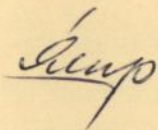


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В.ПАЛЛАДІНА



АББАС МАХДЖУБ ЯСІР

УДК 616.36.002.0089-092/9:547.557.42

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ГЕПАТОЗАХИСНОЇ ДІЇ ПОХІДНИХ
ОКСАМІНОВОЇ КИСЛОТИ ПРИ УШКОДЖЕННІ ПЕЧІНКИ
ТЕТРАЦИКЛІНОМ**

03.00.04 - Біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ-1997

544.1

ЛНБ ім. В. Стефаника



00330538 (M)

Дисертація є рукописом.

Робота виконана в Харківському інституті удосконалення лікарів МОЗ України.

Наукові керівники:

- доктор біологічних наук, професор Панченко Ніна Іванівна, завідувача кафедрою клінічної біохімії Харківського інституту удосконалення лікарів;

- доктор біологічних наук, професор Каліман Павло Авксентійович, завідуючий кафедрою біохімії Харківського державного університету.

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Божков Анатолій Іванович, завідуючий відділом молекулярної біології та біохімії онтогенезу Харківського державного університету;

доктор біологічних наук Дмитренко Микола Петрович, завідуючий біохімічною лабораторією Інституту еко-гігієни й токсикології.

Провідна установа:

Інститут фармакології та токсикології АМП України, відділ біохімічної фармакології, м.Київ.

Захист відбудеться "29" грудня 1997р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої Вченої ради Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України (252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий "29" листопада 1997р.

Вчений секретар

спеціалізованої Вченої ради

О.В. Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Серед причин смертності населення земної кулі хвороби печінки знаходяться на восьмому місці (Лопухін, Молоденков, 1978).

За останній час відзначається безперервний зріст лікарських уражень печінки. Існують дані, що майже 25% всіх випадків гострої печінкової недостатності (ГПН) обумовлені прийомом ліків (Логінов, 1985). За іншими даними, до 50% всіх хронічних активних гепатитів є не вірусними, а медикаментозними (Cooksley W.G., 1973). Виявлено більш 1000 лікарських препаратів, що здатні токсично впливати на печінку (Е. М. Тареев та співавт., 1975, Ю. И. Губский, 1989). Пошкодження тканин печінки медикаментозними засобами виникають значно частіше в старечому та похилому віці (Логінов, Lauterburg, 1985; Summer, 1981). Із всього сказаного витікає, що однією з актуальних задач, які стоять перед сучасною біологією та медициною є не тільки вивчення різних хімічних та лікарських засобів, але й цілеспрямовані пошуки нових гепатопротекторів, що мають максимальну ефективність та мінімальну токсичність.

Аналіз літератури показує, наскільки суперечні дані про ефективність гепатопротекторних засобів, більш того, в літературі нема достатніх експериментальних досліджень, які обґрунтовують диференційний прийом гепатопротекторів в залежності від провідних патогенетичних факторів (А. Д. Вовк, 1982; Т. И. Невашева та співавт., 1983; Е. А. Погорелец, 1996).

Прогрес у діагностиці та лікуванні захворювань найчастіше визначається арсеналом лікарських засобів, що використовуються, тому його поповнення та поновлення є актуальними.

Похідні оксамінової кислоти мають широкий діапазон біологічної активності (Г. П. Петюнін, 1990; 1991; Б. М. Абдулаєва, 1991). Однак в літературі ми не зустрічали даних про використання цього ряду сполучень як гепатопротекторів. Цим і визначається мета та задачі нашого дослідження.

Мета та задачі дослідження.

Метою нашого дослідження стало вивчення гепатопротекторної дії похідних оксамінової кислоти при експериментальному тетрацикліновому гепатиті (ТЦГ).

Основні задачі дослідження.

1. Оцінити функціональний стан печінки при її гострому ураженні

ІНСТИТУТ ім. В. Стефаника
АН України

тетрацикліном. З цією метою визначалось: а) в сироватці крові - активністю амінотрансфераз, лужної фосфатази, холінестерази, супероксиддисмутази, каталази, вміст малонового діальдегіду, загального білку, загального білірубіну, відновленого глутатіону, глюкози та деякі показники імунної системи; б) в гомогенаті печінки - активність супероксиддисмутази, цитохромоксидази, каталази, вміст відновленого глутатіону, малонового діальдегіду, цитохрому С, NAD^+ , концентрації іонів кальцію, меді, фосфоліпідних фракцій та процеси жовчеутворення.

2. Вивчити гепатопротекторну ефективність похідних оксамінової кислоти при гострому ураженні печінки тетрацикліном при роз'єднаному та комбінованому введенні похідних оксамінової кислоти та сілібору.

3. Порівняти ефективність похідних оксамінової кислоти та сілібору при гострому ураженні печінки тетрацикліном.

Рішення поставлених задач, на наш погляд, буде сприяти розширенню існуючих уявлень про молекулярні механізми гепатотоксичної дії різних агентів, (так як ураження печінки різної етіології характеризуються однотипністю), а також пошуку більш ефективних гепатопротекторів з урахуванням вивчених молекулярних механізмів гепатотоксичності.

Наукова новизна одержаних результатів.

