

УДК 612.81:615.099.08

Г. М. ШАЯХМЕТОВА², О. В. КАРПОВА¹, А. К. ВОРОНИНА², М. Я. ГОЛОВЕНКО¹¹Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України²ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

СТАН БІОХІМІЧНИХ СИСТЕМ КРОВІ БІЛИХ ЩУРІВ В УМОВАХ АЛКОГОЛЬНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ ТА ПРОФІЛАКТИЧНОЇ ДІЇ МЕТАДОКСИНУ

Відтворено модель алкогольного гепатиту шляхом внутрішньошлункового введення 40 % розчину етанолу в дозі 7 мл/кг маси тіла щурів-самців лінії Вістар протягом 7 днів. В якості біохімічних маркерів алкогольного гепатиту використані показники цитолітичного синдрому (активність аланінамінотрансферази, аспаратамінотрансферази, каталази), холестатичного синдрому (активність лужної фосфатази, гамма-глутамілтранспептидази) та ліпідного обміну (вміст холестерину, тригліцеридів). Показано, що метадоксин (іонна сіль піридоксину та піроглутамінової кислоти) при профілактичному введенні внутрішньошлунково в дозі 90 мг/кг за 30 хвилин до введення алкоголю нормалізував активність аспаратамінотрансферази та каталази; гамма-глутамілтранспептидази; вміст тригліцеридів. Відсутність позитивного впливу метадоксину на інші досліджувані біохімічні показники крові свідчить про різні механізми виникнення алкогольного гепатиту та його перебігу. Передбачається, що гепатозахисна дія препарату опосередкована антиоксидантним механізмом.

Ключові слова: метадоксин; алкогольний гепатит; гепатопротектор

ВСТУП

Останнім часом у загальній структурі захворювань значну частку займають патології гепатобілярної системи. Однією з найбільш поширених причин даних захворювань є вплив гепатотоксичних агентів [8, 11]. До них відноситься багато лікарських препаратів, алкоголь, речовини, що забруднюють навколишнє середовище. Актуальність удосконалення традиційних та розробка нових методів лікування гепатозів зумовлена передусім тим, що, незважаючи на багаторічну історію вивчення та останні передові досягнення медичної науки у визначенні їх етіопатогенетичних чинників, вони залишаються серйозною медико-соціальною проблемою. Наведені статистичні дані свідчать про суттєве збільшення частоти розвитку хвороб печінки останніми роками [1].

Особливе місце серед гепатозів посідає алкогольний гепатит (АГ), який розвивається не відразу, а при регулярному вживанні критичних доз етанолу [7, 17]. У зв'язку з цим тривають пошуки нових лікарських агентів, що володіють широким спектром фармакологічної активності та економічною доступністю. Об'єктом нашої уваги тривалий час є комбінація двох складових. З хімічної точки зору метадоксин (піридоксин-*L*-

2-піролідон-5-карбоксилат) є еквімолярною іонною сіллю А – піридоксину (одна з форм вітаміну В6) та Б – піроглутамінової кислоти (рис.). Іонний характер цієї сполуки передбачає її дисоціацію у водному середовищі та реалізацію фармакологічної дії окремих компонентів препарату.

Метадоксин є діючою речовиною препарату «Метадоксил» виробництва «Лабораторі Балдачі С.п.А.» (Італія). Його генеричні аналоги «Алкодез® ІС» та «Ліверія® ІС» виробляються в Україні ТДВ «ІНТЕРХІМ».

З метою подальшого уточнення і розширення фармакологічного спектра дії даного агента нами вивчено вплив препарату на біохімічні показники крові щурів при хронічному токсичному ураженні етанолом, що і склало мету цієї роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент виконано на білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар з початковою масою 180-200 г, отриманих з віварію Інституту фармакології і токсикології НАМН України, що знаходилися в стандартних умовах на звичайному харчовому і водному раціоні. Маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до Женевської Конвенції 1986 року.

