ОЦІНКА АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕДГЕРМУ ПРИ ГОСТРОМУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГЕПАТИТІ

Одеський національний медичний університет

Значну роль у патогенезі гепатитів має значне порушення окисно-відновлених процесів. Збалансованість між перекисним окисненням, з одного боку, і антиоксидантною системою, з іншого, є необхідною умовою для підтримання нормальної життєдіяльності клітини. Сучасний арсенал ефективних препаратів гепатозахисної дії не такий вже й великий, тому розробка нових гепатопротекторів залишається актуальною проблемою фармакології. Мета роботи - вивчення антиоксидантних властивостей Медгерму при гострому експериментальному гепатиті. Матеріал та методи дослідження. Досліди проводилися на щурах-самцях масою 180-220 г. Гострий токсичний гепатит у щурів викликали шляхом внутрішньочеревинного введення D-галактозаміну з розрахунку 400 мг/кг (ЛД₅₀). Експериментальні тварини були розподілені на 4 групи: I група (n = 10) - інтактні тварини, яким протягом усього часу спостереження внутрішньочеревинно вводився 0,9% розчин натрію хлориду (контрольна група); II група (n = 40) - тварини, які отримували тільки D-галактозамін; III група (n = 40) - щури, яким внутрішньочеревинно вводили Медгерм дозою 0,4 мг/кг за 7 діб до введення і 7 діб після введення D-галактозаміну. IV група (n = 40) - щури, яким в такому ж режимі внутрішньочеревинно вводили препарат порівняння Ессенціале Н дозою 5 мг/кг. Дослідження показників перекисного окислення ліпідів і антиоксидантної системи проводилися в 1, 3 і 7-у добу після введення гепатотоксину в сироватці крові і супернатанті гомогената тканини печінки. Стан процесів перекисного окислення ліпідів у тварин з галактозаміновим гепатитом оцінювали за вмістом у крові і тканини печінки кінцевих продуктів ліпідпероксидації, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти). Стан основних компонентів антиоксидантної системи оцінювали за рівнем глутатіону відновленого і за активністю каталази і супероксиддисмутази. Результати та їх обговорення. Встановлено, що Медгерм збільшував резистентність печінки до гепатотоксиканту про що свідчать зменшення рівня продуктів перекисного окислення ліпідів та зберігав вміст/активність ключових показників антиоксидантної системи на першу добу гепатиту. Крім того у щурів, які на тлі гострого токсичного гепатиту одержували профілактично-лікувальною схемою Медгерм протікання захворювання було більш легким ніж у тварин, які не одержували цей препарат. Висновки і перспективи подальших досліджень. Медгерм має гепатопротекторні властивості, в основі яких ймовірно лежить позитивний вплив на стан перекисного окислення ліпідів і основних компонентів антиоксидантної системи.

Ключові слова: германійорганічні сполуки, купрум, Медгерм, гострий токсичний гепатит, антиоксидантний захист організму.

Вступ

Проблема гострих та хронічних гепатитів різної етіології досі актуальна тому, що остаточні наслідки цих захворювань найчастіше призводять до інвалідизації людини. Значну роль у патогенезі гепатитів має значне порушення окисно-відновлених процесів. Все це призводить до накопичення продуктів інтенсивного протеолізу. До них відносяться в тому числі продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які відіграють важливу роль в патогенезі гострих і хронічних гепатитів різної етіології [1]. Збалансованість між перекисним окисненням, з одного боку, і антиоксидантною системою (АОС), з іншого, є необхідною умовою для підтримання нормальної життєдіяльності клітини [2].

На сьогодні в фармакотерапії гострих і хронічних гепатитів застосовуються лікарські засоби як етіотропної, так і патогенетичної фармакотерапії. Важливим завданням патогенетичного лікування захворювань печінки є терапія, яка направлена на попередження або усунення однієї з провідних ланок механізму ураження - дестабілізації морфофункціонального стану мембран гепатоцитів. Значною мірою це залежить від ініціювання вільнорадикального окиснення біомемб-

ран [2].

