

ГЕПАТОПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ГЕРМАНИЙОРГАНИЧЕСКОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА (МЕДГЕРМ) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ

Олег Львович Тымчишин*

Одесский национальный медицинский университет

Реферат

Цель. Изучение влияния нового германийорганического биологически активного вещества (медгерм) на состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему у крыс при остром галактозаминовом гепатите.

Методы. опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар. Острый токсический гепатит у крыс вызывали путём внутрибрюшинного введения D-галактозамина. Экспериментальные животные были распределены на четыре группы: первая группа (n=10) – интактные животные, которым внутрибрюшинно вводили в течение всего времени наблюдения 0,9% раствор натрия хлорида (контрольная группа); вторая группа (n=40) – животные, которые получали только D-галактозамин; третья группа (n=40) – крысы, которым внутрибрюшинно вводили медгерм в течение 7 сут до введения и 7 сут после введения D-галактозамина. Доза и режим введения медгерма были определены ранее. Четвёртую группу (n=40) составили крысы, которым в таком же режиме вводили препарат сравнения эссенциале® Н. В сыворотке крови и супернатанте гомогената ткани печени в 1-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки после введения гепатотоксина определяли концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, восстановленного глутатиона, оценивали активность супероксиддисмутазы и каталазы.

Результаты. Медгерм оказывал выраженное влияние на состояние прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза при остром токсическом галактозаминовом гепатите. Он достаточно эффективно предупреждал генерацию и накопление конечных продуктов липидпероксидации, а также сохранял активность неферментативной и ферментативной частей антиоксидантной системы. У животных, получавших медгерм, изучаемые показатели быстрее восстанавливались до исходного уровня, чем у крыс с экспериментальным гепатитом, не получавших данное соединение.

Вывод. Полученные результаты свидетельствуют об антиоксидантной активности медгерма и его опосредованном мембранопротективном действии при остром токсическом гепатите.

Ключевые слова: германийорганические соединения, медь, медгерм, острый токсический гепатит, антиоксидантная система защиты.

HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF A NEW GERMANIUM-ORGANIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE (MEDGERM) IN EXPERIMENTAL HEPATITIS

O.L. Tymchyshin. Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine.
Aim. To study of the influence of new germanium-organic biologically active substance (medgerm) on lipid peroxidation and antioxidant system in rats with galactosamin-induced acute hepatitis. **Methods.** The experiments were carried out on Wistar male rats. Acute toxic hepatitis in rats was induced by intraperitoneal injection of D-galactosamine. Experimental animals were divided into 4 groups: first group (n=10) – intact animals that received 0.9% sodium chloride solution intraperitoneal injections throughout the observation period (control group); second group (n=40) – animals that received only D-galactosamine; third group (n=40) – rats that received medgerm intraperitoneal injections 7 days before and 7 days after the administration of D-galactosamine. The dose and administration regimen of medgerm were pre-defined. The fourth group (n=40) included rats that received Essentiale® N in the same mode as a comparator drug. Determination of thiobarbituric acid reactants, reduced glutathione levels in serum and liver homogenate supernatant, as well as superoxide dismutase and catalase activities were carried out in 1, 3, 5 and 7 days after the administration of liver toxins. **Results.** Medgerm has a significant effect on pro- and antioxidant homeostasis in acute toxic galactosamine-induced hepatitis. It effectively prevented the generation and accumulation of lipid peroxidation end products and preserved the activity of non-enzymatic and enzymatic antioxidant system parts. In animals treated with medgerm, studied parameters restored to reach the baseline level faster than in rats with galactosamine-induced hepatitis that were not treated with medgerm. **Conclusion.** The findings suggest that medgerm has the antioxidant activity and a membrane-mediated action in acute toxic hepatitis. **Keywords:** germanium-organic substances, copper, medgerm, acute toxic hepatitis, antioxidant protection.

Свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) играют важную роль в патогенезе острых и хронических гепатитов различной этиологии [1]. Баланс между ПОЛ и антиоксидантной системой (АОС) – условие, необходимое для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки.

Современная фармакотерапия острых и хронических болезней печени характеризуется применением лекарственных средств

как этиотропной, так и патогенетической фармакотерапии. Одной из основных задач патогенетической составляющей лечения гепатитов является предупреждение или устранение одного из ведущих звеньев механизма поражения печени – дестабилизации морфофункционального состояния мембран гепатоцитов, связанной со свободнорадикальным окислением [7].

