



УДК 615:547.419.5

О. Л. Тимчишин,
В. В. Годован, д-р мед. наук, проф.,
Л. А. Полукарова

ВПЛИВ МЕДГЕРМУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ІНТАКТНИХ ЩУРІВ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 615:547.419.5

О. Л. Тымчишин, В. В. Годован, Л. А. Полукарова
ВЛИЯНИЕ МЕДГЕРМА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ИНТАКТНЫХ КРЫС

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Установлено, что при внутрибрюшном введении медгерма интактным крысам изменение активности ферментов и содержимого интегральных биохимических показателей носило в основном дозозависимый характер. При введении медгерма в дозе 1/40 ЛД₅₀ наблюдаются достоверные изменения активности маркерных ферментов и содержания интегральных биохимических показателей функционального состояния печени как в сыворотке крови, так и в ткани печени. На фоне курсового применения медгерма в дозе 1/160 ЛД₅₀ не выявлено значительных сдвигов в биохимическом гомеостазе у интактных крыс.

Ключевые слова: купрум-оксиэтилидендифосфonatoгерманат (медгерм), оценка функционального состояния печени.

UDC 615:547.419.5

О. Л. Tymchishin, V. V. Godovan, L. A. Polukarova
MEDHERM EFFECT ON INTACT RATS LIVER FUNCTIONAL STATE

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

The enzymes activity and integrated biochemical parameters changes at medherm intraperitoneal injection in intact rats are established to be depending on the dose. At medherm injection in 1/40 LD₅₀ dose certain changes of marker enzymes activity and liver functional state integrated biochemical parameters are observed in the serum and liver tissue. No significant shifts in intact rats biochemical homeostasis were revealed due to medherm course administration in 1/160 LD₅₀ dose.

Key words: cuprum-oxyethylidendiphosphonatohermanate (medherm), liver functional state evaluation.

Хвороби печінки та гепатобіліарної системи посідають перше місце в патології усього шлунково-кишкового тракту [1]. Незважаючи на значну кількість гепатопротекторних лікарських засобів, їх ефективність у клінічній практиці невисока, тому що вони впливають на якийсь один патогенетичний ланцюг розвитку ураження печінки, тимчасом як ці захворювання мають поліетіологічний характер й стосуються більшості її функцій [2]. Актуальним завданням фармакології залишається пошук, створення та всебічне фармакологічне вивчення зовсім нових субстанцій з гепатопротекторними властивостями.

Групою дослідників під керівництвом проф. І. Й. Сейфуліної (кафедра загальної хімії та полімерів Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова) цілеспрямованим синтезом створено нову координаційну біологічно активну речовину (БАР) на основі оксіетилідендифосфонової кислоти (ОЕДФ), мікроелементів германію та купруму — купрум-оксіетиліденди-

фосфonatoгерманат (медгерм). Відомо, що ОЕДФ, з одного боку, пригнічує активність фосфоліпаз, ферментів, які гідролізують мембранні фосфоліпіди й ліпопротеїди ферментів, а з другого — замінює ушкоджені структурні компоненти біологічних мембран, що сприяє нормалізації їх функцій і забезпеченню стійкості до шкідливих впливів [3].

Ще один компонент нової БАР — германій — відомий своїми антиоксидантними, антигіпоксичними, детоксикаційними ефектами [4–6]. Тому сполуки германію застосовуються для лікування гепатитів, цирозів печінки, її жирової дистрофії [7; 8]. Виявлено, що низка комплексонатів ОЕДФ і германію мають гепато-, кардіопротекторний ефект за рахунок мембраностабілізуючої дії, що реалізується на рівні фосфоліпідної компоненти клітинних мембран [9–11]. Це обумовлює доцільність вивчення можливої стабілізуючої дії нової БАР на клітинні мембрани при патології, що супроводжується мембранодеструк-

цією. Раніше було показано, що для дослідження мембранопротекторної дії нових БАР найбільш адекватною є галактозамінова модель токсичного ураження печінки [12]. Першим етапом вивчення гепатозахисних властивостей нової сполуки було встановлення її впливу на морфофункціональний стан печінки інтактних тварин, що й обумовило мету даного дослідження.