Сучасний арсенал ефективних препаратів гепатозахисної дії не так вже й великий, тому розробка нових гепатопротекторів залишається актуальною проблемою фармакології [3]. Протягом значного часу на кафедрі загальної та клінічної фармакології Одеському національному медичному університеті спільно з співробітниками кафедри загальної хімії та полімерів Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова проводились доклінічні дослідження координаційних сполук германію. Похідні германію, поряд з достатньо низькою токсичністю, мають різноманітні фармакологічні властивості (кардіо-, гепатопротекторні, нейротропні, протипухлинні, антивірусні та ін.) [4,5,6]. Особливий інтерес германій являє в комплексних сполуках з оксіетилідендифосфоною кислотою (ОЕДФ), яка має високу біологічну активність. Її похідні досить широко застосовуються як регулятори мінерального обміну, протипухлинні засоби, антидоти при отруєнні токсичними і радіоактивними елементами та ін. [7, 8]. Тому цілеспрямованим синтезом було створено низку біологічно активних речовин (БАР) в ряду оксіетилідендифосфонатогерманатів. Одною з перспективних речовин є

комплексна сполука германію, ОЕДФ з есенціальним мікроелементом купрумом - купрум-оксіетилідендифосфатогерманат (лабораторний шифр - Медгерм). Купрум, який входить до складу майже 30 ферментів (Cu/Zn-супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза, тирозиназа, аскорбіназа та ін.), відіграє значну роль у метаболічних процесах, зокрема в регуляції вуглеводного обміну, процесах кровотворення, засвоєнню заліза, його похідні мають протизапальні, імуномодуючі властивості та ін. [9,10,11].

Мета роботи

Вивчення антиоксидантних властивостей Медгерму при гострому експериментальному гепатиті.

Матеріал та методи дослідження

Досліди проводилися згідно біоетичних вимог на щурах-самцях масою 180-220 г, розведених у віварії Одеського національного медичного університету (ОНМедУ). Тварини містилися в звичайних умовах на стандартному харчовому і водному раціоні. Гострий токсичний гепатит у щурів викликали шляхом внутрішньочеревинного (в/о) введення D-галактозаміну з розрахунку 400 мг/кг у вигляді 20 % водного розчину (ЛД₅₀) [12].

Експериментальні тварини були розподілені на 4 групи: I група (n = 10) - інтактні тварини, яким протягом усього часу спостереження в/о вводився 0,9% розчин натрію хлориду (контрольна група); II група (n = 40) - тварини, які отримували тільки D-галактозамін; III група (n = 40) - щури, яким в/о вводили Медгерм дозою 0,4 мг/кг за 7 діб до введення і 7 діб після введення D-галактозаміну. IV група (n = 40) - щури, яким в такому ж режимі в/о вводили препарат порівняння Есенціале Н (виробництва Авентіс Фарма Дойчланд ГмбХ, Гей. Наттерман енд Сайі ГмбХ, Німеччина) дозою 5 мг/кг.

Дослідження показників ПОЛ і АОС проводилися в 1, 3 і 7-у добу після введення гепатотоксину в сироватці крові (СК) і супернатанті гомогената тканини печінки (ТП). Стан процесів ПОЛ у тварин з галактозаміновим гепатитом оцінювали за вмістом у крові і тканини печінки кінцевих продуктів ліпідпероксидації, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти) [13]. Стан основних компонентів АОС оцінювали за рівнем одного з основних компонентів її неферментативної ланки - глутатіону відновленого і за активністю двох ключових ферментів її ензимної складової - каталази і супероксиддисмутази (СОД) [13]. При розрахунках вмісту аналітів і активності ферментів в ТП враховували масу тканини печінки і ступінь розведення гомогенату.