1. Була досліджена гепатопротекторна дія похідних оксамінової кислоти при гострому ураженні печінки тетрацикліном.

2. Встановлено, що в механізмі гепатотоксичності тетрацикліну важну роль відіграє активація перекісного окислення ліпідів, порушення проникнення мембран гепатоцитів, порушення активності антиоксидантної системи гепатоцитів, а також пригнічення жовчеутворення, жовчевиведення та порушення функцій імунної системи.

3. Зроблено комп'ютерний прогноз біологічної активності аналогів похідних оксамінової кислоти, які вже впроваджені в медичну практику.

4. Дана порівняльна оцінка ефективності похідних оксамінової кислоти і сілібору при експериментальному тетрацикліновому гепатиті.

Практичне значення одержаних результатів.

Одержані експериментальні дані значно розширили існуючі уявлення про механізми гепатотоксичності, покликаних введенням тетрацикліну в токсичній дозі, що створює передумови для підвищення ефективності фармакотерапії за рахунок препаратів антиоксидантної, мембарностабілізуючої та анаболічної дії. Одержані дані вказують на можливість використання похідних оксамінової кислоти при ураженні

печінки різними ксенобіотиками, дякуючи широкому діапазону їх фармакологічної дії.

Апробація роботи.

Матеріали дисертації доповідались на кафедрі клінічної біохімії та судової токсикології Харківського інституту удосконалення лікарів (1996), в Харківському відділенні Українського біохімічного товариства (1997), на кафедрі біохімії Харківського державного університету (1997).

Публікації.

За темою дисертації опубліковано 3 статті.

Обсяг та структура дисертації.

Дисертацію викладено на 122 друкованих сторінках, і складається вона з вступу, огляду літератури, трьох глав власних досліджень, обговорення одержаних результатів, заключення, висновків та списку літератури. Робота ілюстрована 11 таблицями і 11 малюнками. Список літератури містить 269 джерел.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал та методи дослідження.

Для рішення поставленої мети та задач нами проведені експерименти на дорослих білих щурах за методикою Н. П. Скакуна та О. Н. Олійника (1967). Вибір цього виду тварин обумовлено однотипністю характеру ураження печінки у них і у людини за даними біохімічних, функціональних та морфологічних відхилень.

Використано 360 шурів-самців масою тіла 180-220 г та 46 білих мишей масою 18,0-22,0 г. Під час всіх експериментів вони перебували в одному і тому ж приміщенні при постійній температурі (22-25°C) та на стандартному раціоні віварію.

На першому етапі дослідження були визначені: гостра токсичність, жовчегонна, мембранозахисна та антиоксидантна активність (Абдулаєва, 1991). Визначення гострої токсичності проводили за методом Т. В. Пастушенко та співавт. Для цього використовували 46 мишей масою 18-20 г. Встановлено, що LD_{50} для речовини БС-37=8100 мг/кг, БС-50+7600 мг/кг, БС-49=9000 мг/кг, ED_{50} =25 мг/кг.

Експериментальний тетрацикліновий гепатит (ТЦГ) викликали шляхом інтрагастрального введення тетрацикліну із розрахунку 500 мг/кг

маси на 1% крохмальному клейстері на протязі 5 діб. Саме в такій дозі тетрациклін, внаслідок прямої гепатотоксичної дії, викликає гепатит (Н. Ю. Баган, 1990),

В першій серії досліджень були використані 6 груп тварин. 1-тварини інтактної груп, які одержували 1% розчин крохмального клейстеру. 2 - тварини з тетрацикліновим гепатитом. Решта 4 група - це тварини, що лікувались Д(+)-глюкозамонієвою сіллю оксаліламіноуксусної кислоти (умовно назване БС-37), 2-Д(+)-глюкозіламонієвою сіллю оксалілглутамінової кислоти (умовно назване БС-49), 2-Д(+)-глюкозілоксаліл-L-аспарагіновою кислотою (умовно назване БС-50) та сілібором (як препарат для порівняння). В другій серії досліджень вивчено 8 груп тварин з комбінованим використанням препаратів, що вивчались. Всі ці препарати вводили в лікувально-профілактичному режимі в дозах ЕД50=25 мг/кг (за 1 годину і через 2 години після введення тетрацикліну). Через 48 годин після введення останньої дози тетрацикліну в сироватці крові та гомогенаті печінки були визначені такі показники: в сироватці крові АсАт, АлАт, ЛФ, холінестераза (ХЕ) уніфікованим методом (В. В. Меньшиков, 1987), активність каталази за Бахом, супероксиддисмутаза (СОД) за Ерсоду (1977) за методиками, що пропонуються до наборів реактивів "Labsystem". Вимірювання проводились спектрофотометрично на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі FP-901 фірми "Labsystem". Загальний білок за методом Lowry (1987) глюкозу - оксиредуктазним методом, загальний білірубін в сироватці крові методом за В. В. Меньшиковим (1987); рівень відновленого глутатіону за Кочетковим (1987), МДА за Т. Г. Гаришвили (1977).

