єва

Українська фармацевтична академія

Інститут фармакології і токсикології АМН України

На різноманітних моделях ураження печінки у щурів вивчено фармакологічна дія нового гепатозахисного засобу – метало-ліпосомальної композиції (МЛК). Встановлено, що препарат проявляє протиокислювальну та мембраностабілізуючу дії. Доведена перспективність подальшого дослідження препарату з метою створення ефективного гепатопротектора.

Необхідність пошуку нових високоактивних і малотоксичних гепатопротекторних засобів та створення на їх основі лікарських препаратів пов'язана в першу чергу із збільшенням хімізації народного господарства та побуту, а також з використанням в терапевтичній практиці лікарських засобів, які мають гепатотоксичні властивості, та збільшенням частоти ураження органів гепатобіліарної системи [6]. З іншого боку, асортимент гепатопротекторів, які використовуються зараз в лікарській практиці, складається в основному з препаратів імпортного виробництва (окрім сілібору). Крім того, ефективність засобів цієї групи при лікуванні захворювань печінки не досить висока [7, 8].

Аналіз даних літератури показує, що найбільшу гепатозахисну активність має препарат есенціале, який являє собою комплекс есенціальних фосфоліпідів (холінфосфатидів) і вітамінів групи В [13]. Беручи до уваги важливість фізіологічної функції фосфоліпідів як основних структурних елементів клітинних мембран і мембран органел клітин, а також те, що комплексні сполуки металів, зокрема алюмінію, мають мембрано-протекторні та антиоксидантні властивості [12], була зроблена спроба створення на їх основі вітчизняного гепатопротектора, який є ліпосомальною композицією мембранних фосфоліпідів з комплексом металу.

Мета запропонованого дослідження полягає в з'ясуванні гепатозахисних властивостей цього препарату.

Методи дослідження.

В ролі експериментальних моделей ураження печінки були використані часткова гепатектомія, гостра ішемія печінки та її ураження при комбінованому введенні чотирьоххлористого вуглецю та етанолу. В ролі препаратів порівняння в дослідах використовували складові компоненти метало-ліпосомальної композиції (МЛК): ліпін — природний фосфатидилхолін (ліпосомальна композиція мембранних фосфоліпідів) і антраль — координаційна сполука алюмінію з N-(2,3-диметил)-фенілантраніловою кислотою, а також силібор (за гепатопротекторним ефектом) і вітамін Е (за антиоксидантною активністю).

Враховуючи те, що ефективна за гепатозахиною дією доза (ED_{50}) антраля складає 8 мг/кг [9], препарат вивчали в ізоефективній по відношенню до ED_{50} антраля дозі, а саме 88 мг/кг, а ліпін — в дозі, яка відповідає кількості фосфоліпідів в метало-ліпосомальній композиції, а саме 80 мг/кг. Силібор використовували в ED_{30} , яка дорівнює 25 мг/кг [1], вітамін Е — в ED_{50} , яка становить 50 мг/кг [14]. Експериментальну резекцію 2/3 печінки виконували за А.Фішером [3]. Вивчення функціональних та біохімічних показників стану цього органу проводили через чотири доби.

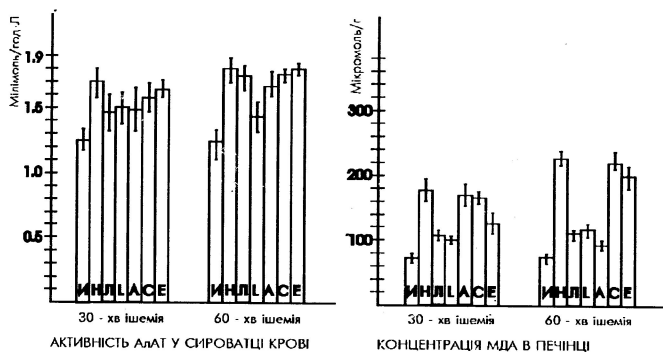
Загальновідомо, що одним з патогенетичних факторів в більшості захворювань печінки є

Таблиця 1

Вплив МЛК і препаратів порівняння на показники функціонального стану печінки при частковій гепатектомії