Модель алкогольного гепатиту відтворювали шляхом повторного внутрішньошлункового введення 40 % розчину етанолу в дозі 7 мл/кг маси тіла протягом

© Шаяхметова Г. М., Карпова О. В., Вороніна А. К., Головенко М. Я., 2016

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ПРОФІЛАКТИЧНОМУ ВВЕДЕННІ МЕТАДОКСИНУ НА ТЛІ АЛКОГОЛЬНОГО ГЕПАТИТУ

Показник	Експериментальні групи		
	інтакт	алкогольний гепатит	алкогольний гепатит + метадоксин
Активність			
АсАТ, од/л	227,23 ± 6	245,46 ± 12,80*	238,13 ± 2,77**
АлАТ, од/л	55,83 ± 3,68	59,17 ± 4,01	73,0 ± 3,89*/**
ГГТ, од/л	0,99 ± 0,21	2,74 ± 0,53*	1,01 ± 0,14**
КТ, мкмоль/хв·мг білка	2,07 ± 0,08	1,51 ± 0,10*	1,83 ± 0,18**
ЛФ, од/л	252,69 ± 18,34	213,78 ± 13,39	284,70 ± 16,25**
Вміст			
Загальний холестерин, ммоль/л	1,61 ± 0,06	0,92 ± 0,12*	2,2 ± 0,19*/**
Тригліцериди, ммоль/л	1,23 ± 0,41	3,94 ± 0,66*	3,0 ± 0,49*

Примітки: * – P < 0,05 по відношенню до інтакту; ** – p < 0,05 по відношенню до групи тварин з алкогольним гепатитом.

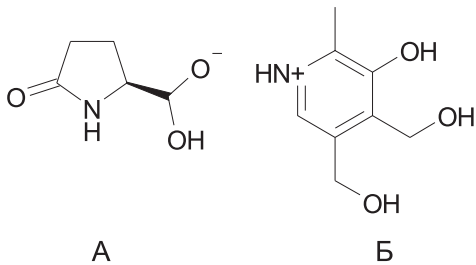


Рис. Структурна формула метадоксину.

7 днів [4]. Метадоксин вводили в профілактичному режимі внутрішньошлунково щоразу за 30 хвилин до введення алкоголю. Доза тест-зразка була обра- на згідно з інструкцією для медичного застосування лікарського засобу та з урахуванням коефіцієнта ви- дової чутливості [3] та склала 90 мг/кг. Для введен- ня тест-зразок розчиняли в дистильованій воді. Ко- жен день готували свіжі порції.

Тварин було розподілено на 3 групи по 6 особин у кожній: 1 – інтактні тварини; 2 – модель алкоголь- ного гепатиту; 3 – модель алкогольного гепатиту + метадоксин. Через 24 години після останнього вве- дення алкоголю і нічного періоду голодування у щу- рів під легким ефірним наркозом зі стегової вени відбирали кров. Для подальших досліджень викорис- тоували сироватку крові.

Для оцінки стану гепатобілярної системи орга- нізму були використані наступні ензимологічні та біо- хімічні показники сироватки крові щурів: активності аланінової (АлАТ) і аспарагінової (АсАТ) амінотранс- фераз, лужної фосфатази (ЛФ), каталази (КТ), гамма- глутамілтранспептидази (ГГТ), вміст загального хо- лестерину та тригліцеридів.

Активності АлАТ, АсАТ, ЛФ, ГГТ визначали на авто- аналізаторі Prestige 24i (Японія) за відповідними ме- тодиками, передбаченими фірмою-виробником для цього обладнання. Вміст загального холестерину та

тригліцеридів в сироватці крові аналізували за допо- могою відповідних біотестів виробництва фірми «PZ Cormay», Польща. Активність каталази оцінювали за методом Королюка [5].

Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням однофакторного диспер- сійного аналізу (ANOVA). Дані представляли як середнє значення ± помилка середнього (M ± m). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично достовірною при значенні p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нааявність чітких діагностичних критеріїв алко- гольного ураження печінки для удосконалення існу- ючих засобів і методів лікування та профілактики, роз- робки стандартів лікування цього патологічного ста- ну є важливою ланкою в експериментальній фарма- кології. У цьому зв'язку актуальною є розробка експ- ериментальних моделей АГ, оскільки тільки в експ- ерименті на тваринах існує можливість впливати відповідним етіологічним фактором (у нашому ви- падку алкоголем) і залежно від часу його експозиції та дози викликати у відповідному органі ураження різного ступеня тяжкості.

Важливою умовою успішного моделювання будь- якої патології та наступного лікування є підбір мар- керів, що характеризують зазначений стан. Такими маркерами можуть бути біохімічні, імунологічні та гі- стологічні показники, що рееструються при формуван- ні АГ [6]. У серії експериментів у тварин ми визнача- ли активність АлАТ, АсАТ, КТ (індикаторних фермен- тів цитолітичного синдрому), ЛФ і ГГТ (маркерів хо- лестази) та кількісний вміст в сироватці крові хо- лестерину і тригліцеридів (маркерів ліпідного обміну).