Мета роботи — встановлення характеру змін активності маркерних ферментів (цитолізу і холестази) та біохімічних показників, які інтегрально характеризують функціональний стан печінки на фоні курсового введення медгерму.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проводилися згідно з біоетичними вимогами на 24 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г розведення віварію Одеського національного медичного університету (ОНМедУ). Тварин утримували в звичайних умовах на стандартному харчовому раціоні. Щури були розподілені на 4 групи ($n = 6$). Тваринам I групи (контроль) внутрішньочеревинно (в/ч) вводили 0,9 % розчин хлориду натрію. Щурам II–IV груп протягом 14 днів в/ч вводили водний розчин медгерму дозами 1/40, 1/80 і 1/160 ЛД₅₀ відповідно.

Як біоматеріал для проведення клініко-лабораторних досліджень було обрано сироватку крові (СК) і супернатант гомогенату тканини печінки (ТП). Підготовка СК включала такі етапи. Кров у щурів брали вранці натщесерце шляхом венепункції стегнової вени, яку виділяли під ефірним наркозом [13]. У середньому від одного щура отримували 6–8 мл цільної крові. Після 20-хвилинної експозиції при кімнатній температурі згусток обводили сухою стерильною паличкою і поміщали на 20 хв до побутового холодильника при температурі 4–8 °С, після чого центрифугували 30 хв при 3000 об/хв при температурі 4 °С у рефрижераторній центрифугі ЦЛР-1. Отриману сироватку крові відбирали піпеткою і переносили у пробірки типу «Еппендорф» по 1,5 мл. Підготовка ТП включала такі етапи. Розтин щурів проводили згідно з загальноприйнятою методикою [14]. Печінку вилучали з черевної порожнини, зважували, промивали охолодженим до 4 °С 0,9 % розчином хлориду натрію, відбирали шматочок масою 500–1000 мг, зважували його на торсійних терезах. Тканину печінки гомогенізували на льоду у скляному гомогенізаторі з тефлоновим товчачиком за допомогою мікроподрібнювача тканин РТ-2 протягом 2 хв при 5000 об/хв. Як середовище виділення використовували 0,9 % розчин хлориду натрію кількістю 10 мл. Гомогенат центрифугували 30 хв при 7000 об/хв при температурі 4 °С у рефрижераторній центрифугі ЦЛР-1. У результаті одержували супернатант, у якому визначали біохімічні показники.

Визначення активності ферментів цитолізу — аланінамінотрансферази (АлАТ) у СК (мккат/л)

і ТП (мккат/г_{тк}) та аспартатамінотрансферази (АсАТ) у СК (мккат/л) і ТП (мккат/г_{тк}) проводили за методом S. Reitman, S. Frankel [15]. Активність ферментів холестази — гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) у СК (мккат/л) і ТП (мккат/г_{тк}) визначали за методом [15], а лужної фосфатази (ЛФ) у СК (мккат/л) і ТП (мккат/г_{тк}) — за методом [15].

Крім змін активності цих ферментів, на фоні курсового введення медгерму було вивчено зміни вмісту деяких інтегральних показників, які характеризують інші функції печінки. За вмістом загального білка і сечовини в СК і ТП судили про зміни параметрів білкового обміну печінки. Вміст загального білка у СК (г/л) і ТП (г/г_{тк}) визначали за біуретовою реакцією [15]; вміст сечовини у СК (ммоль/л) і ТП (ммоль/г_{тк}) — за ферментативним уреазним методом за реакцією з саліцилатгіпохлоритом [15]. Вплив медгерму на пігментну функцію печінки оцінювали за змінами вмісту загального білірубину, який визначали у СК (мкмоль/л) і ТП (мкмоль/г_{тк}) за методом Малоя — Евеліна [15]. За вмістом загального холестерину і глюкози оцінювався стан ліпідного та вуглеводного обмінів. Вміст загального холестерину визначали у СК (ммоль/л) і ТП (ммоль/г_{тк}) за уніфікованим методом за реакцією з оцтовим ангідридом (метод Ілька) [15]. Рівень глюкози визначали у СК (ммоль/л) і ТП (ммоль/г_{тк}) глюкозооксидазним методом [15]. При розрахунках вмісту аналітів, що вивчалися, у печінці враховували масу тканини печінки і ступінь розведення гомогенату.