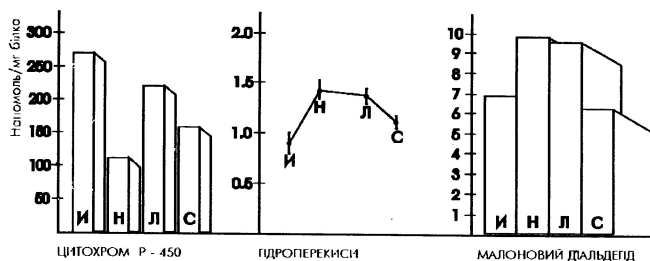
Умови досліджу	Сума жовчі за 3 години досліджу, мг/100	Концентрація в жовчі, мг%		Холато-холестериновий коефіцієнт	Бромсульфалєінова проба		Вижи- ваєість %	Концентрація в сироватці крові						Концен- трація МДА в печінці, мк• моль/г	
		Кис- лоти жов- чі	Хо- ле- сте- рин		Час поя- ви, хв	Час виді- лен- ня, хв		АлАТ, ммоль/ год•л	АсАТ, ммоль/ год•л	Лужна фосфа- таза, Од/л	Загаль- ний білок, г%	За- гальні ліпіди, г/л	Глюко- за,мг%		
Тварини,яких лікували															
МЛК	944,4 ± 36,3	950,0 ± 108,7	20,2 ± 4,97	7,4 ± 1,40	32,6 ± 3,87	83,3	1,14 ± 0,11	0,84 ± 0,04	214,2 ± 60,0*	5,3 ± 0,23	5,26 ± 0,13	34,3 ± 11,99*	282,2 ± 27,01		
Ліпі- ном	1016, ± 74,1	828,4 ± 128,4	14,2 ± 2,63	7,1 ± 1,49	26,1 ± 3,94	87,5	1,58 ± 0,08	0,80 ± 0,02	262,7 ± 40,4*	5,3 ± 0,06	4,28 ± 0,09	36,7 ± 7,51	236,2 ± 0,23		
Антра- лем	1017,0 ± 105,7	1079,2 ± 129,1	39,1 ± 4,06	29,1 ± 5,08	9,0 ± 0,33	38,2 ± 3,43	85,7	1,50 ± 0,06	0,79 ± 0,03	457,5 ± 81,0	4,9 ± 0,17	4,58 ± 0,19	55,7 ± 3,35*	258,2 ± 24,20	
Силі- бором	996,0 ± 88,8	1218,2 ± 94,6	52,6 ± 4,18	25,9 ± 4,68	8,4 ± 1,00	32,2 ± 2,16	85,7	1,43 ± 0,08	0,70 ± 0,03	304,3 ± 52,1	5,1 ± 0,14	5,14 ± 0,16	30,6 ± 6,40	260,3 ± 20,02	
Віта- міном Е	990,0 ± 61,2	1402,6 ± 14,2 ^x	58,4 ± 6,32	24,0 ± 3,62	7,2 ± 1,14	33,4 ± 4,20 [*]	85,7	1,56 ± 0,10	0,76 ± 0,05	400,0 ± 64,1	5,2 ± 0,16	5,80 ± 0,14 [*]	38,8 ± 7,90	189,8 ± 14,20	
Твари- ни, як- их пе- ліку- вали	831,6 ± 98,6	1056,4 ± 34,6 ^{**}	46,8 ± 9,40	26,5 ± 6,63	10,4 ± 1,15	44,2 ± 3,46 ^{**}	83,3	1,67 ± 0,11 ^{**}	0,73 ± 0,04 ^{**}	459,0 ± 66,3 ^{**}	5,0 ± 0,29 ^{**}	4,69 ± 0,25 ^{**}	23,4 ± 3,82 ^{**}	296,8 ± 36,20 ^{**}	
Інтак- тні тва- рини	981,6 ± 42,1	1588,4 ± 220,4	63,8 ± 5,90	25,3 ± 3,89	6,8 ± 1,78	24,0 ± 5,51	100	0,85 ± 0,06	0,45 ± 0,03	37,6 ± 7,7	6,3 ± 0,25	6,33 ± 0,17	72,6 ± 4,09	70,1 ± 3,27	

* $P < 0,05$ в порівнянні з нелікованими тваринами; ** $P < 0,05$ в порівнянні з інтактними тваринами



АКТИВНІСТЬ АЛАТ В СИРОВАТЦІ КРОВІ
КОНЦЕНТРАЦІЯ МДА В ПЕЧІНЦІ

Рис. 1. Вплив МЛК та препаратів порівняння на біохімічні показники при гострій ішемії печінки (І — інтактні тварини; Н — тварини, яких не лікували; Л — тварини, яких лікували МЛК; А — тварини, яких лікували ліпіном; Е — тварини, яких лікували вітаміном Е)