Несмотря на достаточно большой арсенал гепатопротекторов, они не всегда до-

статочны эффективны, поэтому разработка новых препаратов гепатопротективного действия остаётся актуальной проблемой гепатофармакологии [10]. В последнее время значительное развитие получили исследования фармакологических свойств германийорганических соединений [5, 14]. Проведённые доклинические и клинические испытания комплексных германийсодержащих соединений показали, что они положительно влияют на организм, имея разносторонние фармакодинамические свойства (гепато-, нейро-, кардиопротективное, антигипоксическое и др.) [13]. Особый интерес германий представляет в комплексных соединениях с различными биолгандами [5], среди которых особое внимание занимает оксиэтилидендифосфоновая кислота. Наряду с низкой токсичностью она обладает высокой биологической активностью, её производные достаточно широко применяют в клинической практике как регуляторы минерального обмена, противоопухолевые средства, антидоты при отравлении токсичными и радиоактивными элементами и т.д. [11, 12]. По этой причине целенаправленным синтезом был создан новый класс биологически активных веществ — оксиэтилидендифосфонатогерманатов. Как одно из перспективных веществ в этом ряду можно рассматривать комплексное соединение германия и оксиэтилендифосфоновой кислоты с эссенциальным микроэлементом медью — купрум-оксиэтилиден-дифосфонато-германат (лабораторный шифр — медгерм).

Интерес к меди обусловлен тем, что она играет большую роль в поддержании морфофункциональной структуры миелоновых оболочек нервов, кровеносных сосудов, лёгочных альвеол и пр. Кроме того, медь влияет на углеводный обмен, процессы кроветворения, способствует усвоению железа, входит в состав многих важных ферментов, таких как Cu/Zn-супероксиддисмутаза (Cu/Zn-SOD), цитохромоксидаза, тирозиназа, аскорбиназа и другие, обладает противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [4, 6]. В метаболизме меди большую роль играет печень, где синтезируется медьсодержащий белок церулоплазмин, обладающий различными биологическими свойствами [2].

Всё это и обусловило цель данного исследования — изучение влияния медгерма на состояние ПОЛ и АОС у крыс при остром галактозаминном гепатите.

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар с массой тела 180–220 г, разведённых в виварии Одесского национального медицинского университета. Животных содержали в обычных условиях на стандартном пищевом и водном рационе. Острый токсический гепатит у крыс вызывали путём внутрибрюшинного (в/б) введения D-галактозамина из расчёта 400 мг/кг в виде 20% водного раствора (полулетальная доза) [8]. Ранее было показано, что для изучения новых гепатопротекторов с предполагаемой мембранотропной активностью наиболее показательна галактозаминовая модель поражения печени, поскольку она протекает, во-первых, «мягче», во-вторых, с привлечением практически всех патогенетических механизмов, наблюдаемых при гепатитах различной этиологии, в том числе вирусной [3].

Экспериментальные животные были распределены на четыре группы: первая группа (n=10) — интактные животные, которым в/б вводили в течение всего времени наблюдения 0,9% раствор натрия хлорида (контрольная группа); вторая группа (n=40) — животные, которые получали только D-галактозамин; третья группа (n=40) — крысы, которым в/б вводили медгерм в дозе 0,4 мг/кг в течение 7 сут до введения и 7 сут после введения D-галактозамина. Доза и режим введения медгерма были определены ранее [9]. Четвёртую группу (n=40) составили крысы, которым в таком же режиме в/б вводили препарат сравнения эссенциале® Н («Авентис Фарма Дойчланд ГмбХ», «Эй. Наттерман энд Сайи ГмбХ», Германия) в дозе 5 мг/кг.

Исследование показателей ПОЛ и АОС проводили в 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сутки после введения гепатотоксина в сыворотке крови (СК) и супернатанте гомогената ткани печени (ТП). Состояние процессов ПОЛ у животных с галактозаминным гепатитом оценивали по содержанию в крови и ТП конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-Р). Состояние основных компонентов АОС оценивали по уровню одного из основных компонентов её ферментативного звена — глутатиона восстановленного (по G.L. Ellman, 1959), а также по активности двух ключевых ферментов её энзимной составляющей — каталазы (по М.А. Корольюк, 1988) и СОД (по В.А. Костюк и соавт., 1990).