Статистичну обробку отриманих даних проводили загальноприйнятими у медико-біологічних дослідженнях методами за допомогою персонального комп'ютера, використовуючи програму Microsoft Excel методом обчислення

середнього арифметичного та його рівня значущості за критерієм достовірності Ст'юдента. Мінімальну статистичну достовірність визначали при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

На 1-й день галактозамінового гепатиту в СК щурів вміст ТБК в порівнянні з контрольною групою підвищувався (рис. 1). Найбільше підвищення вмісту ТБК в СК виявлено у щурів 2-й групи (+150,0 %, $p < 0,05$). У тварин, які отримували Медгерм або Есенціале, також спостерігалось достовірне підвищення вмісту ТБК в СК, але меншою мірою (відповідно на +23,7 і +49,2 %). Вміст ТБК в ТП в порівнянні з контрольною групою також підвищувався. Найбільше підвищення вмісту ТБК в ТП виявлено у щурів 2-й групи (+147,0 %, $p < 0,05$). У щурів, які отримували Медгерм або Есенціале, також спостерігалось підвищення вмісту ТБК в ТП, але в меншій мірі (відповідно на +33,6 і +64,9%, $p < 0,05$).

В той же час на 1-й день галактозамінового гепатиту вміст глутатіону, відновленого в СК щурів, порівняно з контрольною групою зменшувався (рис. 2). Найбільше зменшення вмісту глутатіону відновленого в СК виявлено у щурів, які не лікувались (-53,5%, $p < 0,05$). У тварин, які отримували Медгерм або Есенціале, також спостерігалось достовірне зменшення вмісту глутатіону, відновленого в СК, але меншою мірою (відповідно на -44,0 і -44,7%). Вміст глутатіону відновленого в ТП порівняно з контрольною групою зменшувався. Найбільше зниження цього показника виявлено у щурів 2-й групи (-59,8%, $p < 0,05$). У тварин, які отримували Медгерм або Есенціале, виявлялось зменшення вмісту глутатіону відновленого в ТП відповідно на 26,6 і 36,4 % ($p < 0,05$).

У СК щурів дослідних груп на 1-й день галактозамінового гепатиту активність каталази порівняно з контрольною групою знижувалася (рис. 3). У тварин 2-й групи зниження активності каталази в СК було найбільшим (-30,0%, $p < 0,05$). У тварин, які отримували Медгерм або Есенціале, спостерігалось зниження активності каталази, але меншою мірою (відповідно на -9,2%, $p > 0,05$, і на -25,9%, $p < 0,05$). Активність каталази у ТП тварин порівняно з контрольною групою також знижувалася, при чому найбільше зниження активності каталази в ТП виявлено у щурів 2-й групи (-30,0%, $p < 0,05$). У тварин 3-й та 4-й групи, які отримували Медгерм або Есенціале, також спостерігалось зниження активності каталази в ТП, але в меншому ступені (відповідно на -21,4% і на -28,5%, $p < 0,05$).

На 1-й день гострого гепатиту знижувалася і активність СОД в СК щурів в порівнянні з контрольною групою (рис. 4). Найбільше зменшення цього показника виявлено у щурів з гепатитом, які не отримували лікування (-58,3%, $p < 0,05$). У тварин, які отримували Медгерм або Есенціале, також спостерігалось зниження активності СОД,

але меншою мірою (відповідно на -16,3 і -47,3%). Активність СОД в ТП порівняно з контрольною групою також знижувалася. Найбільше зниження активності СОД в ТП виявлено у щурів 2-й групи

(-49,2%, $p < 0,05$). У тварин 3-й та 4-й груп виявлялось менш виразне зниження активності СОД в ТП (відповідно на 19,1 і 31,6 %).

Рис. 1. Динаміка вмісту ТБК-реактантів у сироватці крові та у тканині печінки щурів
На рис. 1-4: * - достовірність порівняно з контролем ($p < 0,05$)

Рис. 2. Динаміка вмісту глутатиону відновленого у сироватці крові та у тканині печінки щурів

Рис. 3. Динаміка активності каталази у сироватці крові та у тканині печінки щурів

Рис. 4. Динаміка активності СОД у сироватці крові та у тканині печінки щурів

Як свідчать дані рис. 1-4, динаміка досліджуваних показників при гострому галактозаміновому гепатиті в кожній дослідній групі мала свої особливості. Так, у тварин 2-ї групи зміни досліджуваних показників в СК і ТП були самими виразними і достовірно відрізнялися від показників щурів контрольної групи протягом всіх 7 днів спостереження.