ЦИТОХРОМ Р-450
ГІДРОПЕРЕКИСИ
МАЛОНОВИЙ ДІАЛЬДЕГІД

Рис. 2. Вплив МЛК на вміст цитохрому Р-450, гідроперекисів і малонового діальдегіду в мікросомах гепатоцитів щурів з комбінованим гепатитом (І — інтактні тварини; Н — тварини, яких не лікували; Л — тварини, яких лікували МЛК; С — тварини, яких лікували силібором)

гіпоксія [5]. Нами було проведено дослідження ефективності МЛК при гострій ішемії печінки. Під загальним наркозом тваринам робили перев'язку судинної ніжки лівої та середньої долей печінки на 30 та 60 хвилин. Після закінчення дослідження вивчали функціональні показники печінки тварин.

Ураження печінки викликали комбінованим введенням чотирьоххлористого вуглецю та етанолу за методом М.П.Скакуна і С.Ф.Ковальчука [11].

Обробку функціональних і біохімічних показників стану печінки проводили через сім діб. Оцінку жовчотворної функції печінки здійснювали за методом М.П.Скакуна [11]. Протягом останньої години дослідження визначали поглинально-видільну функцію печінки за допомогою бромсульфалеїнової проби [3]. В одержаній жовчі встановлювали концентрацію жовчних кислот та холестерину, а по їх співвідношенню — холато-холестериновий коефіцієнт [10]. З метою оцінки ступеня інтенсивності цитолізу гепатоцитів у сироватці крові визначали активність маркерних ферментів цитолізу: аланін- та аспартамінотрансферази [18] і лужної фосфатази [9]. Крім того, вивчали вміст у крові загального білка, загальних ліпідів і глюкози [9]; в мікросомах печінки — вміст цитохрому Р-450 [17], малонового діальдегіду [4], гідроперекисів [16] і спектр фосфоліпідів [2]. Зміни морфологічної структури ге-

патоцитів вивчали методом електронної мікроскопії.

Результати та їх обговорення.

В результаті проведеної роботи було встановлено, що МЛК проявляє гепатозахисну дію у всіх вивчених моделях патології печінки. Під дією препарату після резекції печінки (табл. 1) у тварин значно покращувалась одна з її основних функцій — жовчотворна (збільшувалась швидкість секреції жовчі) і пов'язана з нею поглинально-видільна функція (скорочувався час поглинання і виділення барвника на 83% і 57,4% відповідно). Крім того, спостерігалось значне зниження активності реакцій переокислення ліпідів в гепатоцитах і, як наслідок, обмеження цитолітичного синдрому.

Результати дослідів, направлених на визначення ефективності МЛК при гострій ішемії печінки (рис. 1), свідчать про те, що в залежності від різної тривалості припинення кровообігу в цьому органі препарат виявляє також і виражену антиокислювальну дію (на 68,5% та на 77,2% при 30-ти та 60-хвилинній ішемії відповідно).

Цей ефект супроводжується мембраностабілізуючою активністю, яка спостерігається лише при 30-хвилинній гіпоксії печінки.

При комбінованому токсичному ураженні печінки (табл. 2) застосування МЛК сприяло зниженню активності процесів перекисного окислення в печінці (на 40%) і обмеженню цитолізу гепатоцитів (активність АЛАТ і АсАТ знижувалась на 60%). Спостерігалась нормалізація жовчотворної та поглинально-видільної функцій

Таблиця 2

Вплив МЛК та препаратів порівняння на показники функціонального стану печінки при комбінованому гепатиті

