

Г. М. Шаяхметова, О. В. Карпова, А. К. Вороніна, М. Я. Головенко
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ, КИЇВ

ГЕПАТОЗАХИСНА ДІЯ МЕТАДОКСИНУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АЛКОГОЛЬНОМУ ГЕПАТИТІ В ЩУРІВ

Відтворено модель алкогольного гепатиту шляхом внутрішньошлункового введення 40 % розчину етанолу в дозі 7 мл/кг маси тіла щурів лінії Вістар протягом 7 днів. Як біохімічні маркери крові тварин було використано показники загального білка, загального білірубіну, загального холестерину, тригліцеридів, глюкози, креатиніну, сечовини та церулоплазміну. Показано, що метадоксин (іонна сіль піридоксину та піроглутамінової кислоти) в дозі 90 мг/кг стабілізував тільки вміст загального білка, загального білірубіну, тригліцеридів, креатиніну, сечовини і церулоплазміну, що свідчить про різні механізми виникнення алкогольного гепатиту та його перебігу. Передбачається, що гепатозахисна дія препарату опосередкована антиоксидантними та антистеатозними механізмами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: метадоксин, алкогольний гепатит, гепатопротектор.

ВСТУП. Проблема лікування гепатитів різної етіології є надзвичайно актуальною. Незважаючи на великий арсенал гепатопротекторів, клініцистам незавжди вдається домогтися стабілізації перебігу гепатиту, підвищення регенераторної активності та запобігти розвитку фіброзу і цирозу печінки. Особливе місце серед цієї патології займає алкогольний гепатит (АГ), який розвивається не відразу, а при регулярному прийманні критичних доз етанолу [1, 2]. У зв'язку з цим, тривають пошуки нових лікарських агентів, які мають широкий спектр фармакологічної активності та економічну доступність. Об'єктом нашої уваги тривалий час є комбінація двох складових – метадоксин. З хімічної точки зору, метадоксин – іонна сіль піридоксину (одна з форм вітаміну В₆) та піроглутамінової кислоти (піридоксин-піролідон карбоксилат) (рис.). Іонний характер цієї сполуки передбачає її дисоціацію у водному середовищі та реалізацію фармакологічної дії окремих компонентів препарату.

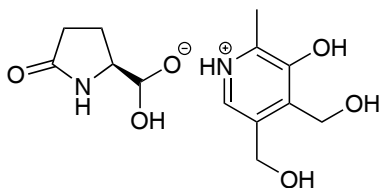


Рис. Структурна формула метадоксину.

© Г. М. Шаяхметова, О. В. Карпова, А. К. Вороніна, М. Я. Головенко, 2015.

Метадоксин є діючою речовиною препарату “Метадоксил” виробництва “Лабораторі Балдачі С.п.А.” (Італія). Його генеричний аналог “Алкодез® ІС” виробляють в Україні. Фармакологічна дія метадоксину зумовлена дезінтоксикаційними та цитопротекторними ефектами. Дезінтоксикаційна дія визначається активацією ферментів печінки, що беруть участь у метаболізмі етанолу, прискорюючи процес його виведення з організму. Цитопротекторна (гепатопротекторна) дія метадоксину зумовлена мембраностабілізуючим ефектом і ґрунтується на здатності відновлювати співвідношення насичених і ненасичених вільних жирних кислот. У результаті цього підвищується стійкість гепатоцитів до дії продуктів перекисного окиснення ліпідів, вміст яких збільшується при впливі різних токсичних агентів [3, 4]. Піридоксин виконує також важливу функцію в процесі метаболізму амінокислот, вуглеводів, сфінголіпідів і гемоглобіну [5, 6].