Основні підсумки експерименту представлені в таблиці. У тварин з індукованим алкогольним гепати- том спостерігалось відхилення від нормальних зна- чень досліджуваних показників структурно-функціо-

нального стану печінки, що свідчить про можливі порушення, пов'язані з цитолітичним та холестатичним синдромом, а також порушенням ліпідного обміну.

Відомо [2], що цитолітичний синдром виникає внаслідок порушення структурної цілісності клітин печінки, передусім гепатоцитів, та швидкого надходження внутрішньоклітинних компонентів у кровотік. Тому ступінь порушення проникності плазматичних мембран гепатоцитів оцінюють за активністю в сироватці крові цитоплазматичних ферментів АсАТ, АлАТ. У групі тварин з алкогольним гепатитом відмічалось достовірне підвищення рівня АсАТ та тенденція до підвищення концентрації АлАТ (табл.).

У групі тварин, яким на тлі АГ було введено метадоксин, активність АсАТ достовірно знижується по відношенню до групи тварин з АГ, але не досягає контрольних величин. Активність АлАТ має триваліший період піврозпаду і нормалізується останньою порівняно з іншими ферментами [2]. Тому в наших експериментах на протязі обмеженого часу дії препарату позитивних змін не відмічено.

Зміна активності ГГТ в сироватці крові має велике діагностичне значення при захворюваннях печінки і гепатобіліарного тракту. Цей фермент більш чутливий до порушень у клітинах печінки, ніж АлАТ, АсАТ, ЛФ та глутаматдегідрогеназа. Особливо чутлива ГГТ до впливу на печінку тривалого споживання алкоголю [10]. У осіб, що зловживають алкоголем, активність ферменту в сироватці крові корелює з кількістю прийнятого алкоголю. Тест особливо цінний для контролю лікування алкоголізму. При гострих гепатитах активність ГГТ підвищується раніше, ніж активність АсАТ і АлАТ, що ми й спостерігаємо у наших дослідженнях. Профілактичне введення метадоксину призводить до достовірного зниження показника активності ГГТ в порівнянні з тваринами з АГ (табл.).

Щодо КТ то клініко-біохімічний моніторинг активності цього ферменту в організмі має прогностичне значення в оцінці мембранодеструктивних процесів. Порушення структурно-функціональної організації клітинних мембран, у тому числі під впливом активізації процесів вільнорадикального окиснення, визначає головні патофізіологічні прояви токсичності [12]. Результати наших досліджень (табл.) доводять, що метадоксин нормалізує ферментативну активність КТ у тварин з АГ. Механізм такої дії може бути наступним. При тривалому прийомі алкоголю розвивається феномен оксидативного стресу. Його проявами є зниження відновлення глутатіону та активності глутатіонредуктази [13]. Вміст глутатіону та активність глутатіонредуктази залишаються на нормальному фізіологічному рівні при використанні метадоксину. Крім того, у тканинах молекула метадоксину дисоціює, утворюючи N-окиси, які функціонують як спінна пастка, що зв'язує активні форми кисню і вільні радикали.

ЛФ істотно відрізняється від амінотрансфераз. У разі захворювань печінки холестатичної природи (із застоєм жовчі), в які залучаються жовчовивідні шляхи, рівень ЛФ буде підвищуватися в першу чергу. У цих випадках ЛФ накопичується у великих кількостях, аж до того, що потрапляє прямо в кровотік. Наша модель АГ не відтворює такий перебіг патології, тому значних змін показників не зареєстровано (табл.).

В той же час інші біохімічні маркери АГ (вміст холестерину та тригліцеридів) піддаються такому впливу. З літератури відомо [9], що при холестази підвищення вільного холестерину і фосфоліпідів має місце з одночасним зниженням етерифікованого холестерину, що, в свою чергу, обумовлено зменшенням утворення в печінці лецитин-холестерин-ацилтрансферази. Зниження активності цього ферменту веде до утворення аномального ліпопротеїду, що відрізняється високим вмістом вільного холестерину і тригліцеридів. Не виключена можливість, що до цього приводить і підвищення вмісту в печінці гліцерол-3-фосфату, з яким етерифікуються жирні кислоти при введенні тваринам етанолу [16]. У результаті підвищеного синтезу гліцерол-3-фосфату відбувається посилення етерифікації жирних кислот і синтезу тригліцеридів, що служить початковим етапом розвитку гіперліпідемії і жирової дистрофії печінки. Зростання концентрації NADH супроводжується зниженням швидкості окиснення жирних кислот, що також сприяє їх відкладенню в печінці [14].