Визначення активності ферментів і вмісту інтегральних показників функції печінки проведено у лабораторному відділенні Університетської клініки ОНМедУ на автоматичному біохімічному аналізаторі Cobas Mira Plus за допомогою біохімічних наборів фірми BioSystems S. A. (Іспанія). Статистичну обробку отриманих даних проводили, використовуючи програму Microsoft Excel за методом обчислення середнього арифметичного та його рівня значущості за критерієм вірогідності Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті проведених досліджень і подальшого аналізу виявлена важлива закономірність впливу курсового введення медгерму у широкому діапазоні доз на активність ферментів цитолізу та холестази (табл. 1, 2; рис. 1, а; 2, а).

Амінотрансферази — внутрішньоклітинні ферменти, які у великій кількості знаходяться в гепатоцитах. Активність амінотрансфераз у СК і ТП залишається одним з найбільш надійних показників цитолітичного процесу в печінці, причому гіперферментемія спостерігається вже при мінімальному ушкодженні її клітин [16]. Дані табл. 1, 2 і рис. 1, а; 2, а свідчать про те, що

Зміни біохімічних показників у сироватці крові інтактних щурів на фоні курсового введення різних доз медгерму

Показник	I група	II група	III група	IV група
Активність АЛАТ, мккат/л	1,97±0,14	1,89±0,22	1,99±0,43	2,12±0,16
Активність АсАТ, мккат/л	2,40±0,10	9,65±1,00*	8,33±1,09*	3,01±0,20*
Активність ГГТ, мккат/л	0,13±0,01	0,98±0,17*	0,45±0,06*	0,22±0,03*
Активність ЛФ, мккат/л	18,20±1,09	7,76±0,34*	21,90±1,79	16,90±1,05
Вміст загального білка, г/л	67,72±2,48	55,77±2,86*	59,75±3,52*	65,88±2,74
Вміст сечовини, ммоль/л	10,50±0,75	12,50±1,50*	11,23±1,35	11,83±2,18
Вміст загального білірубину, мкмоль/л	1,28±0,10	1,69±0,16*	1,05±0,06*	1,14±0,14
Вміст загального холестерину, мкмоль/л	2,28±0,18	0,88±0,10*	1,55±0,17*	1,39±0,41*
Вміст глюкози, ммоль/л	5,27±0,38	3,54±0,39*	4,28±0,26*	5,65±0,64

Примітка. У табл. 1, 2: * — вірогідно порівняно з контролем при $P < 0,05$.

Таблиця 2

Зміни біохімічних показників у тканинах печінки інтактних щурів на фоні курсового введення різних доз медгерму

Показник	I група	II група	III група	IV група
Активність АЛАТ, мккат/г _{тк}	55,10±3,17	61,36±5,14	56,79±7,57	55,45±6,74
Активність АсАТ, мккат/г _{тк}	161,19±5,64	12,99±1,35*	22,28±2,85*	140,48±14,13
Активність ГГТ, мккат/г _{тк}	4,08±0,28	2,33±0,17*	4,02±0,13	4,28±0,34
Активність ЛФ, мккат/г _{тк}	1,30±0,12	1,27±0,06	0,37±0,05*	1,48±0,46
Вміст загального білка, г/г _{тк}	16,73±0,61	22,14±2,69*	19,33±1,54*	17,45±6,84
Вміст сечовини, ммоль/г _{тк}	0,61±0,09	0,86±0,09*	0,78±0,12	0,68±0,13
Вміст загального білірубину, мкмоль/г _{тк}	15,32±0,77	14,95±4,32	14,83±1,39	18,00±2,75
Вміст загального холестерину, мкмоль/г _{тк}	0,20±0,02	1,43±0,60*	1,03±0,20*	0,18±0,06
Вміст глюкози, ммоль/г _{тк}	4,60±0,40	12,43±1,76*	8,25±1,51*	5,88±0,82*