Для подальшого уточнення та розширення фармакологічного спектра дії даного агента було вивчено вплив препарату на біохімічні показники крові щурів при хронічному токсичному ураженні етанолом, що і стало метою цієї роботи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експеримент виконано на білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар з початковою масою 180–200 г, отриманих з віварію Інституту фармакології і токсикології НАМН України, які перебували в

стандартних умовах на звичайному харчовому і водному раціоні. Маніпуляції з тваринами проводили 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 7 днів [7]. Метадоксин вводили в профілактичному режимі внутрішньошлунково в цей же період щоразу за 30 хв до введення алкоголю. Дозу тест-зразка (90 мг/кг) було обрано відповідно до інструкції щодо медичного застосування лікарського засобу та з урахуванням коефіцієнта видової чутливості [8]. Для введення тест-зразок розчиняли в дистильованій воді. Кожного дня готували свіжі порції розчину.

Тварин було поділено на три групи по шість особин у кожній: 1-ша – інтактні тварини; 2-га – модель алкогольного гепатиту; 3-тя – модель алкогольного гепатиту+метадоксин. Через 24 год після останнього введення алкоголю і нічного періоду голодування в щурів під легким ефірним наркозом зі стегнової вени відбирали кров. Для подальших досліджень використовували сироватку крові. Вміст у сироватці крові загального білірубину, загального холестерину, тригліцеридів, альбуміну, загального білка, глюкози і креатиніну визначали, використовуючи біотести виробництва фірми "PZ Cormay" (Польща). Вміст церулоплазміну в сироватці крові визначали за методом Равіна [9], застосовуючи біотести виробництва ПрАТ "Реагент" (Україна).

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

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Визначення чітких діагностичних критеріїв алкогольного ураження печінки для вдосконалення існуючих засобів і методів лікування та профілактики, розробки стандарту лікування цього патологічного стану є важливою ланкою в експериментальній фармакології і токсикології. У зв'язку з цим, актуальною є розробка експериментальних моделей АГ, оскільки тільки в експерименті на тваринах можна впливати відповідним етіологічним фактором (у нашому випадку – алкоголем) і, залежно від часу його експозиції та дози, викликати органи ураження різного ступеня тяжкості. Складність розробки експериментальної моделі АГ визначається видовими особливостями реакції об'єкта досліджень – гризунів, яким ззовні необхідно вводити алкоголь в еквівалентних кількостях, що характерні для людини, схильної до зловживання спиртними напоями [10].

Важливою умовою успішного моделювання будь-якої патології є підбір маркерів, що характеризують зазначений стан. Такими маркерами можуть бути біохімічні, імунологічні та гістологічні показники, які реєструють при формуванні АГ [11].

Результати визначення біохімічних показників крові, наведені в таблиці, показали, що алкоголізація тварин призвела до статистично значущих порушень, які відображають функціональний стан печінки.

Зміни концентрації в сироватці крові загального білка (табл.) були ознакою грубої патології печінки. Зниження рівня креатиніну за умов експериментального АГ також свідчило про погіршення метаболізму, яке супроводжувалося серйозним розладом білкового обміну. Водночас альбумінова фракція білка суттєво не змінювалась, що дає підставу говорити про залежність від кількісного та якісного складу загальних протеїнів. Зменшена концентрація

Таблиця – Біохімічні показники сироватки крові щурів-самців при профілактичному введенні тест-зразка на тлі алкогольного гепатиту (M±m)

Показник (вміст)	Експериментальна група		
	інтакт	алкогольний гепатит	алкогольний гепатит+метадоксин
Альбумін, г/л	41,55±0,38	42,77±0,55	41,17±0,59
Загальний білок, г/л	63,17±0,70	68,33±1,41*	66,67±1,038*
Загальний білірубін, мкмоль/л	0,72±0,26	3,72±0,75*	2,78±0,60*
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*
Глюкоза, ммоль/л	5,33±0,39	1,95±0,46*	1,93±0,20*
Креатинін, ммоль/л	30,50±2,50	21,83±3,03*	36,22±2,64**
Сечовина, ммоль/л	4,25±0,48	2,82±0,37*	4,08±0,47**
Церулоплазмін, мг/л	440,4±28,8	727,9±39,0*	457,9±28,5**

Примітки:

1. * – p<0,05 відносно інтакту.