Для поглибленого вивчення механізмів гепатозахисної дії похідних оксамінової кислоти в мікросомальній фракції гомогенату печінки були визначені МДА, СОД, каталаза, відновлений глутатіон (вищевказаними методами). Концентрації Са та Си в гомогенаті печінки визначали з комплексоутворювачами уніфікованим методом (В. В. Меньшиков, 1987) за методиками "Labsystem" в суспензії мітохондрій були визначені: цитохром С (за методом Джорженеску та Пеупеску, 1977), активність цитохром-с-оксидази (ЦХО) (за Р. С. Кривченковим, 1977), вміст НАД (за Кочетковим, 1987).

Для оцінки мембранопротекторної дії похідних оксамінової кислоти (БС-49, БС-37, БС-50) в мікросомальній фракції гомогената печінки визначали склад ФЛ. Екстракцію і визначення ФЛ проводили (за Бериджем, 1990), а розділення на фракції на пластинках "Silufol" (за Флиделія, 1990). Жовчегонну активність вивчали за методом Н.П. Скакун,

1982; холестерин по Ильку, 1988.

Для оцінки імуномодулюючої дії похідних оксамінової кислоти вивчалися реакції спонтанного розеткоутворення, рівень ЦИК та загального комплементу в сироватці крові тварин по уніфікованим методикам (В. В. Меньшиков, 1987).

Одержані дані в подальшому оброблювались статистично, достовірність різниць середніх значень по Критерію Стюдента, а кореляційний аналіз за методикою, що описана Івановим Ю.П. та співавт., 1990. Для розразунку використована програма Excel 7,0 з пакета Microsoft office 95 на персональному комп'ютері IBM PC AT Pentium-100.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз результатів наших досліджень показав (табл. 1), що гостре ураження печінки, яке викликане введенням тетрацикліну на протязі 5 діб супроводжується глибоким порушенням функції гепатоцитів. Вони проявляються у вигляді посилення процесів ліпопероксидації, порушення антиоксидантної системи гепатоцитів, зниження кількості ФЛ, пригнічення білокутворюючої та жовчеутворюючої функції печінки, солюбілізації ряду ферментів (амінотрансфераз, лужної фосфатази) та пригнічення дихального ланцюга та імунної системи.

Встановлено, що в патогенезі уражень печінки, що викликані використанням тетрацикліну (ТЦ), провідну роль відіграє посилення процесів ліпопероксидації (Н.П. Скаун, 1982).

Найбільш вірогідний механізм гепатотоксичної дії тетрацикліну пов'язаний з тим, що тетрациклін та проміжні продукти, що утворюються в ході його біотрансформації, є високотоксичними сполученнями, що викликають зниження активності ферментів антиоксидантного захисту та виснаження рівня відновленого глутатіону. Зниження активності антиоксидантних систем (АОС), в свою чергу, викликає активацію ПОЛ, внаслідок чого підвищується вміст кінцевого продукту ПОЛ МДА. З іншого боку, підвищення показників АОС в сироватці крові, на наш погляд, можливо пояснити виходом в кров СОД, каталази, відновленого глутатіону внаслідок окислювального ушкодження гепатоцитів та інших клітин периферичних тканин, а з другого боку, компенсаторною активацією системи антиоксидантного захисту (П.В. Деримедведь, 1996). На наш погляд, пригнічення жовчевиділяючої функції печінки при її ураженні тетрацикліном, яке проявляється в зниженні швидкості секреції жовчі, порушенні синтезу та секреції холатів, є наслідком блокування тиолових ферментів, в тому числі Na^+ та K^+ -АТФаз, які відіграють важливу роль в жовчеутворенні (Н.П. Скаун,

1987; С.Д.Подимова, 1993). Паралельно відбувається процес порушення синтезу білків (за критерієм загальний білок та холінестераза) та фосфоліпідів в гепатоцитах. Пригнічення синтезу білку в гепатоцитах тетрацикліном здійснюється за рахунок взаємодії його з комплексом рибосом-інформаційна ДНК (Н.И.Белоусов, 1980). На наш погляд, гостре ураження печінки тетрацикліном може супроводжуватись зміною фізико-хімічних властивостей білків й ліпідів, які приймають участь в закріпленні рибосом та виникненні каналів, через які проходить поліпептидний ланцюг, що синтезується. Тетрациклін має властивість взаємодіяти з Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , дякуючи наявності великої кількості функціональних груп в його структурі. Це може привести до інактивації ферментів, які приймають участь в синтезі білків (Єгоров та співавт., 1978; А.И.Потапович та співавт., 1988). На наш погляд, підвищення активності АсАт, АлАт та ЛФ в сироватці крові свідчить про порушення цілісності клітинних мембран гепатоцитів, що пов'язано з порушенням ліпідних та білок-ліпідних взаємовідносин в мембранних структурах гепатоцитів, що є наслідком впливу гепатоцитів на стан мембранних фосфоліпідів (Е.М.Крепс, Ю 1982; С.Н.Голиков, 1986; М.В.Біленко, 1980). Зниження кількості АсАт та АлАт в гепатоцитах за рахунок виходу в кров в результаті їх ушкодження тетрацикліном приводить до порушення взаємозв'язку між обміном амінокислот, ліпідів, вуглеводів та забезпечення циклу сечовини аспаратом, так як АсАт та АлАт відіграють ключову роль в проміжному метаболізмі, що забезпечує синтез та руйнування амінокислот. Нестача проміжних продуктів (α -кетокислот та амінокислот) для ЦТК приводить до енергодефіциту в клітині. Це тягне за собою накопичення недоокислених продуктів обміну жирів та вуглеводів (аміак, молочна кислота, ацил-КоА, ацилкарнітин та ін.) Ці продукти самі по собі є високотоксичними сполученнями (М.В.Біленко, 1989).

