

КОРЕКЦІЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ПРИ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ НОВИМИ КОМПЛЕКСНИМИ СПОЛУКАМИ ГЕРМАНІЮ З БІОЛІГАНДАМИ

Одеський державний медичний університет

Одним із провідних напрямків метаболізму ліпідів є їх перекисне окислення (ПОЛ), яке являє собою складний багато-стадійний ланцюговий процес окислення киснем ліпідних субстратів, головним чином поліненасичених жирних кислот. Цей процес включає стадії взаємодії ліпідів із вільнорадикальними сполуками й утворення вільних радикалів ліпідної природи [1]. Відбувається ПОЛ у 2 стадії — неферментативного автоокислення та ферментативних реакцій, у результаті яких утворюються вільні радикали ліпідів, здебільшого супероксидний аніон-радикал O_2^- [2]. При реакції дисмутації двох супероксидних радикалів утворюється молекула перекису водню H_2O_2 [3]. До найбільш реакційноздатних, а тому найбільш небезпечних радикалів кисню, належить гідроксильний радикал OH^- — один з основних ушкоджуючих факторів живого організму [3; 4].

Слід зазначити, що навіть у фізіологічних умовах, у процесі роботи «дихального ланцюга» у мітохондріях, особливо печінки, при окислювальному фосфорилуванні (синтез АТФ) виділяється деяка кількість активних форм кисню (супероксид-аніон-радикал, гідроксил-радикал та ін.), які нейтралізуються антирадикальною системою [4]. Проте при токсичному ураженні печінки у мітохондріях відбувається роз'єднання процесів окислення і фосфорилування, в результаті чого значно зростає утворення активних форм кисню [5].

При розвитку патологічного процесу баланс утворення та використання перекисів та інших продуктів ПОЛ порушується, а метаболіти ПОЛ накопичуються в тканинах і біологічних рідинах, що призводить до серйозних порушень, у першу чергу, у біологічних мембранах [6; 7]. Токсичними для організму є не тільки перекиси, які утворюються у результаті ПОЛ, а й продукти більш глибокого окислення ліпідів, такі як альдегіди, кетони, кислоти. Ці карбонільні продукти ПОЛ інгібують активність ряду ферментів, пригнічують синтез ДНК, збільшують проникність капілярів, модифікують агрегацію тромбоцитів тощо [8; 9].

Таким чином, активація ПОЛ (так званий «синдром ліпідної перекисації») є загальним ключовим фактором, який опосередковує ушкодження мембранних структур органів і тканин при різноманітних захворюваннях. Виходячи з цього, справедливим є запровадження за кордоном термін «вільнорадикальна патологія» [10]. З другого боку, важливо мати надійні засоби корекції процесів ПОЛ. На жаль, сьогодні існує мало лікарських засобів зі специфічною антирадикальною дією. Відомі препарати, як правило, включають у спектр своєї фармакологічної активності, в тій чи іншій мірі, виражену антирадикальну дію. Зважаючи на те, що синтезовані та рекомендовані до вивчення нові біологічно активні речовини (БАР) — похідні оксіетилідендифос-

фонатогерманатів — МІГУ-4, або нікогерм (похідне оксіетилідендифосфонові кислоти (ОЕДФ), германію та нікотинової кислоти); МІГУ-5, або гермамід (ОЕДФ, германію і нікотинамід); та МІГУ-6, або гермакорд (ОЕДФ, германію та магнію), мають виражену мембранотропну дію [11], доцільно було вивчити їх вплив на процеси ПОЛ. Виходячи з викладеного, метою даної роботи було вивчення процесів перекисації ліпідів при галактозаміновому ураженні печінки та можливість їх корекції запропонованими новими БАР — комплексними сполуками ОЕДФ та біолігандів — германію, нікотинової кислоти, нікотинамідом й елемента магнію.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведені на 207 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г, які знаходилися на утриманні у стандартних умовах віварію. Тварини були розподілені на 5 груп. До 1-ї групи увійшли тварини з галактозаміновим гепатитом (ГАГ) і до вільним відновленням показників, які вивчалися; до 2-ї — ГАГ на фоні введення МІГУ-4; до 3-ї — ГАГ на фоні введення МІГУ-5; до 4-ї — ГАГ на фоні введення МІГУ-6; до 5-ї — ГАГ на фоні введення гептралу. Кожна група розподілялася на підгрупи по 9 тварин залежно від часу відновлення показників. Спричинювали ГАГ раніше описаним методом [12]. Досліджували БАР вводили внутріш-