При расчётах содержания анализируемых веществ и активности ферментов в ТП

учитывали массу ТП и степень разведения гомогената. Статистическую обработку полученных данных проводили, используя программу Microsoft Excel, методом вычисления среднего арифметического и уровня его статистической значимости по критерию достоверности Стьюдента.

Проведённые исследования показали, что у животных второй группы в 1-е сутки острого галактозаминового гепатита происходило резкое повышение уровня ТБК-Р (СК – в 2,49 раза, ТП – 3,47 раза), уменьшалось содержание восстановленного глутатиона (СК – на 53,5%, ТП – на 59,8%), снижалась активность каталазы (в обоих субстратах на 30,0%) и СОД (в СК – на 58,3%, в ТП – на 49,2%) по сравнению с животными первой группы (табл. 1, 2).

У крыс третьей и четвёртой групп в тот же период гепатита происходили аналогичные по направленности изменения, но их выраженность была значительно меньшей. По сравнению с животными первой группы у крыс третьей группы уровень ТБК-Р повышался в СК только на 23,7%, а в ТП – на 33,6%; содержание восстановленного глутатиона уменьшалось в СК на 44,0%, в ТП – на 26,6%; активность каталазы снижалась в СК на 9,2%, в ТП – на 21,4%; активность СОД уменьшалась в СК на 16,3%, в ТП – на

19,1% (см. табл. 1, 2). У крыс четвёртой группы по сравнению с контрольной уровень ТБК-Р повышался в СК на 49,2%, в ТП – на 64,9%; содержание восстановленного глутатиона уменьшалось в СК на 44,7%, в ТП – на 36,4%; активность каталазы снижалась в СК на 25,9%, в ТП – на 28,5%; активность СОД уменьшалась в СК на 47,3%, в ТП – на 31,6% (см. табл. 1, 2).

Как свидетельствуют данные таблиц, динамика изучаемых показателей при остром галактозаминовом гепатите в каждой опытной группе имела свои особенности. Так, у животных второй группы изменения изучаемых показателей в СК и в ТП были самыми выраженными и достоверно отличались от показателей крыс контрольной группы вплоть до 7-го дня наблюдения.

У животных третьей группы на фоне профилактически-лечебного введения медгерма выраженность патологических изменений изучаемых показателей была значительно меньше, а их восстановление к исходным значениям контрольных крыс происходило намного раньше, чем у нелеченых животных второй группы. Так, повышение содержания ТБК-реактантов и в СК, и в ТП было достоверным только до 3-х суток наблюдения, а к 5-м суткам гепатита и в СК, и в ТП их содержание прибли-

Таблица 1

Содержание веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-Р), и глутатиона восстановленного в сыворотке крови (СК) и ткани печени (ТП) крыс разных опытных групп, $M \pm m$

День гепатита	Содержание ТБК-Р		Содержание восстановленного глутатиона	
	СК, нмоль/л	ТП, нмоль/г	СК, мкмоль/л	ТП, мкмоль/г
Первая группа (контроль)	27,81±1,67	0,31±0,01	54,1±3,13	155,35±8,10
Вторая группа (нелеченый гепатит)				
1-й	69,2±3,11*	1,08±0,05*	25,15±1,30*	62,50±3,13*
3-й	57,19±2,90*	0,78±0,04*	26,04±0,52*	54,61±2,18*
5-й	53,04±2,70*	0,46±0,02*	29,30±1,79*	81,64±2,45*
7-й	42,79±2,11*	0,41±0,01*	36,86±0,88*	113,93±5,70*
Третья группа (гепатит на фоне в/б введения медгерма в дозе 0,4 мг/кг)				
1-й	34,39±1,42*	0,41±0,02*	30,31±1,55*	114,22±5,70*
3-й	32,20±0,98*	0,39±0,02*	35,2±0,70*	133,48±5,32*
5-й	28,68±1,16	0,33±0,02	45,57±2,36*	145,29±4,36
7-й	27,35±0,90	0,31±0,01	53,17±2,71	160,34±8,02
Четвёртая группа (гепатит на фоне в/б введения эссенциале® Н в дозе 5 мг/кг)				
1-й	41,5±1,10*	0,5±0,03*	29,92±1,50*	98,82±4,94*
3-й	41,02±2,12*	0,39±0,02*	31,87±1,14*	122,17±4,90*
5-й	33,75±1,76*	0,34±0,02	36,39±1,83*	124,25±3,71*
7-й	30,13±1,52	0,31±0,01	43,91±2,25*	138,49±6,89

Примечание: ТБК – тиобарбитуровая кислота; в/б – внутривенное; * $p < 0,05$ по сравнению с показателями крыс контрольной группы.