Виявлене нами зниження активності ЦХО, а також концентрації цитохрома С и НАД+ у печенці при тетрацикліновому гепатиті (табл. 1, рис. 4), мабуть було наслідком як слідство накопичення в мітохондріях тетрацикліна та його проміжних продуктів, що спостерічалось іншими дослідниками в гепатоцитах (Ратиксі, 1984). Нами також було доведено, що гостре ураження печінки тетрацикліном приводить до пригнічення синтезу фосфоліпідних фракцій в гепатоцитах (табл. 1). Ми міркуємо, що однією з головних причин, що дестабілізують мітохондріальні структури гепатоцитів тетрацикліном, є його здатність активувати ПОЛ і пригнічувати синтез ФЛ в тканині печінки, останні становлять 90% від всіх ліпідів мітохондрій та є обов'язковим компонентом багатьох

ферментів дихального ланцюга: ЦХО, сукцинат-с-оксидредуктази, НАДН, цитохром-с-оксидредуктази та ін. (М.Е.Прохорова, 1982). Пригнічення цих ферментів викликає енергодефіцит в клітинах печінки, тому що знижується утворення АТФ в мітохондріях внаслідок їх ушкодження тетрацикліном, що є згубним для клітини.

На наш погляд, доказом ушкодження мембран мітохондрій та мембран саркоплазматичного ретикулулу тетрацикліном є помітне збільшення концентрації Са в гомогенаті печінки (табл. 1), так як мітохондрії та саркоплазматичний ретикулум депонують близько 98% загального вмісту Са в клітині (С.Н.Орлов, 1984). Вихід іонів Ca^{2+} в гіалоплазму тягне за собою активацію фосфоліпази A_2 , в результаті чого відбувається порушення складу клітини мембран за рахунок відщеплення ФЛ (А.Ф.Блюгер та співавт., 1981; М.В.Біленко, 1989). Під впливом токсичних доз тетрацикліну відбувається збільшення вмісту лізо-ФЛ в мікосомальних фракціях гепатоцитів (табл. 1), які мають токсичну дію, що найбільш різко проявляється в плазматичній мембрані, інгібуючи Na^+ , K^+ -АТФазу та аденілицклазу (S.N.Karli, 1979). Накопичення тетрацикліну привело до розладу жовчечутворюючої вальної функції печінки, що є характерною прикметою внутрішньопечінкового холестази (А.Ф.Влугар, 1982; С.Д.Подимова, 1993). Тому при ураженні печінки тетрацикліном можливо думати, що поряд з іншими проявами, розвивається внутрішньопечінковий холестаз, який негативно впливає на процеси метаболізму в тканинах печінки, що призводить до дистрофічних та некротичних змін та виникнення гепатита.

Нами було показано, що введення ТЦ в токсичній дозі привело до сутєвих змін у імунній системі: підвищена активність загального комплемента, а також оба показника циркулюючих імунних комплексів (низько- та високомолекулярних сполук), знижена концентрація Т-лімфоцитів у порівнянні з інтактними тваринами.

Таким чином, заключною стадією цих серйозних порушень, які викликані введенням тетрацикліну в токсичній дозі, є ушкодження клітин печінки.

Введення тваринам похідних оксамінової кислоти (БС-49, БС-50, БС-37) та сілбору в лікувально-профілактичному режимі за 1 годину та через 2 години після введення тетрацикліну в токсичній дозі приводить до менш значних змін з боку показників функціонально-біохімічного стану печінки (рис. 1-5).

Таблиця 1 – Зміна біохімічних показників в сироватці крові та печінки при експериментальному тетрацикліновому гепатиті (M±m)

Функціонально-біохімічні показники	Умови досліджень	
	Інтактні тварини	Тварини з тетрацикліновим гепатитом
Малоновий діальдегід (нмоль/г)	0,83±0,01	3,56±0,4*
Супероксиддисмутаза ммоль/ч мг б.	3,0±0,3	1,38±0,3*
Каталаза ммоль/ч мг б.	10,5±1,4	6,1±1,7*
Відновлений глутатіон мкмоль/г	6,06±0,78	2,5±0,41*
Малоновий діальдегід мкмоль/л	2,7±0,12	6,9±0,34*
Супероксиддисмутаза мккат/л	0,36±0,08	0,56±0,03*
Каталаза мккат/л	2,7±0,1	4,2±0,7*
Відновлений глутатіон мкмоль/л	0,86±0,06	1,96±0,4*
Аланінамінотрансфераза мккат/л	0,61±0,04	1,75±0,15*
Аспартатамінотрансфераза мккат/л	0,95±0,02	2,66±0,91*
Лужна фосфатаза мккат/л	6,36±0,44	9,08±0,58*
Холінестераза ммоль/с.л	65,3±4,57	46,8±3,5*
Білок г/л	77,47	47,22±3,0*
Глюкоза ммоль/л	5,66±0,48	5,35±0,8
Білірубін (загальний) мкмоль/л	9,16±0,64	12,15±0,7*
Фосфатиділінозитол мкг/мг б	21,7±2,14	11,2±1,17
Фосфатиділсерін мкг/мг б.	15,7±1,44	10,0±1,05*
Фосфатиділхолін мкг/мг б	144,31±12,3	91,6±8,2*
Лізофосфатиділхолін мкг/мг б.	6,6±0,6	12,5±1,12*
Цитохром С нмоль/мг б.	21,4±0,72	18,9±0,21*
НАД нмоль/мг б.	84,6±0,1	63,2±0,3*
Цитохромоксидаза ммоль/ч мг б.	148,8±9,7	101,1±4,8*
Са мкмоль/г	2,3±0,02	5,6±0,12*
Си мкмоль/г	1,5±0,13	0,5±0,04*
Жовчні кислоти ммоль/л	637,8±34,2	555,15±9,3*
Холестерин ммоль/л	19,0±3,3	29,67±0,73*
Холатохолестериновий коеф.	34,7±4,28	18,64±1,6*
Швидкість серкреції жовчі мг/хвил/100 г маси тіла	5,8±0,53	2,5±0,36*