Умови досліджу	Сума жовчі за 3 години досліджу, мг/год	Концентрація в жовчі, мг%		Холестерин	Бромсульфалейнова проба		Вивісність	Концентрація в сироватці крові					Концентрація МДА в печінці, мкмоль/л
		Кислот жовчі	Холестерин		Час появи, хв	Час виділення, хв		АлАТ, ммоль/л	АсАТ, ммоль/л	Лужна фосфатаза, Од/л	Загальний білок, %	Загальні ліпіди, г/л	
Тварини, яких лікували													
МЛК		1069,2 ± 99,4**	1018,4 ± 497,5	63,11 С 8,61	13,8 ± 2,95	6,4 ± 0,46	38,0 ± 6,22	75,0	1,74 ± 0,10	1,08 ± 0,07	1214,0 ± 196,7	7,76 ± 0,27	4,18 ± 0,10
Ліпіном	865,0 ± 78,5	1390,0 ± 403,2	87,3 ± 25,55	17,5 ± 3,01	7,2 ± 0,55	56,5 ± 7,08	75,0	1,57 ± 0,21	1,32 ± 0,10	1488,3 ± 130,5	8,85 ± 0,30	5,12 ± 0,11	246,0 ± 17,52
Антра- лем	939,6 ± 36,3**	1512,4 ± 31,0**	87,8 ± 10,78	17,9 ± 1,74	6,8 ± 0,52	34,6 ± 2,66	62,5	1,79 ± 0,20	1,27 ± 0,12	1438,0 ± 234,3	8,82 ± 0,56	4,91 ± 0,60	254,0 ± 27,4
Силі- бором	1014,2 ± 64,3**	1384,2 ± 58,4**	61,91 ± 8,44	22,4 ± 3,17**	8,2 ± 0,34	39,2 ± 4,28	75,0	2,32 ± 0,12	1,42 ± 0,11	1326,0 ± 116,7	8,86 ± 0,28	4,52 ± 0,10	240,9 ± 18,41
Віта- міном Е	1088,0 ± 52,9**	1406,8 ± 118,2**	51,4 ± 11,93	27,4 ± 9,91	8,6 ± 0,26	42,1 ± 6,14	62,5	2,45 ± 0,11	1,52 ± 0,10	1492,0 ± 124,4	8,14 ± 0,21	5,16 ± 0,12	199,1 ± 14,26
Твари- ни, яких не ліку- вали	686,4 ± 21,5*	699,2 ± 49,6	66,7 ± 6,43	10,6 ± 0,44*	13,6 ± 0,46	61,0 ± 1,52	62,5	2,73 ± 0,24	1,67 ± 0,13	1512,0 ± 167,8	7,52 ± 0,17	4,49 ± 0,23	297,6 ± 15,56
Інтакт- ні тва- рини	988,8 ± 43,8	1398,4 ± 345,5	51,82 ± 2,31	27,0 ± 6,21	5,8 ± 0,18	31,2 ± 1,21	100	1,15 ± 0,09	0,72 ± 0,04	987,0 ± 71,8	10,18 ± 0,91	5,88 ± 0,11	92,4 ± 4,60

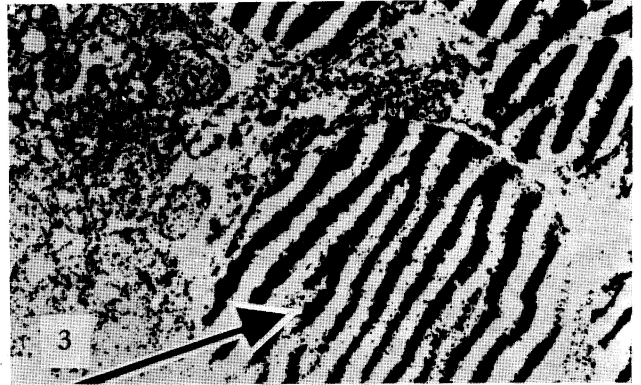
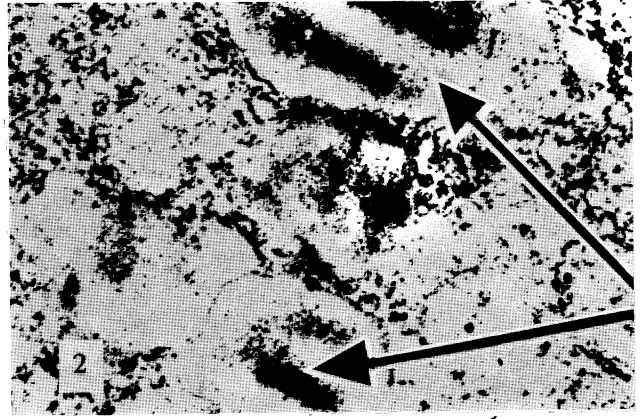
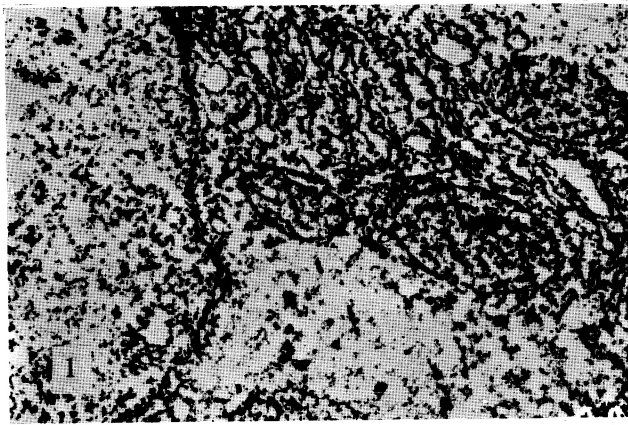
* $P < 0,05$ в порівнянні з інтактними тваринами; ** $P < 0,05$ в порівнянні з тваринами, яких не лікували