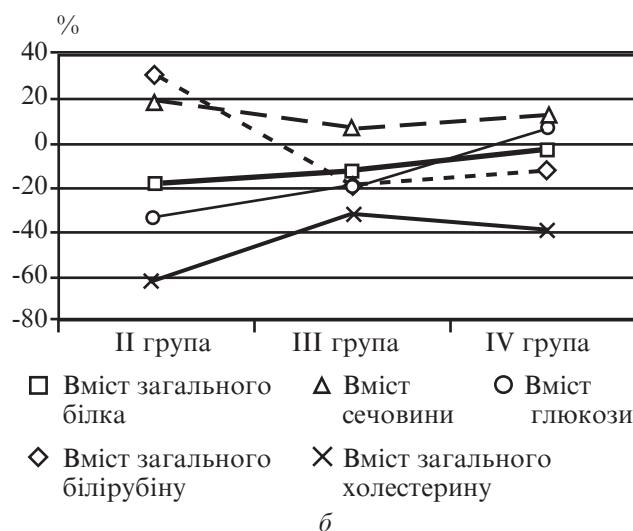
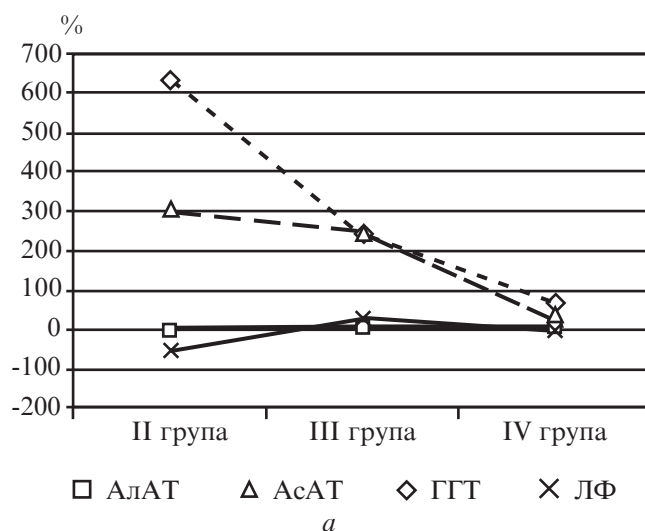


Рис. 1. Спрямованість і виразність зміни активності ферментів (а) та вмісту інтегральних показників (б) у сироватці крові інтактних щурів на фоні курсового введення медгерму (відносно аналогічних показників у контрольних тварин, %). На рис. 1, 2: за віссю абсцис — групи тварин; за віссю ординат — відсоток зміни активності (вмісту) у дослідних тварин порівняно з аналогічним показником у тварин контрольної групи, %

при в/ч введенні медгерму трьома дозами вірогідної зміни активності АЛАТ як у СК, так і у ТП не відбувається. Тим же часом активність АсАТ у СК на фоні в/ч введення медгерму збільшувалася порівняно з тваринами контрольної групи. Виразність змін активності АсАТ у СК мала ви-

ражений дозозалежний характер: при введенні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ збільшення активності АсАТ у СК було максимальним (у 4,02 разу), а на фоні введення медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ — мінімальним (у 1,25 разу) (див. табл. 1; рис. 1, а). Причому зміни активності АсАТ у СК на фоні в/ч