Примітка: * – достовірні різниці в порівнянні з тваринами інтактною групи (P≤0,05)

Так, препарати БС-49, БС-59, БС-37 та сілібор не тільки не обмежували процеси ПОЛ (які понижують концентрацію МДА в гомогенатах), але і стимулювали АОС гепатоцитів (підвищення активності СОД, каталази та підвищення рівня відновленого глутатіону) в порівнянні з нелікованими тваринами (тварини з тетрацикліновим гепатитом). Ми міркуємо, що антиоксидантні властивості, похідних оксамінової кислоти, що вивчаються, пов'язані, з тим, що в їх склад входять амінокислоти та глюкозоподібні залишки. Раніш доведено, що ліки, які створені на основі глюкозаміну, володіють вираженою біологічною активністю (Paolo Senin, 1983; И. А. Зупанец, 1990; С.И.Сальникова, 1993; С.М.Дроговоз, 1988). На наш погляд, найбільш виявлена антиоксидантна активність препарату БС-49, яка не поступається сілібору (по МДА та СОД), пов'язана саме з тим, що в його склад входить залишок глутамінової кислоти, яка відіграє важливу роль в знешкодженні таких високотоксичних речовин, як аміак та енергозабезпечення клітин. Велике значення глутамінової кислоти, як одного з важливих компонентів антиоксидантної системи клітин, що перешкоджує індукції окислення ліпідів біомембран (В.И. Западнюк, 1982), доречі, накопичення проміжних продуктів біотрансформації отетрацикліну, продуктів ПОЛ, аміаку та інші, що відіграє безпосередню роль в ушкодженні тканини печінки, безсумнівно будуть негативно впливати на функцію ЦНС, що в більшому ступені посилює перебіг токсичного гепатиту. Оскільки вона є єдиною амінокислотою, що окислюється в тканинах головного мозку, оглутамінова кислота служить енергетичним джерелом для діяльності нейронів. На наш погляд, цими властивостями глутамінової кислоти пояснюється і сприятлива дія БС-49 при тетрацикліновому гепатиті.

Введення речовин, що вивчаються, з групи похідних оксамінової кислоти та сілібору звело до зменшення інтенсивності процесів перекісного окислення ліпідів (по критерію МДА) та оказало позитивний вплив на антиоксидантний гомеостаз - максимальна ступінь зниження рівня МДА в сироватці крові відзначалась при введенні БС-37. Нормалізація рівня відновленого глутатіону (ВГ) в сироватці крові спостерігається при використанні всіх досліджених препаратів в порівнянні з нелікованими тваринами. Слід підкреслити, що рослинні біофлавоноїди, до яких відноситься сілібор, є складними елементами препаратів, що використовуються в якості антиоксидантів (О.Н.Воскресенский, 1982; Н.П. Скакун та співавт., 1985). Але сілібор менш за всіх препаратів понизив рівень МДА в крові. Активність СОД під впливом сілібору була нижче, ніж у інтактних тварин (рис. 1).



Рисунок 1. Показники ПОЛ та активності антиоксидантного захисту в гомогенаті печінки експериментальних тварин

* – достовірні різниці в порівнянні з інтактними тваринами ($P \leq 0,05$)

** – достовірні різниці в порівнянні з нелікованими тваринами ($P \leq 0,05$)

Виходячи з отриманих даних, можна зробити висновок про те, що всі ці препарати мали більш виражений вплив на антиоксидантний статус та процеси ліпопероксидації, ніж сілбор. На наш погляд, про мембранопротекторну дію препаратів оксамінової кислоти, що вивчали, та сілбору свідчить їх здатність регулювати фосфоліпідні фракції в гомогенатах печінки та знижувати активність АсАт, АлАт та Лф в сироватці крові в порівнянні з нелікованими тваринами. Так, введення препарату БС-50 супроводжувалось вирівнюванням всіх фосфоліпідних фракцій, крім лизоФХ, який залишився на високому рівні. Препарат БС-37 привів до вирівнювання рівня фосфатидилінозитола (ФІ) та фосфатидилхоліна (ФХ). БС-49 підвищував ФІ та знижував рівень лізоФХ. Введення сілбору привело до нормалізації тільки рівня ФІ, та деякого підвищення ФС та ФХ (рис. 2).