У тварин 3-ї групи, на тлі профілактично-лікувального введення Медгерму, вираженість патологічних змін досліджуваних показників була значно менше, а їх відновлення до вихідних значень контрольних щурів відбувалося набагато раніше, ніж у нелікованих тварин 2-ї групи. Вже на 3-й день гострого галактозамінового гепатиту відновлення досліджуваних показників

було значним, а на 7-й день не спостерігалось достовірних відмінностей відносно контрольної групи (див. рис. 1-4).

У щурів 4-й групи, на тлі профілактично-лікувального введення Есенціале, спостерігалась позитивна динаміка досліджуваних показників. Однак, на 3-добу значення показників, що вивчалися, достовірно відрізнялися від контрольної групи. Крім того, патологічні зміни більшості показників значно відрізнялися порівняно з тваринами, які отримували Медгерм. Навіть на 7-у добу гепатиту, вміст глутатіону відновленого в СК і ТП, а також активність каталази і СОД достовірно відрізнялися від аналогічних показників контрольної групи щурів.

Таким чином, при оцінці ефектів профілактично-лікувального введення Медгерму при гострому токсичному гепатиті встановлено його значний вплив на стан ПОЛ і неферментативної та ферментативної частин АОС. Медгерм збільшував резистентність печінки до гепатотоксиканту, оскільки досить ефективно попереджав генерацію і накопичення кінцевих продуктів ліпідопероксидації, а також зберігав активність АОС. Це підтверджується тим, що патологічні зміни з боку ПОЛ і АОС як в сироватці крові, так і в тканині печінки на 1-у добу гострого токсичного гепатиту були значно меншими не тільки порівняно зі щурами, які не лікувалися, а й порівняно з аналогічними показниками у тварин, які отримували Есенціале. Крім цього, у тварин, які отримували Медгерм, показники ПОЛ і АОС швидше відновлювалися до вихідного рівня порівняно з аналогічними показниками у нелікованих щурів 2-й групи. Більш того, відновлення деяких показників, що вивчалися у тварин і які отримували Есенціале, було меншою мірою, ніж у тварин 3-й групи.

Проте динаміка показників ПОЛ і АОС при застосуванні Медгерму схожа з динамікою аналогічних показників при застосуванні препарату порівняння - Есенціале. Це дозволяє зробити припущення, що купрум-оксіетилідендифосфонатореманат має антиоксидантну активність, в основі механізму якої лежить здатність реалізувати антиоксидантні та антирадикальні властивості, попереджаючи, таким чином, надлишкові витрати запасів ендogenous антиоксидантів і одночасно знижуючи гіперпродукцію активних форм кисню, які ініціюють процеси ПОЛ.

Крім цього, D-галактозамін викликає ініціювання ПОЛ, що призводить до виснаження АОС клітин і порушення функціонування плазматичних, мітохондріальних мембран і мембран ендоплазматичного ретикулула [5].

Тому можна дійти висновку, що ефективно зме-

нення негативного впливу гепатотоксиканта на печінку на тлі профілактично-лікувального застосування купрум-оксіетилідендифосфонатореманат обумовлено не тільки антиоксидантною активністю БАР, але і опосередкованою мембранопротекторною дією.

Висновки та перспективи подальших досліджень

На підставі отриманих даних можливо зробити висновок, що Медгерм має гепатопротекторні властивості, в основі яких, в тому числі, значне місце займає його здатність попереджати надлишкові витрати запасів ендogenous антиоксидантів і одночасно знижувати надмірне утворення активних форм кисню, які ініціюють процес перекисного окислення ліпідів. Це дозволяє рекомендувати застосування нової вітчизняної біологічно активної речовини – купрум-оксіетилідендифосфонатореманату (Медгерму) як потенційного гепатопротекторного засобу.