жалось к референтным значениям. Содержание восстановленного глутатиона в СК было достоверно снижено и к 5-м суткам наблюдения, а в ТП уже к 3-м суткам остро го галактозаминового гепатита приближалось к значениям контрольных животных. Уменьшение активности каталазы в СК достоверно отличалось от аналогичного показателя крыс первой группы только на 1-е сутки наблюдения, а на 5-е сутки острого гепатита активность каталазы укладывалась в референтный интервал и в ТП. Активность СОД в СК и ТП к 5-м суткам острого галактозаминового гепатита не отличалась от контрольных значений.

У крыс четвертой группы на фоне профилактически-лечебного введения эссенциале® Н снижение содержания ТБК-реактивных в СК и ТП было достоверным вплоть до 5-х суток эксперимента. Содержание восстановленного глутатиона в СК и ТП даже к 7-м суткам наблюдения оставалось достоверно меньше, чем у животных контрольной группы. Активность каталазы в СК только к 7-м суткам укладывалась в референтные границы, а в ТП — к 5-м суткам. Активность СОД в СК и на 7-е сутки всё ещё была достоверно снижена, а в ТП восстановление активности СОД наступило только на 7-е сутки острого галактозаминового гепатита (см. табл. 1, 2).

Таким образом, оценивая характер влияния координационного соединения германия с медью на состояние прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза при остром токсическом галактозаминового гепатите, необходимо отметить его способность достаточно эффективно предупреждать генерацию и накопление конечных продуктов ПОЛ, а также сохранять активность неферментативной и ферментативной частей АОС. Всё это в конечном итоге обеспечивает предупреждение нарушения функций мембран гепатоцитов, а следовательно, и уменьшение токсического влияния гепатотоксиканта на печень.

Убедительным свидетельством этого служит предупреждение образования и накопления в 1-е сутки острого галактозаминового гепатита конечных продуктов ПОЛ (ТБК-Р) у крыс третьей группы в отличие от нелеченых животных второй группы. При этом у животных, которые получали медгерм, уровень ТБК-Р был значительно меньше, чем у животных второй группы, как в СК, так и в ТП (соответственно в 2,0 и 2,6 раза). Подобная картина у крыс второй группы зарегистрирована при изучении неферментативного и ферментативного звеньев АОС. У животных, предварительно получавших медгерм, в 1-е сутки острого токсического галактозаминового гепатита

Таблица 2

Активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови (СК) и ткани печени (ТП) крыс разных опытных групп, $M \pm m$

День гепатита	Активность каталазы		Активность СОД	
	СК, кат/л	ТП, кат/г	СК, у.е.	ТП, у.е./г
Первая группа (контроль)	152,14±6,12	1065,00±14,55	63,72±5,05	0,33±0,02
Вторая группа (нелеченый гепатит)				
1-й	106,94±5,45*	731,66±36,58*	26,57±1,04*	0,17±0,01*
3-й	110,01±3,41*	836,56±33,46*	28,12±1,04*	0,16±0,01*
5-й	120,27±1,20*	881,18±26,44*	32,64±2,38*	0,20±0,01*
7-й	124,37±6,22*	938,69±46,93*	42,95±2,58*	0,27±0,01*
Третья группа (гепатит на фоне в/б введения медгерма в дозе 0,4 мг/кг)				
1-й	138,14±3,87*	837,09±41,85*	53,33±2,67*	0,27±0,01*
3-й	144,82±6,52	949,02±37,96*	56,15±2,81*	0,26±0,01*
5-й	147,71±5,61	999,72±29,99	58,48±0,64	0,30±0,02
7-й	154,03±2,93	1050,94±52,55	63,49±2,73	0,33±0,01
Четвёртая группа (гепатит на фоне в/б введения эссенциале® Н в дозе 5 мг/кг)				
1-й	112,67±5,63*	762,01±38,10*	33,56±1,68*	0,23±0,01*
3-й	114,27±5,71*	853,38±34,14*	37,73±1,89*	0,24±0,01*
5-й	121,32±6,31*	1007,06±30,21	43,43±2,17*	0,29±0,01*
7-й	136,06±6,80	1089,46±54,47	52,09±2,03*	0,30±0,01

Примечание: у.е. — условные единицы; *р < 0,05 по сравнению с показателями крыс контрольной группы.