В склад всіх похідних оксамінової кислоти, що вивчаються, входить глюкозоподібний фрагмент. Як один з головних компонентів клітини мембран, він ймовірно сприяє динамічному відновленню ушкоджених тетрацикліном структур гепатоцитів, що тягне за собою зниження активності АсАт, АлАт та ЛФ в сироватці крові при лікуванні цими препаратами (рис. 3). Ми міркуємо, що механізм гепатопротекторної дії БС-50, обумовлен тим, що в склад якого крім глюкозаміна входить залишок аспарагінової кислоти, яка здатна посилювати утворення



Рисунок 2. Вміст деяких фракцій фосфоліпідів в мембранах мікросом гепатоцитів у експериментальних тварин.

* – достовірні різниці в порівнянні з інтактними тваринами ($P \leq 0,05$)

** – достовірні різниці в порівнянні з нелікованими тваринами ($P \leq 0,05$)

ФЕД/10 – узятя величина показника, що ділиться на 10 для більш зручного розміщення на діаграмі.

сечовини та стимулювати ЦТК Аспарагінова кислота перетворюється в метіонін, що також характерно для глютамінової кислоти (Я.Мусил та ін., 1981). Дезінтоксикаційна здатність метіоніну широко відома.

Ми міркуємо, що гепатозахистна дія БС-37 може доповнюватися і залишком оцтової кислоти, що входить до його складу шляхом стимулювання ЦТК через щавелевооцтову кислоту. З іншого боку, глютамінова кислота (залишок БС-49) займає місце на стику пластичного та енергетичного обміну, що дозволяє їй при змінах функціонального стану тканин вступати в ті чи інші метаболічні перетворення (М.С.Волкова та співавт., 1986). Ця кислота може впливати на обмін речовин, функцію органів та систем не тільки безпосередньо (включаючись в тканинний обмін), але й опосередкована через зміну функціонального стану нервової та ендокринної систем (В.И.Западнюк, 1982). Цим пояснюється здатність наших препаратів мати позитивний вплив на всі боки обміну речовин, особливо при патологічних станах організму.

Отримані нами дані показують, що при введенні тваринам з тетрацикліновим гепатитом наших препаратів, останні обмежують



Рисунок 3. Зміна активності АсАТ, АлАТ, ЛФ при введенні похідних оксамінової кислоти та сілібору при експериментальному ТЦГ (n=8).

* – достовірні різниці в порівнянні з інтактними тваринами

** – достовірні різниці в порівнянні з нелікованими тваринами

активність процесів ПОЛ (рис. 1) та регулюють вміст фосфоліпідних фракцій (рис. 2). Це приводить до відновлення цільності мембран гепатоцитів, можливо за рахунок глюкозаміна, що може створити кращі умови для нормалізації обмінних процесів в гепатоцитах і тим самим збільшити їх регенеративний потенціал. Останє підтверджується підвищенням загального білку та активності холінестерази, а також зниженням загального білірубіну в сироватці крові та нормалізацією показників дихального ланцюга в мітохондріях (цитохромоксидаза, цитохром С та НАД+) (рис. 4).

Глюкозамін, який входить до складу вивчених препаратів, при токсичному ураженні печінки проявляє антикатаболічну дію та можливість знижувати рівень вільних амінокислот в крові, що вказує на стимуляцію синтезу білку (рис. 5) (С.Н.Сальникова, 1993; І.А.Зупанец, 1996).

На наш погляд, нормалізація цими препаратами активності показників дихального ланцюга пов'язана перш за все з нормалізацією ПОЛ в гомогенатах печінки (рис. 1). Підвищення концентрації ФЛ в печінці не могло не відбитися на стабілізації структури мітохондрій, та, як наслідок на підвищенні активності показників дихального ланцюга.

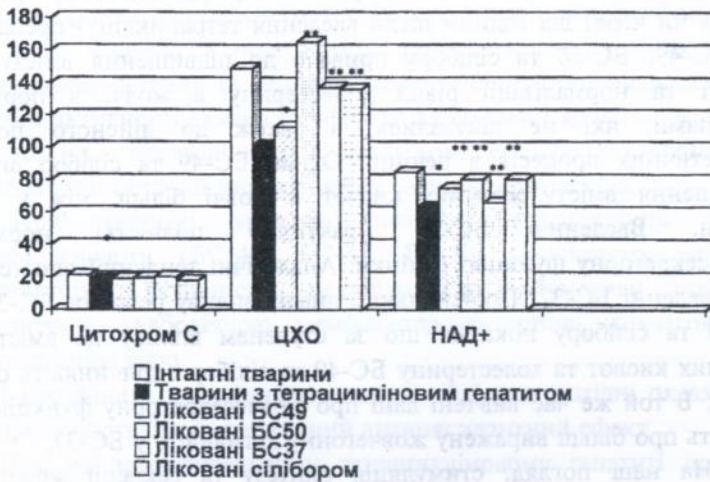


Рисунок 4 - Вплив похідних оксамінової кислоти на деякі показники дихального ланцюга мітохондрій в умовах модельного тетрациклінового гепатиту у щурів в порівнянні з сілібором



Рисунок 5. Вміст білку та активність холінестерази в сироватці крові тварин контрольних груп та тварин лікованих похідними оксамінової кислоти та сілібором при експериментальному ТЦГ (n=6-8).