Отже, представлені результати (табл.) свідчать про те, що розвиток експериментального гепатиту в організмі щурів призводить до статистично достовірних порушень практично всіх досліджених біохімічних маркерів крові. Застосування метадоксину у тварин з алкогольним пошкодженням печінки викликало покращення деяких показників, що характеризують цитолітичний синдром (активності АсАТ, КТ), холестатичний синдром (активність ГГТ) та ліпідний обмін (вміст тригліцеридів). Зазначене свідчить про різні механізми виникнення АГ, його перебігу та фармакологічної дії метадоксину. Відсутність дії метадоксину на інші біохімічні ланки в крові щурів, у яких було викликано експериментальний АГ, може бути пояснено неефективністю сполуки у запропонованій нами профілактичній схемі введення. Необхідно також зазначити, що в клінічних випробуваннях метадоксину [15] були отримані результати, які дещо відрізняються від наших доклінічних. Цей факт ще раз підтверджує необхідність перенесення експериментальних даних з тварин на організм людини з обережністю.

ВИСНОВКИ

Внутрішньошлункове введення щурам 40 % розчину етанолу в дозі 7 мл/кг протягом 7 днів призвело до відхилення від нормальних значень досліджуваних біохімічних показників структурно-функціональ-

ного стану печінки: до статистично значущого підвищення рівнів аспаратамінотрансферази, гамма-глутамілтранспептидази, тригліцеридів, статистично значущого зниження активності каталази та тенденції до підвищення рівня аланінамінотрансферази.

Профілактичне введення метадоксину щурам внутрішньошлунково в дозі 90 мг/кг за 30 хвилин до введення етанолу в дозі 7 мл/кг протягом 7 днів привело до нормалізації деяких досліджуваних показників цитолітичного синдрому (активність аспаратамінотрансферази та каталази), холестатичного синдрому (активність гамма-глутамілтранспептидази), ліпідного обміну (вміст тригліцеридів). Відсутність позитивного впливу метадоксину на інші досліджувані біохімічні показники крові (активність аланінамінотрансферази, лужної фосфатази, вміст загального холестерину) свідчить про різні механізми виникнення алкогольного гепатиту та його перебігу. Передбачається, що гепатозахисна дія метадоксину опосередкована антиоксидантним механізмом.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Бабак О. Я. Хронические гепатиты / О. Я. Бабак. – К.: Блиц-Информ, 1999. – 208 с.
2. Болезни печени и желчевыводящих путей: [руководство для врачей] / Под ред. В. Т. Ивашкина. – 2-е изд. – М.: Медицина, 2005. – 536 с.
3. Буров Ю. В. Биологические модели хронического алкоголизма / Ю. В. Буров, В. Н. Жуков // Итоги науки и техники. Сер. Токсикология. – 1984. – Т. 13. – С. 57-92.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекоменд.] / За ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
5. Королюк М. А. Способ определения активности каталазы / [М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и др.] // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С. 9-13.
6. Петров А. Н. Разработка экспериментальных моделей алкогольного гепатита различной степени тяжести / [А. Н. Петров, М. К. Шевчук, Е. К. Георгианова и др.] // Medline.ru. – 2015. – № 16. – С. 187-202.
7. Сухарева Г. В. Алкогольная болезнь печени / Г. В. Сухарева // Consilium medicum. Гастроэнтерол. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 26-27.
8. Шульпекова Ю. О. Лекарственные поражения печени / Ю. О. Шульпекова // Врач. – 2010. – № 7. – С. 10-13.
9. Addolorato G. Metadoxine in the treatment of acute and chronic alcoholism: [a review] / [G. Addolorato, C. Ancona, E. Capristo et al.] // Intern. J. of Immunopathol. and Pharmacol. – 2003. – Vol. 16, № 3. – P. 207-214.
10. Gebo K. A. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: [a systematic review] / K. A. Gebo, H. F. Herlong, M. S. Torbenson // Hepatol. – 2002. – Vol. 36 (Suppl. 1). – P. 161-172.
11. Kondo K. Enhancement of APAP-induced chronic hepatotoxicity in restricted fed rats: nonclinical approach to APAP-induced chronic hepatotoxicity in susceptible patients / K. Kondo // J. of Toxicol. Sci. – 2012. – Vol. 37, № 5. – P. 911-929.
12. Martínez Díaz M. C. Efficacy of metadoxine in the management of acute alcohol intoxication / [Díaz Martínez M. C., Díaz Martínez A., Villamil Salcedo V. et al.] // J. of Intern. Med. Res. – 2002. – Vol. 30, № 1. – P. 44-51.
13. Nawasurit P. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants / P. Nawasurit, T. H. Ward, N. J. F. Dodd // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21. – P. 93-99.
14. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets / G. Paumgartner // World J. of Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12, № 28. – P. 4445-4451.
15. Shpilenya L. S. Metadoxine in acute alcohol intoxication: a double-blind, randomized, placebo-controlled study / [L. S. Shpilenya, A. P. Muzychenko, G. Gasbarrini et al.] // Alcoholism: Clin. and Experimental Res. – 2002. – Vol. 26, № 3. – P. 340-346.
16. Tokeyama Y. Role of Kupfer cell-derived reactive oxygen intermediates in alcoholic liver disease in rats in vivo / [Y. Tokeyama, S. Kamimura, A. Kuroiwa et al.] // Alcoholism: Clin. and Experimental Res. – 1996. – Vol. 20 (Suppl. 9). – P. 335-339.
17. Vonghia L. Acute alcohol intoxication / [L. Vonghia, L. Leggio, A. Ferrulli et al.] // Eur. J. of Internal Med. – 2008. – Vol. 19, № 8. – P. 561-567.