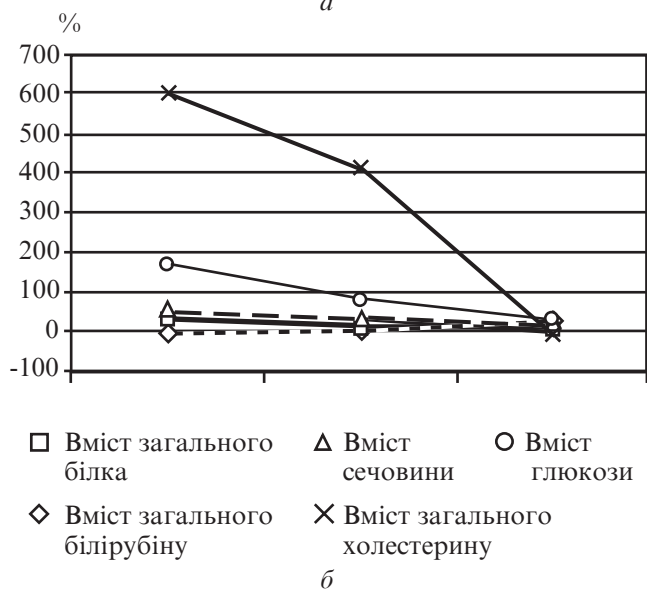
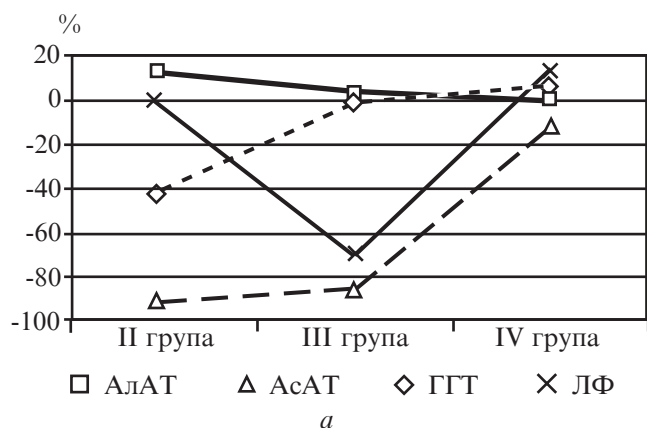


Рис. 2. Спрямованість і виразність зміни активності ферментів (а) та вмісту інтегральних показників (б) у тканинах печінки інтактних щурів на фоні курсового введення медгерму (відносно аналогічних показників у контрольних тварин, %)

введення усіх доз медгерму були статистично вірогідними порівняно з активністю АсАТ у СК щурів контрольної групи.

Активність АсАТ у ТП на фоні в/ч введення медгерму, на відміну від активності АсАТ у СК, зменшувалася порівняно з контролем. Виразність зменшення активності АсАТ у ТП також мала дозозалежний характер: при введенні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ зменшення активності АсАТ у ТП було максимальним (у 12,4 разу), а на фоні введення медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ — мінімальним (у 1,14 разу) (див. табл. 1; рис. 2, а). Причому зміни активності АсАТ у ТП були статистично вірогідними тільки на фоні в/ч введення медгерму дозами 1/40 і 1/80 ЛД₅₀. Між змінами активності АсАТ у СК і ТП виявлено високу негативну кореляційну залежність ($r = -0,99$).

Зміни активності маркерних ферментів холестеразу у СК і ТП наведено у табл. 1, 2 і на рис. 1, а та 2, а. На фоні в/ч введення медгерму активність ГГТ у СК збільшується. Виразність збільшення активності ГГТ у СК також мала виражений до-

зозалежний характер: при введенні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ збільшення активності ГГТ у СК було максимальним (у 7,53 разу), а на фоні введення медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ — мінімальним (у 1,69 разу). Причому ці зміни були статистично вірогідними порівняно з активністю ГГТ у СК щурів контрольної групи (див. табл. 1; рис. 1, а).