2. ** – p<0,05 відносно групи тварин з алкогольним гепатитом.

сечовини в крові (табл.) також можлива при зниженому катаболізмі білків та печінковій недостатності.

При хронічному холестази (табл.), викликаному АГ, підвищувався рівень холестерину та тригліцеридів. З літератури відомо [12], що при холестази має місце збільшення вільного холестерину і фосфоліпідів з одночасним зниженням етерифікованого холестерину, що, у свою чергу, зумовлено зменшенням утворення в печінці лецитин-холестерин-ацилтрансферази. Зниження активності цього ферменту призводить до утворення аномального ліпопротеїду з високим вмістом вільного холестерину і тригліцеридів. Не виключена можливість, що до цього призводить і збільшення вмісту в печінці гліцерол-3-фосфату, з яким етерифікуються жирні кислоти при введенні тваринам етанолу [13, 14]. В результаті підвищеного синтезу гліцерол-3-фосфату посилюються етерифікація жирних кислот і синтез тригліцеридів, що слугує початковим етапом розвитку гіперліпідемії і жирової дистрофії печінки. Наростання концентрації НАДН супроводжується зниженням швидкості окиснення жирних кислот, що також сприяє їх відкладенню в печінці [15].

Мідьвмісний білок плазми церулоплазмін відіграє важливу роль у метаболізмі міді в механізмах прооксидантних/антиоксидантних реакцій, належить до гострофазних фізіологічних реактантів. Концентрація його в крові підвищувалася (табл.), що може бути пов'язано з активацією транскрипції гена церулоплазміну α -інтерфероном і цитокінами під час запалення або інфекції [16]. При холестази також спостерігали порушення обміну міді, що сприяло процесам колагеногенезу.

У зазначених патологічних умовах гемоліз еритроцитів різко посилювався, що вплинуло на вміст білірубину в плазмі крові щурів. Зменшення концентрації глюкози в крові при АГ (табл.) може бути результатом гальмування синтезу глікогену і глікогеногенезу, а також гіпоксії (при дефіциті кисню в клітинах метаболізм стає анаеробним, що спричиняє накопичення молочної кислоти). Для забезпечення клітини енергією активується гліколіз, що призводить до накопичення лактату й, меншою мірою, пірувату і дефіциту в крові глюкози.

Отже, наведені результати (табл.) свідчать про те, що розвиток експериментального гепатиту в організмі щурів спричинив статистично достовірні порушення практично всіх досліджених біохімічних маркерів крові. Застосування метадоксину у тварин з алкогольним пошкодженням печінки призвело до покращення тільки таких показників, як рівні загального білка, загального

білірубину, тригліцеридів, креатиніну, сечовини та церулоплазміну, що свідчить про різні механізми виникнення АГ і його перебігу. Відсутність дії метадоксину на інші біохімічні ланки в крові щурів, у яких викликали експериментальний АГ, можна пояснити неефективністю сполуки у профілактичній схемі дослідження. Потрібно також зазначити, що при клінічних випробуваннях метадоксину [20] було отримано результати, які дещо відрізняються від наших – доклінічних. Цей факт ще раз підтверджує необхідність обережного перенесення експериментальних даних з тварин на організм людини.

Потрібно враховувати той факт [3], що метадоксину властивий такий спектр дії, як: 1. Ефект дезінтоксикації. Препарат впливає на активність алкогольдегідрогенази. Рівень ферменту в організмі знижується при наявності хронічної алкогольної інтоксикації. Під час приймання препарату його рівень значно підвищується і досягає нормальних цифр. 2. Енергетична дія. Інтоксикація алкоголем призводить до зниження вироблення АТФ у мозку і печінці й відновлюється при прийманні препарату. 3. Антистеатозна дія. Метадоксин гальмує накопичення мононенасичених і насичених жирних кислот у клітинах мозку, серця, печінки. 4. Антиоксидантна дія. При прийманні алкоголю тривалий час розвивається феномен оксидативного стресу. Його проявом є зниження відновлення глутатіону та активності глутатіонредуктази. Ці речовини залишаються на нормальному фізіологічному рівні при використанні метадоксину.