печінки. При гострій ішемії печінки МЛК перевищує по ефективності силібор і вітамін Е, але поступається по антиокислювальній дії антралю, а по мембранопротекторному ефекту — ліпіну при 60-хвилинному припиненні кровообігу.

При використанні МЛК в умовах модельного ураження печінки чотирьоххлористим вуглецем в сполученні з етанолом в мікросомах печінки тварин спостерігається збільшення вмісту цитохрому Р-450 (рис. 2) в порівнянні з тваринами, яких не лікували. Це свідчить про зменшення під дією препарату виснаження природної антиоксидантної

системи печінки, яке виникало внаслідок дії гепатотоксинів, що вводились. На відміну від тварин, яких лікували силібором, МЛК нормалізує даний показник більш ніж вдвічі активніше в порівнянні з референс-препаратом. Під дією МЛК та силібору помітна тенденція до нормалізації основних класів фосфоліпідів: фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну і фосфатидилсерину.

Механізм реалізації гепатозахисного ефекту МЛК, мабуть, пов'язаний з його втручанням в процес перекисного окислення ліпідів. Антиоксидантна дія МЛК забезпечується наявністю в його складі антралю, який, приймаючи участь в про-



цесі перекисного окислення ліпідів на стадії утворення вільних радикалів, гальмує появу дегенеративних наслідків ліпопероксидації мембран гепатоцитів. З іншого боку, антирадикальний ефект антралю можна пояснити втручанням іону алюмінію в процес мітросомального окислення шляхом конкурентних взаємовідносин з іонами заліза, що входять до складу сукцинат-дегідрогеназної системи [12]. Електронно-мікроскопічну картину печінки тварин, які одержували тетрахлорметан та етанол і лікувались МЛК, порівнювали із станом печінки інтактних щурів, а також тварин, яких лікували препаратом порівняння — силібором. В результаті лікування МЛК щурів, у яких моделювали гепатит, була відмічена значна активація репаративних внутрішньоклітинних процесів, що полягала в нормалізації структури мітохондрій, розвитку ендоплазматичної сітки, накопиченні в гепатоцитах глікогену, зменшенні кількості ліпідних включень і жовчовмісних лізосом (рис. 3). Все це свідчить про те, що під дією МЛК синтетичні внутрішньоклітинні процеси починають превалювати над катаболічними. В групі тварин, що з лікувально-профілактичною метою одержували силібор після моделювання гепатиту, в найменшій мірі була відмічена стабілізація ультраструктурної архітектоники печінки. В цій групі тварин (як і в групі нелікованих щурів) спостерігаються деструктивні та дистрофічні порушення.

Переважа МЛК над антралем, на нашу думку, може пояснюватись тим, що ліпосомальна композиція мембранних фосfolіпідів, яка входить до складу МЛК, забезпечує, можливо, більш швидке проникання антралю в уражені клітини печінки, що сприяє підвищенню його біодоступності та ефективності. Крім того, покращення під дією

Рис. 3. Вплив МЛК (1) і силібору (2) на ультраструктуру гепатоцитів щурів з комбінованим гепатитом в порівнянні з групою тварин, яких не лікували (3). Ліпідні включення позначені стрілками.

МЛК таких функцій печінки, як білок-, холестерин- та глікогенсинтезуюча, певно, також сприяє реалізації гепатопротекторної дії препарату.

ВИСНОВКИ

1. МЛК є перспективним фармакологічним препаратом, який селективно коригує порушені функції печінки.

2. Механізм гепатопротекторної дії МЛК, певно, реалізується через наявність протиокислювальних та мембраностабілізуючих ефектів, які сприяють поліпшенню основних параметрів обміну речовин в гепатоцитах, а також через вміст ліпосомальної композиції мембранних фосfolіпідів, які підвищують біодоступність препарату.