Література

1. Rashidova MA, Darenskaya MA, Sholohov LF. Sovremennyye predstavleniya o virusnykh gepatitah (obzor literatury) [Current views on viral hepatitis (literature review)]. Byulleten VSNTs SO RAMN. 2015; 6 : 67-74 (Russian).
2. Martusevich AK, Karuzin KA, Samoylov AS. Antioksidantnaya terapiya: sovremennoe sostoyaniye, vozmozhnosti i perspektivy [Antioxidant therapy: current status, opportunities and prospects]. Bioradikalny i antioksidanty. 2018; 5(1): 3-7 (Russian).
3. Galchenko OE, Morozova VA, Babaeva AR. Sovremennyye vozmozhnosti primeneniya gepatoprotektorov v lechenii khronicheskikh diffuznykh zabolevaniy pecheni [Current possibilities of using hepatoprotectors in the treatment of chronic diffuse liver diseases]. Lekarsvennyy vestnik. 2015; 2:7-17 (Russian).
4. Lukevits EYa, Gar TK, Ignatovich LM. Biologicheskaya aktivnost soedineniy germaniya [The biological activity of compounds of Germany]. Riga: Zinatne; 1990. 191 p. (Latvia).
5. Godovan VV. Farmakologichni vlastivosti novih pohidnih germanieviy soley difosfonovih kislot z bioligandami [Pharmacological properties of the new derivatives of diphosphonic acids germanium salts with bioligands] [avtoref. dis... d-ra med. nauk]/ Odesa, Odesa State Medical University; 2008. 32 p. (Ukrainian)
6. Matyushkina MV. Farmakologicheskaya aktivnost novykh koordinatsionnykh soedineniy metallov s limonnoy kislotoy [Pharmacological activity of new coordination compounds of metals with citric acid] [dissertation]. Kharkiv, Kharkiv National Medical University; 2018. 20 p. (Ukrainian).
7. Knyazkova II. Klinicheskaya farmakologiya bisfosfonatov [Clinical Pharmacology of Bisphosphonates]. Farmakoterapiya. 2014; 5: 6:84-89 (Ukrainian).
8. Golovach IYu. Bisfosfonaty: voprosy dlitelnosti terapii i dokazatelstva effektivnosti v realnoy klinicheskoy praktike [Bisphosphonates: questions of the duration of therapy and evidence of effectiveness in real clinical practice]. Travma. 2016; 17(4):29-36. (Russian).
9. Hordyjewska A, Popielek Ł, Kocot J. The many «faces» of copper in medicine and treatment. Biometals. 2014; 27(4):611-21.
10. Park KC, Fouani L, Jansson PJ, Woo D. Copper and conquer: copper complexes of di-2-pyridylketone thiosemicarbazones as novel anti-cancer therapeutics. Metallomics. 2016; 8(9):874-886.
11. Dubick MA, Barr JL, Keen CL, Atkins JL. Ceruloplasmin and Hypoferremia: Studies in Burn and Non-Burn Trauma Patients. Antioxidants 2015; 4(1): 153-69. DOI: 10.3390/antiox4010153
12. Stefanov AV, editor. Doklinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv [Preclinical studies of drugs]: Metod. Rekomendatsii. Kiev; 2002. 567 p.
13. Kamyshnikov VS. Metody klinicheskikh laboratornykh issledovaniy [Methods of clinical laboratory research]. Moskva: MEDpressinform. 2016. 736 p. (Russian).

Реферат

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ МЕДГЕРМА ПРИ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ

Тымчишин О. Л., Годован В. В., Кресюн Н. В.

Ключевые слова: германийорганические соединения, медь, Медгерм, острый токсический гепатит, антиоксидантная защита организма.