УДК 612.81:615.099.08**А. М. Шаяхметова, О. В. Карпова, А. К. Воронина, Н. Я. Головенко****СОСТОЯНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛКОГОЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАДОКСИНА**

Воспроизведена модель алкогольного гепатита путем внутрижелудочного введения 40 % раствора этанола в дозе 7 мл/кг массы тела крыс самцов линии Вистар в течение 7 дней. В качестве биохимических маркеров алкогольного гепатита использованы показатели цитолитического синдрома (активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, каталазы), холестатического синдрома (активность щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы) и липидного обмена (содержание холестерина, триглицеридов). Показано, что метадоксин (ионная соль пиридоксина и пироглутаминовой кислоты) при профилактическом введении внутрижелудочно в дозе 90 мг/кг за 30 минут до введения алкоголя нормализовал активность аспаратаминотрансферазы и каталазы; гамма-глутамилтранспептидазы; содержание триглицеридов. Отсутствие положительного влияния метадоксина на другие исследуемые биохимические показатели крови свидетельствует о различных механизмах возникновения алкогольного гепатита и его течения. Предполагается, что гепатопротекторное действие препарата опосредовано антиоксидантным механизмом.

Ключевые слова: метадоксин; алкогольный гепатит; гепатопротектор

UDC 612.81:615.099.08**G. M. Shayakhmetova, O. V. Karpova, A. K. Voronina, N. Y. Golovenko****STATE OF BIOCHEMICAL SYSTEM OF WHITE RAT'S BLOOD UNDER CONDITIONS OF ALCOHOLIC HEPATIC INJURY AND PREVENTIVE ACTION METADOXINE**

It was developed model of alcoholic hepatitis by intragastric administration of 40 % ethanol at a dose of 7 ml/kg body weight of male Wistar rats for 7 days. As a biochemical marker of alcoholic hepatitis were used indicators of cytolytic syndrome (activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, catalase), cholestatic syndromes (alkaline phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase) and lipid exchange (levels of cholesterol, triglycerides). It was shown that metadoxine (ionic salt of pyridoxine and pyroglutamic acid), which was administered preventively intragastrically at a dose of 90 mg/kg 30 min prior to the administration of alcohol, normalized activity of aspartate aminotransferase and catalase; gamma-glutamyl transpeptidase; triglycerides. The lack of a positive influence of metadoxine on the other studied biochemical blood parameters indicatives that mechanisms of development of alcoholic hepatitis and course of its are different. It is assumed that the hepatoprotective effect of the drug is realized through antioxidant mechanism.

Key words: metadoxine; alcoholic hepatitis; hepatic protector

Адреса для листування:

65123, м. Одеса, вул. Висоцького, буд. 16-А, кв. 162.

Тел.: + 38 067 607 99 07.

E-mail: olya_karpova2001@mail.ru.

Карпова О. В.

Надійшла до редакції 22.01.2016 р.