В нашому випадку найбільш реальними є антиоксидантна та антистеатозна дії. Окиснювальний стрес і пероксидне окиснення ліпідів приєднуються до процесу внаслідок того, що збільшення концентрації вільних жирних кислот у мітохондріях призводить до посилення мітохондріального β -окиснення і надлишку вільних радикалів кисню та продуктів пероксидного окиснення ліпідів [17]; крім того, вільні жирні кислоти і кетонів тіла індукують продукування ферменту CYP2E1 в гепатоцитах [18, 19]. У тканинах молекула метадоксину може хімічним шляхом метаболізувати, утворюючи відповідні N-окиси, які структурно функціонують як спінова пастка, таким чином, у змозі захопити синглетний кисень, гідроксил, супероксид і вільні радикали.

ВИСНОВКИ. 1. Алкоголізація тварин призвела до статистично значущих порушень біохімічних показників плазми крові: до підвищення рівнів загального білка, тригліцеридів, зниження концентрації глюкози, креатиніну, сечовини та зро-

стання рівня церулоплазміну. Дані порушення відображають функціональний стан печінки.

2. Профілактичне введення метадоксину внутрішньошлунково в дозі 90 мг/кг за 30 хв до введення алкоголю в дозі 7 мл/кг призвело до покращення рівнів загального

білка, загального білірубіну, тригліцеридів та нормалізації концентрації креатиніну, сечовини, церулоплазміну, що свідчить про різні механізми виникнення АГ і його перебігу. Передбачається, що гепатозахисна дія препарату опосередкована антиоксидантними та антистеатозними механізмами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Acute alcohol intoxication / L. Vonghia, L. Leggio, A. Ferrulli [et al.] // *European Journal of Internal Medicine*. – 2008. – **19**, № 8. – P. 561–567.
2. Сухарева Г. В. Алкогольная болезнь печени / Г. В. Сухарева // *Consilium medicum*. Гастроэнтерология. – 2003. – **5**, № 3. – С. 26–27.
3. Metadoxine in the treatment of acute and chronic alcoholism: a review / G. Addolorato, C. Ancona, E. Capristo, G. Gasbarrini // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. – 2003. – **16**, № 3. – P. 207–214.
4. Efficacy of metadoxine in the management of acute alcohol intoxication / M. C. Díaz Martínez, A. Díaz Martínez, V. Villamil Salcedo, C. Cruz Fuentes // *Journal of International Medical Research*. – 2002. – **30**, № 1. – P. 44–51.
5. 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. – **21**. – P. 93–99.
6. Essential amino acid supplementation decreases liver damage induced by chronic ethanol consumption in rats / G. Corsetti, A. Stacchiotti, L. Tedesco [et al.] // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. – 2011. – **24**, № 3. – P. 611–619.
7. USA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. US. Department of Health and Human Services; 2005.
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
9. Ravin H. A. Rapid test for hepatolenticular degeneration / H. A. Ravin // *Lancet*. – 1956. – **1**. – P. 7267–7271.
10. Буров Ю. В. Биологические модели хронического алкоголизма / Ю. В. Буров, В. Н. Жуков // *Токсикология*. – 1984. – **13**. – С. 57–92.
11. Разработка экспериментальных моделей алкогольного гепатита различной степени тяжести / А. Н. Петров, М. К. Шевчук, Е. К. Георгианова [и др.] // *Биомед. журн.* – 2015. – **16**. – С. 187–202.
12. Болезни печени и желчевыводящих путей : руковод. для врачей / под ред. В. Т. Ивашкина. – 2-е изд. – М., 2005. – 536 с.
13. Надинская М. Ю. Заболевания печени, протекающие с синдромом внутрипеченочного холестаза / М. Ю. Надинская // *Consilium medicum*. – 2001. – **4**, № 6. – С. 286–292.
14. Kullak-Ublick G. A. Hepatobiliary transport / G. A. Kullak-Ublick, U. Beuers, G. Paumgartner // *Journal of Hepatology*. – 2000. – **32**, № 1 (Suppl.). – P. 3–18.
15. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets / G. Paumgartner // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006. – **12**, № 28. – P. 4445–4451.
16. Virrit O. High ceruloplasmin levels are associated with obsessive compulsive disorder: a case control study / O. Virrit, S. Selek, M. Bulut [et al.] // *Behavioral and Brain Functions*. – 2008. – **18**, № 4. – P. 52–58.
17. Parola M. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis / M. Parola, G. Robino // *Journal of Hepatology*. – 2001. – **35**, № 2. – P. 297–306.
18. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis / M. D. Weltman, G. C. Farrell, P. Hall [et al.] // *Hepatology*. – 1998. – **27**, № 1. – P. 128–133.
19. Role of Kupfer cell-derived reactive oxygen intermediates in alcoholic liver disease in rats in vivo / Y. Takeyama, S. Kamimura, A. Kuroiwa [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 1996. – **20**, № 9 (Suppl.). – P. 335A–339A.
20. Metadoxine in acute alcohol intoxication: a double-blind, randomized, placebo-controlled study / L. S. Shpilenny, A. P. Muzychenko, G. Gasbarrini, G. Addolorato // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2002. – **26**, № 3. – P. 340–346.

ГЕПАТОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТАДОКСИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛКОГОЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС

Резюме

Воспроизведена модель алкогольного гепатита путем внутрижелудочного введения 40 % раствора этанола в дозе 7 мл/кг массы тела крыс линии Вистар в течение 7 дней. В качестве биохимических маркеров крови животных были использованы показатели общего белка, общего билирубина, общего холестерина, триглицеридов, глюкозы, креатинина, мочевины и церулоплазмина. Показано, что метадоксин (ионная соль пиридоксина и пироглутаминовой кислоты) в дозе 90 мг/кг стабилизировал только содержание общего белка, общего билирубина, триглицеридов, креатинина, мочевины и церулоплазмина, что свидетельствует о различных механизмах возникновения алкогольного гепатита и его течения. Предполагается, что гепатозащитное действие препарата опосредованно антиоксидантными и антистеатозными механизмами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метадоксин, алкогольный гепатит, гепатопротектор.

Н. М. Shayakhmetova, O. V. Karpova, A. K. Voronina, M. Ya. Holovenko
O. V. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE, ODESA
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY OF NAMS OF UKRAINE, KYIV

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF METADOXINE ON EXPERIMENTALLY INDUCED ALCOHOLIC HEPATIC INJURY IN RATS

Summary

It was developed the model of alcoholic hepatitis by intragastric administration of 40 % ethanol at a dose of 7 ml/kg body weight in Wistar rats for 7 days. As blood biochemical markers of animals were used values of total protein, total bilirubin, total cholesterol, triglycerides, glucose, creatinine, urea and ceruloplasmin. It was shown that metadoxine (ionic salt of pyridoxine and pyroglutamic acid) in a dose of 90 mg/kg stabilized only rates of total protein, total bilirubin, triglycerides, creatinine, urea and ceruloplasmin. It was indicated that mechanisms for alcoholic hepatitis and its flow are different. It was assumed that the hepatoprotective effect of the drug is realized through antioxidant and anti-steatotic mechanisms.

KEY WORDS: metadoxine, alcoholic hepatitis, hepatic protector.

Отримано 29.10.15

Адреса для листування: О. В. Карпова, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: olya_karpova2001@mail.ru.