отмечено значимое уменьшение содержания восстановленного глутатиона и активности каталазы. Однако у крыс третьей группы эти патологические изменения были значительно меньшими, чем у крыс второй группы.

Кроме этого, у животных, получавших медгерм, показатели ПОЛ и АОС быстрее восстанавливались до исходного уровня по сравнению с аналогичными показателями у нелеченых крыс второй группы.

D-галактозамин вызывает инициирование ПОЛ, что ведёт к истощению АОС клеток и нарушению функционирования плазматических, митохондриальных мембран и мембран эндоплазматического ретикулума. Полученные результаты при профилактически-лечебном применении изучаемого биологически активного вещества при остром токсическом гепатите, вызванном D-галактозамином, свидетельствуют об антиоксидантной активности медгерма и его опосредованном мембранопротективном действии.

Следует подчеркнуть, что исследуемое биологически активное вещество проявляет сходную антиоксидантную активность с препаратом сравнения — эссенциале® Н.

ВЫВОД

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в основе механизма гепатопротективного действия исследуемого германийорганического комплекса, скорее всего, лежит его способность реализовать антиоксидантные и антирадикальные свойства, предупреждая таким образом избыточный расход запасов эндогенных антиоксидантов и одновременно снижая чрезмерное образование активных форм кислорода, которые инициируют процесс перекисного окисления липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буверов А.О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени // Рос. ж. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2002. — №4. — С. 21-24.
2. Ващенко В.И., Ващенко Т.Н. Церулоплазмин — от метаболита до лекарственного средства // Психофармакол. и биол. наркол. — 2006. — Т. 6, вып. 3. — С. 1254-1269.
3. Годован В.В., Кресюн В.Й. Галактозаміновий гепатит як модель вивчення морфофункціональних порушень клітинних мембран // Одеський медичний ж. — 2005. — №3. — С. 11-15.
4. Дзюба А.Н., Сорокин Ю.Н. Лечение рассеянного склероза и динамика антиоксидантного статуса // Укр. мед. часопис. — 2008. — №1. — С. 79-82.
5. Лукевиц Э.Я., Гар Т.К., Игнатович Л.М. и др. Биологическая активность соединений германия. — Рига: Зинатне, 1990. — 191 с.
6. Мазепа А.І., Мазепа першої. В. Роль міді та цинку в розвитку патології сполучної тканини // Медична хімія. — 2002. — Т. 4, №2. — С. 71-76.
7. Оковитый С.В., Шулиени С.Н., Смирнов А.В. Клиническая фармакология антигипоксантов и антиоксидантов. — СПб.: ФАРМиндекс, 2006. — 70 с.
8. Доклинические исследования лекарственных средств. Метод рекомендации / Под ред. А.В. Стефанова. — К.: ГФЦ МЗ Украины, 2002. — 567 с.
9. Тимчишин О.Л., Кресюн В.Й., Годован В.В. і др. Гепатопротекторні властивості нової комплексної сполуки германію з купрумом (медгерму) при експериментальному токсичному гепатиті // Досягнення біології та медицини. — 2011. — №2. — С. 64-69.
10. Ушкалова Е.А. Проблемы применения гепатопротекторов // Фарматека. — 2004. — №4. — С. 45-55.
11. Юрьева Э.А., Матковская Т.А. О бисфосфонатах как о лекарственных соединениях (по материалам международного конгресса в Нидерландах, 2001) // Рос. вестн. перинатал. и педиатр. — 2001. — №3. — С. 59.
12. Glorieux F.H. Experience with bisphosphonates in osteogenesis imperfecta // Pediatrics. — 2007. — Vol. 119, N 2. — P. 163-165.
13. Lee J.H., Kim K.W., Yoon M.Y. et al. Anti-inflammatory effect of germanium-concentrated yeast against paw oedema is related to the inhibition of arachidonic acid release and prostaglandin E production in RBL 2H3 cells // Auton. Autacoid. Pharmacol. — 2005. — Vol. 25, N 4. — P. 129-134.
14. Massey P.B. Dietary supplements // Med. Clin. North Am. — 2002. — Vol. 86, N 1. — P. 127-147.