У тварин, які в/ч отримували медгерм дозою 1/40 ЛД₅₀, активність ЛФ у СК зменшувалася у 2,35 разу. Тим же часом на фоні введення медгерму дозою 1/80 і 1/160 ЛД₅₀ активність ЛФ у СК вірогідно не відрізнялася від активності ЛФ у СК щурів контрольної групи.

При застосуванні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ активність ГГТ у ТП вірогідно зменшувалася. На фоні в/ч введення медгерму дозами 1/80 і 1/160 ЛД₅₀ активність ГГТ у ТП вірогідно не відрізнялася від аналогічного показника у тварин контрольної групи. Активність ЛФ у ТП на фоні в/ч введення медгерму дозами 1/40 та 1/80 ЛД₅₀ зменшувалася. Зменшення активності ЛФ у ТП тільки у щурів III групи було максимальним (у 3,51 разу) та статистично вірогідним. Зменшення активності ЛФ у ТП на фоні застосування медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ було незначним і статистично невірогідним. Водночас на фоні введення медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ було виявлено незначне підвищення активності ЛФ, однак воно не було вірогідним відносно контролю (див. табл. 1; рис. 2).

Кореляційний аналіз змін активності маркерних ферментів холестеразу у СК і ТП щурів, які в/ч одержували медгерм трьома дозами, показав, що виявлена динаміка змін активності ГГТ у СК і ТП має високу негативну кореляцію ($r = -0,98$), а динаміка зміни активності ЛФ у СК і ТП має низьку позитивну кореляцію ($r = 0,22$).

Дані табл. 1 і рис. 1, б свідчать, що порівняно зі щурами I групи, вміст загального білка у СК дослідних тварин зменшувався. Однак істотне зменшення цього показника було виявлено тільки на фоні введення медгерму дозами 1/40 та 1/80 ЛД₅₀ (відповідно у 1,21 і 1,13 разу). У ТП, на фоні введення медгерму тими ж дозами, вміст загального білка у дослідних тварин істотно збільшувався відносно контролю (відповідно у 1,32 і 1,16 разу). На фоні введення медгерму вміст сечовини у СК збільшувався. Однак тільки в/ч введення медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ викликало вірогідне збільшення вмісту сечовини у 1,19 разу. Тим же час у ТП виявлено збільшення вмісту сечовини, причому тільки на фоні введення медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ це збільшення було істотним порівняно зі щурами I групи (у 1,41 разу) (див. табл. 2; рис. 2, б).

Порівняно з контролем вміст загального білірубину в СК тварин II групи збільшувався у 1,32 разу, а у тварин III групи зменшувався у 1,22 разу, і ці зміни були вірогідними (див. табл. 1, рис. 1, б). У тварин IV групи зменшення вмісту загального білірубину було невірогідним щодо ана-

логічного показника у тварин контрольної групи. Тим же часом, порівняно зі щурами I групи, у дослідних тварин на фоні введення медгерму дозами, що вивчалися, не виявлено істотних змін вмісту загального білірубину в ТП (див. табл. 2; рис. 2, б).

Згідно з даними табл. 1 і рис. 1, б, вміст загального холестерину в СК істотно зменшувався на фоні введення медгерму всіма трьома дозами (відповідно у 2,6, 0,69 і у 0,61 разу). Водночас у ТП виявлено значне вірогідне збільшення вмісту загального холестерину тільки на фоні введення медгерму дозами 1/40 і 1/80 ЛД₅₀ (у 7,15 і 5,15 разу) (див. табл. 2; рис. 2, б).

Зміни вмісту глюкози в СК і ТП у інтактних щурів на фоні курсового введення медгерму наведено у табл. 1, 2 і на рис. 1, б; 2, б. Вміст глюкози у СК на фоні введення медгерму дозами 1/40 і 1/80 ЛД₅₀ істотно зменшувався (відповідно у 1,49 і 1,23 разу). На фоні введення медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ коливання вмісту глюкози в СК не мали істотного характеру. У ТП виявлено вірогідне збільшення вмісту глюкози на фоні введення медгерму всіма дозами (відповідно у 2,70, 1,79 і 1,28 разу).