* – достовірні різниці в порівнянні з інтактними тваринами

** – достовірні різниці в порівнянні з нелікованими тваринами

Введення тваринам в лікувально-профілактичному режимі (за годину чи через дві години після введення тетрацикліну) препаратів БС-37, БС-49, БС-50 та сілібору привело до підвищення вмісту жовчних кислот та нормалізації рівня холестерину в жовчі в порівнянні з тваринами, які не лікувались, а також до дійсного поліпшення холеретичних процесів в печінці. Однак БС-49 та сілібор викликають підвищення вмісту жовчних кислот в жовчі більш, ніж у інтактних тварин. Введення БС-50 практично повністю нормалізувало жовчесекреторну функцію печінки. Аналогічні тенденції спостерігались і при введенні БС-37. Порівняльний аналіз впливу речовин БС-37, БС-49, БС-50 та сілібору показав, що за ступенем впливу на вміст в жовчі жовчних кислот та холестерину БС-49 та сілібор спричиняють однаковий вплив. В той же час вивчені дані про жовчесекреторну функцію печінки свідчать про більш виражену жовчегонну активність у БС-37.

На наш погляд, стимуляція синтезу та секреції жовчі нашими препаратами пов'язана, скоріш за все, з підвищенням регенеративного потенціалу гепатоцитів. З іншого боку, амінокислоти та глюкозаміні залишки, які входять у склад цих препаратів, коли приймають участь в синтезі білків, приводять до активування специфічних ферментів жовчеутворення: Mg^{+2} -АТФази, Na^{+} , K^{+} -АТФази та 7α -холестерингідроксилази та ін.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що обрані нами сполуки БС-49, БС-50, БС-37 мають виразні гепатопротекторні властивості, які за багатьма показниками не поступаються сілібору. При цьому найбільш виражена гепатопротекторна дія відзначалась в основному при поодинокому введенні препаратів оксамінової кислоти в порівнянні з їх комбінацією. Ми звернули увагу на факт найбільш вираженого гепатопротекторного впливу при тетрацикліновому гепатиті комбінації сілібору з одним із препаратів, що вивчаювся, а саме БС-49. На наш погляд, використання даних препаратів разом з медикаментозними засобами, які відзначаються гепатотоксичністю, в значній мірі забезпечить попередження пошкоджуючої їх дії на печінку, а у випадку розвитку ураження печінки вони будуть сприяти більш швидкому відновленню її функціонально-біохімічного стану, оскільки в склад цих препаратів входять натуральні сполуки які "впізнаються" організмом.

ВИСНОВКИ

1. Ураження печінки, що викликано токсичними дозами тетрацикліну, характеризується посиленням ПОЛ, пригніченням

антиоксидантної системи гепатоцитів - інактивацією СОД та виснаженням фонду відновленого глутатіону, зниженням фосфоліпідних фракцій (крім лізоФХ) в гепатоцитах, пригніченням білкоутворюючої функції печінки, синтезу та секреції жовчі, гіпераміноотрансфераземією, збільшенням активності лужної фосфатази в сироватці крові, порушенням імунної системи - активацією загального комплекменту, Т-лімфоцитів та збільшенням концентрації циркулюючих імунних комплексів.

2. При гострому ураженні печінки тетрацикліном похідні оксамінової кислоти (БС-49, БС-37, БС-50) проявляють виражену гепатопротекторну активність, механізм якої обумовлен помітною антиоксидантною, анаболічною, мембранопротекторною, жовчегонною та імуномодулюючою дією.

3. В порівнянні з гепатопротектором сілібором похідні оксамінової кислоти проявляють більш виражений антиоксидантний ефект.

4. При експериментальному тетрацикліновому гепатиті препарат БС-37 здійснює виражену імуномодулюючу та стимулюючу жовчечутворювальну функцією, не поступаючись сілібору.

5. Результати проведених досліджень розширюють уявлення про механізми гепатотоксичної дії тетрацикліну та служать експериментальним обґрунтуванням при представленні матеріалів по використанню похідних оксамінової кислоти (БС-37, БС-50, БС-49) в ФК МОЗ України з метою дозволу першої фази клінічних випробувань цих засобів як гепатопротекторів.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Аббас М. Я. Изучение влияния производных оксаминовой кислоты на процессы липопероксидации при модельном гепатите // Вестник проблем биологии и медицины. - 1996. - N12. - С.35-41.

2. Аббас М. Я. Изучение влияния некоторых производных оксаминовой кислоты на холато- и холестеринсинтетическую функцию печени у белых крыс в условиях тетрациклинового гепатита // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - N11. - С.32-37.

3. Аббас М. Я. Активность некоторых ферментов при введении производных оксаминовой кислоты при экспериментальном тетрациклиновом гепатите // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - N14. - С.90-93.

Аббас Махджуб Ясир. Біохімічні механізми гепатозахисної дії похідних оксамінової кислоти при ушкодженні печінки тетрацикліном. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - Біохімія. - Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ, 1997.