Значительную роль в патогенезе гепатитов имеет значимые нарушения окислительно-восстановленных процессов. Сбалансированность между перекисным окислением, с одной стороны, и антиоксидантной системой, с другой, является необходимым условием для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки. Современный арсенал эффективных препаратов гепатозащитного действия не так уж велик, поэтому разработка новых гепатопротекторов остается актуальной проблемой фармакологии. Цель работы - изучение антиоксидантных свойств Медгерма при остром экспериментальном гепатите. Материал и методы исследования. Опыты проводились на крысах-самцах массой 180-220 г. Острый токсический гепатит у крыс вызывали путем внутрибрюшинного введения D-галактозамина из расчета 400 мг/кг (ЛД₅₀). Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: I группа (n = 10) - интактные животные, которым в течение всего времени наблюдения внутрибрюшинно вводился 0,9% раствор натрия хлорида (контрольная группа) II группа (n = 40) - животные, которые получали только D-галактозамин; III группа (n = 40) - крысы, которым внутрибрюшинно вводили Медгерм дозой 0,4 мг/кг за 7 суток до введения и 7 суток после введения D-галактозамина. IV группа (n = 40) - крысы, которым в таком же режиме внутрибрюшинно вводили препарат сравнения Эссенциале Н дозой 5 мг/кг. Исследование показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы проводились в 1, 3 и 7 день после введения гепатотоксина в сыворотке крови и супернатанте гомогената ткани печени. Состояние процессов перекисного окисления липидов у животных с галактозаминовым гепатитом оценивали по содержанию в крови и ткани печени конечных продуктов липидпероксидации, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактанты). Состояние основных компонентов антиоксидантной системы оценивали по уровню глутатиона восстановленного и по активности каталазы и супероксиддисмутазы. Результаты и их обсуждение. Установлено, что Медгерм увеличивал резистентность печени к гепатотоксиканту о чем свидетельствуют снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов и уменьшал расходование ключевых компонентов антиоксидантной системы в первые сутки гепатита. Кроме того, у крыс, на фоне острого токсического гепатита получавших профилактически-лечебной схемой Медгерм, течение заболевания было более легким, чем у животных, не получавших этот препарат. Выводы и перспективы дальнейших исследований. Медгерм имеет гепатопротекторные свойства, в основе которых вероятно лежит положительное влияние на состояние перекисного окисления липидов и основных компонентов антиоксидантной системы.

Summary

EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF MEDGERM IN ACUTE SIMULATED HEPATITIS

Tymchishin O. L., Godovan V.V., Kresyun N.V.

Key words: organic germanium compounds, copper, medgerm, acute toxic hepatitis, antioxidant defence of the body.

Disruption in redox processes plays a significant role in the pathogenesis of hepatitis. A balance between peroxidation, on the one hand, and the antioxidant system, on the other, is a prerequisite for maintaining normal cell activity. The modern arsenal of effective hepatoprotective drugs is not so wide therefore, the development of new hepatoprotectors is one of the topical issues in pharmacology. The purpose of the work is study the antioxidant properties of medgerma in acute experimental hepatitis. Material and methods. The experiments were performed on male rats weighing 180-220 g. Acute toxic hepatitis in rats was induced by intraperitoneal administration of D-galactosamine in a dosage of 400 mg / kg (LD₅₀). The experimental animals were divided into 4 groups: group I (n = 10) included intact animals that were injected 0.9% sodium chloride solution (control group) intraperitoneally, II group (n = 40) involved the animals receiving only D-galactosamine; group III (n = 40) included rats, which received were administered Medmerg intraperitoneally in a dose of 0.4 mg / kg 7 days before D-galactosamine administration and 7 days after D-galactosamine administration. Group IV (n = 40) included rats, which received the comparison medicine, Essentiale® N, in at a dosage of 5 mg / kg in the same mode. The assessment of lipid peroxidation indices and the antioxidant system indices were carried out on days 1, 3, and 7 after the administration of hepatotoxin in the blood serum and the liver tissue homogenate supernatant. The condition of lipid peroxidation processes in the animals with galactosamine hepatitis was assessed by the content of lipid peroxidation end products in the blood and liver tissue that react with 2-thiobarbituric acid (TBA reactants). The condition of the main components of the antioxidant system was evaluated by the level of reduced glutathione and by the activity of catalase and superoxide dismutase. Results and discussion. It has been established that medgerm enhances the liver resistance to hepatotoxicant, as evidenced by a decrease in the level of lipid peroxidation products and the consumption of main components of the antioxidant system on the first day of hepatitis. Moreover, in the rats, which received Medgerm according to prevention scheme under acute toxic hepatitis, the course of the disease was milder than in the animals that did not receive this therapy. Conclusions and prospects for further research. Medgerm possesses hepatoprotective properties, which underlay positive effects on the state of lipid peroxidation and the main components of the antioxidant system.