Таким чином, встановлено, що при в/ч введенні інтактним щурам медгерму зміни активності ферментів і вмісту інтегральних біохімічних показників здебільшого мали дозозалежний характер. При введенні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ спостерігаються найбільш виразні та вірогідні зміни активності маркерних ферментів і вмісту інтегральних біохімічних показників функціонального стану печінки як у сироватці крові, так і тканині печінки. На фоні курсового застосування медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ не виявлено значних зрушень у біохімічному гомеостазі в інтактних щурах. Для більш повного уявлення про вплив нової БАР на стан печінки доцільним було б провести морфологічні дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Радченко В. Г. Основы клинической гепатологии. Заболевания печени и билиарной системы / В. Г. Радченко, А. В. Шабров, Е. Н. Зиновьева. – М.: БИНОМ, 2005. – 864 с.
2. Бодревич Б. Б. Синдром холестаза в практиці терапії: диференційна діагностика та сучасні принципи лікування / Б. Б. Бодревич, Я. С. Денисюк, М. Т. Панасюк // Гепатологія. – 2009. – № 1. – С. 4–15.
3. Юрьева Э. А. О биофосфонатах как о лекарственных соединениях (по материалам международного конгресса в Нидерландах 2001 г.) / Э. А. Юрьева, Т. А. Матковская // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2001. – № 3. – С. 59.
4. Синтез, нейротропная и противоопухолевая активность ряда герматранов, гермсеквиоксанов и их оловоорганических аналогов / Э. Лукевиц, С. Германе, А. А. Зидермане [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1984. – Т. 18, № 2. – С. 154–159.
5. Pat. 3514659 Ger. (1985). Organogermanium compounds useful as antioxidants / N. Kakimoto, M. Namiki, T. Osawa, K. Miyao (Япония) // Chemical Abstracts. – 1986. – Vol. 105. – P. 191402b.

6. Goodman S. Therapeutical effects of organic germanium / S. Goodman // Med. Hypotheses. – 1988. – N 25. – P. 207–215.

7. Pat. 4309412 US (1982). Germanium-containing organic polymer and its use in the treatment of liver disorders / A. Ishikawa, Y. Ishida, S. Ikegami (США) // Chemical Abstracts. – 1972. – Vol. 46. – P. 7929.

8. Hongo R. Clinical usage of the new hepatoprotector Securion: Review / R. Hongo // Masao Ohrishi Medical Information department, 1998. – 32 p.

9. Мегдятьов Р. С. Влияние ксидифона на патогенез невралгии тройничного нерва / Р. С. Мегдятьов, В. К. Решетняк, Е. В. Хоженко. – М., 2002. – 142 с.

10. Годован В. В. Фармакологічні властивості нових похідних германієвих солей дифосфонових кислот з біолігандами: дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.05 / В. В. Годован ; Одес. держ. мед. ун-т. – О., 2008. – 452 с.

11. Утешев Б. С. Иммуномодулирующее и антиоксидантное действие β-каротина и эссенциале при нарушении липидного обмена / Б. С. Утешев, Ф. Я. Байбури, Л. Г. Прокopenko // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – Т. 61, № 2. – С. 41–44.

12. Годован В. В. Галактозаміновий гепатит як модель вивчення морфофункціональних порушень клітинних мембран / В. В. Годован, Н. В. Кресюн // Одеський медичний журнал. – 2005. – № 3. – С. 11–15.

13. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – К.: Вища шк., 1983. – 383 с.

14. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.

15. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. В. В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 363 с.

16. Блогер А. Ф. Исследование основных патогенетических линий поражения клеток печени в условиях клинической и экспериментальной патологии и подходы к регуляции и купированию этих процессов / А. Ф. Блогер, А. Я. Майоре // Успехи гепатологии. – Рига: РМП, 1982. – Вып. X. – С. 12–34.