3. На основі експериментального вивчення МЛК в умовах різних моделей патології печінки доведена перспективність подальшого дослідження препарату з метою створення пріоритетного в порівнянні з силібором гепатопротектора.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антошин Ю.В. Применение витаминов Е и В₆ для профилактики и лечения экспериментальной дистрофии печени, вызванной гидразингидратом // Гигиена труда и профессиональных заболеваний. — 1980. — № 9. — С. 43-44.
2. Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж.Финдлея и У.Эванса. — М., 1990. — С. 157-165.

3. Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н. Практическая гепатология. — Рига: Звайгзне, 1984. — 406 с.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биомембранах. — М., Наука. — 1972. — 252 с.
5. Воронов Г.Г., Лукиенко П.И., Бушма М.И. Изменение активности ферментов гидроксилирующей системы эндоплазматического ретикула печени крыс при ишемии // Фармакология и токсикология. — 1982. — Т. 45, N 1. — С. 54-58.
6. Галенко З.Н. Распространенность социально наиболее значимых болезней органов пищеварения среди населения Украины и состояние ее специализированной гастроэнтерологической службы // Гастроэнтерология. — 1992. — Вып. 24. — С. 3-6.
7. Гневашева Т.И., Штанько С.И. Наблюдения по использованию легалона, эссенциале и лив-52 в комплексной терапии вирусных гепатитов // 2-й Всероссийский съезд инфекционистов. — Кемерово, 1983. — С. 169-171.
8. Кипишидзе Н.П., Самадашвили А.Г. К вопросу лечения хронических заболеваний печени препаратом эссенциале // Актуальные вопросы гастроэнтерологии. — Тбилиси, 1981. — С. 64-66.
9. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. — Минск: Беларусь. — 1982. — 266 с.
10. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи // В.П.Мирошниченко, Л.Л.Громашевская, М.Г.Касаткина, Г.А.Казачек // Лабораторное дело. — 1978. — N 3. — С. 149-153.
11. Скакун Н.П., Ковальчук С.Ф. Эффективность антиоксидантов при комбинированном поражении печени четыреххлористым углеродом и этанолом // Фармакология и токсикология. — 1987. — Т. 50, N 3. — С. 97-100.
12. Сахарова Т.С. Поиск и фармакологическое изучение гепатозащитных средств в ряду металлокомплексов производных фенилантраниловых кислот: Автореф. дис. ... канд.фарм.наук. — Харьков, 1989. — 21 с.
13. Сравнительная характеристика гепатозащитных препаратов при хроническом активном гепатите и циррозах печени в активной фазе // Л.А.Порожняк, В.Н.Хворостинка, С.М.Дрогозов и др. — Киев, 1986. — Вып. I. — 2 с.
14. Шапоренко А.И. Влияние силибана на холатобразовательную функцию печени и течение хронического гепатита и цирроза печени: Автореф. дис. ... канд.мед.наук. — Харьков, 1983. — 20 с.
15. Фишер А. Физиология и экспериментальная патология печени. — Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1961. — 215 с.
16. Ohkava H., Ohshi N., Jodi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal.Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351-358.
17. Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes.II.Solubilisation, purification and properties // J.Biol.Chem. — 1964. — Vol. 239, N 7. — P. 2379-2385.
18. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutaminic oxalacetic and glutaminic pyruvis transaminases // Am.J.Clin.Pathology. — 1957. — Vol. 28,1. — P. 56-59.

УДК 615.012/014:616.36-053.2/6:577.122.53] 001.89

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛО-ЛИПОСОМАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ

С.М.Дрогозов, А.В.Стефанов, В.В.Слышков, А.С.Григорьева
На разных моделях патологии печени у крыс изучено фармакологическое действие нового гепатозащитного препарата — металло-липосомальной композиции (МЛК). Установлено, что препарат обладает противоокислительным и мембраностабилизирующим действием. Доказана перспективность его дальнейшего изучения с целью создания эффективного гепатопротектора.

UDC 615.012/014:616.36-053.2/6:577.122.53] 001.89

PRE-CLINICAL RESEARCH OF METAL-LIPOSOMAL COMPOSITION ACTION

S.M.Drogovoz, A.V.Stefanov, V.V.Slyshkov, A.S.Grigoryeva
On the basis of study different models of liver pathology by rats it was analysed pharmacological, antioxidant and membranestabilizing properties of new substance - metal-liposomal composition. Prospect and expedience of future research of this substance with the aim of creation effective hepatoprotector have been shown.