Метою цього дослідження було вивчення біохімічних ефектів похідних оксамінової кислоти на моделі тетрациклінового гепатиту. Вибір об'єкту дослідження був обумовлений тим, що похідні оксамінової кислоти мають широкий спектр фармакологічної активності.

В експерименті на 360 щурах (масою 180-200 г) було продемонстровано, що введення тетрацикліну перорально в токсичній дозі (500 мг/кг) протягом 5 діб достовірно порушувало функцію печінки (підвищення малонового діальдегіду, аспартату амінотрансферази, аланінамінотрансферази в сироватці крові, пригнічення системи синтезу жовчі, дестабілізація структур гепатоцитів та ін.) Були використані такі похідні оксамінової кислоти (25 мг/кг): 2-D (+)-глюкозамонієва сіль амінооцтової кислоти (умовно назване БС-37), 2-D-(+)-глюкозиласамойл-L-аспарагінової кислоти (умовно назване БС-50) та 2-D-(+) глюкозиламонієва сіль аксалилглутаминової кислоти (умовно назване БС-49).

При аналізі результатів дослідження ми прийшли до наступного: гепатотоксичний ефект тетрацикліну частково викликаний його метаболітами та збільшенням процесів пероксидації ліпідів (ПОЛ).

У похідних оксамінової кислоти доведено наявність гепатопротекторного ефекту. Це може бути обумовлено тим, що в їх состав входять високоактивні природні сполуки: глюкозамин, глютамінова кислота, аспарагінова кислота.

Ключові слова: гепатит, тетрациклін, перекисне окислення ліпідів, похідні оксамінової кислоти, гепатопротектор.

Аббас Махджуб Ясир. Биохимические механизмы гепатозащитного действия производных оксаминовой кислоты при повреждении печени тетрациклином. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - Биохимия. - Институт биохимии им. А.В.Палладина, Киев, 1997.

Целью настоящего исследования было изучение биологических эффектов производных оксаминовой кислоты на модели тетрациклинового гепатита. Выбор объекта исследования был обусловлен

тем, что производные оксаминовой кислоты обладают широким спектром фармакологической активности.

В эксперименте на 360 крысах (массой 180-200 г) было продемонстрировано, что введение тетрациклина перорально в токсической дозе (500 мг/кг) в течение 5 дней достоверно нарушало функцию печени (повышение содержания малонового диальдегида, активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови, угнетение системы синтеза желчи, дестабилизация структур гепатоцитов и др.) Были использованы следующие (25 мг/кг): 2-D(+) глюкозаминовая соль аминокислотной кислоты (условно названное BC-37), 2-D-(+)-глюкозилоксамоил-L-аспарагиновой кислоты (условно названное BC-50), 2-D-(+) глюкозиламониевая соль оксалилглутаминовой кислоты (условно названное BC-49).

При анализе результатов исследования мы пришли к следующему выводу: гепатотоксичный эффект тетрациклина может быть частично вызван его метаболитами и увеличением процессов перекисидации липидов (ПОЛ).

У производных оксаминовой кислоты доказано наличие гепатопротекторного эффекта. Это может быть связано с тем, что в их состав входят высокоактивные природные соединения: глюкозамин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота.

Ключевые слова: гепатит, тетрациклин, перекисное окисление липидов, производные оксаминовой кислоты, гепатопротектор.

Abbas M. Y. The biochemical mechanism Hepatoprotective properties of the derivatives of Oxamic Acid in liver injured by tetra cycline. - Manuscript.

Thesis for PhD degree by speciality 03.0004 biochemistry-A.V. Palladin institute of Nation Acaademy of Science of Ukraine, Kyiv, 1997.

The aim of this dissertation is to study the effect of the derivatives of Oxamic Acid on the model of tetracycline hepatit. The selection of the object at the research was chosen, because the derivatives of Oxamic Acid have a wide specter of phatmacological activities.

It has been demonstrated in experiments on 360 rats (180-220 g) that liver injury induced by tetracycline, which was administrated peroral in a toxic dose (500 mg/kg) for five days, clearly disorder the function of liver (sncreasing MDA, AST, ALT in the serum, inhebiting the senthesis of the bile destabilizing the structure of hepatocytes e.t.c).

The derivatives of Oxamic Acid were used in our experiments (25 mg/kg) were the following: 2-D (+)-glucosaminooxamsic acid (conditionally called BC-37), 2-D-(+)-glucosoxamoil-L-aspartic acid (conditionally called BC-50) and 2-D-(+) glucosalamone salt oxalilglutamine acid (BC-49).

Analyzing the results of our research we come to the following: it is concluded that part of hepatotoxic effects of tetracycline may be produce by his metabolites and by increasing lipid peroxidation (LPO).

The derivatives of Oxamic Acid showed a clear hepatoprotective effects. This is may be due to the natural composition of Oxamic Acid (glucosamine,glutamic acid,aspartic acid).

Key words: hepatit, tetracycline, lipid peroxidation, derivatives of Oxamic Acid, hepatoprotector.

Підписано до друку 28.11.97р. Формат 60х90/16.
Ум. друк. арк. 1.0, Обл.-вид. арк. 0,8.
Наклад 100. Зам. 320.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

Ab 39.108

AB 39.108