ньоочеревинно у раніше відпрацьованих дозах: МІГУ-4 — 17 мг/кг, МІГУ-5 — 28 мг/кг, МІГУ-6 — 18,5 мг/кг, гептрал — 10 мг/кг маси. Вводили БАР профілактично-лікувальним методом: 7 діб до введення гепатотоксину і 7 діб після його застосування. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин у відповідному об'ємі.

Стан ПОЛ, яке відбувалось у тканинах тварин при розвитку токсичного гепатиту, визначали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК), які з'являються на початкових стадіях пероксидації, та вмістом малонового діальдегіду (МДА) — одного з найбільш важливих кінцевих продуктів. Кількісне визначення дієнної кон'югації ненасичених жирних кислот проводили за методом В. А. Костюка зі співавторами [13]. Принцип методу полягав в екстракції ліпідів гептанізопропаноловою сумішшю (1:1) з наступним розшаруванням двох фаз 0,1 N розчином HCl і спектрофотометричним визначенням продуктів ПОЛ у гептановому шарі при

довжині хвилі 233 нм. Як контроль використовували проби, які містять тільки екстрагуючу фазу. Для екстракції відповідних ліпідів використовували 50 мг тканини печінки чи 0,5 мл еритроцитарної суспензії експериментальних тварин. Вміст ДК розраховували за формулою:

$$E_{233/\text{мл еритроцитів}} = \frac{D_{233} \cdot V_{\Gamma}}{V_{\text{ер}}} \quad (\text{для еритроцитів});$$

$$E_{233/\text{мг тканини печінки}} = \frac{D_{233} \cdot V_{\Gamma}}{N} \quad (\text{для тканини печінки}),$$

де D_{233} — значення екстинкції СФ; V_{Γ} — об'єм гептанового екстракту (4,5 мл); $V_{\text{ер}}$ — об'єм еритроцитарної суспензії (0,5 мл); N — маса наважки печінки (50 мг).

Визначення МДА проводили за методом И. Д. Стальной і Т. Г. Гаришвили [14], який полягає у тому, що при високій температурі у кислому середовищі МДА реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого триметанового комплексу з максимумом

поглинання при 532 нм. Кількість МДА у пробі розраховували з використанням величини молярного коефіцієнта екстинкції — $E = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$ за формулою:

$$C = \Delta E \cdot V \cdot K \cdot S,$$

де C — кількість МДА у пробі в мілімолях на літр для еритроцитів і в мікромолях на грам для тканини печінки; ΔE — показник екстинкції ФЕК; V — об'єм проби в кюветі (3,75 мл для крові та 7 мл для печінки); K — коефіцієнт розведення для крові або концентрація тканини для печінки.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою ІВМ з використанням програм "Statgraf".

Результати дослідження та їх обговорення

Як продемонстрували дослідження, галактозаміновий гепатит індукував ПОЛ у мембранах еритроцитів (МЕ) та у печінці (ПЧ) щурів, про що свідчать відповідні зміни вмісту ДК та МДА (таблиця). Через

Таблиця

Динаміка змін вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів у мембранах еритроцитів і печінці щурів при галактозаміновому гепатиті та довільному відновленні, $n=9$

Умови експерименту, дози, мг/кг	Стат. показники	ДК		МДА	
		еритроцит. маса ($E_{233}/\text{мл}$)	печінка, ($E_{233}/\text{мг}$)	еритроцит. маса, ммоль/л	печінка, мкмоль/г
Контроль	$M \pm m$	2,74±0,17	0,067±0,005	3,147±0,161	1,202±0,068
	%	100,0	100,0	100,0	100,0
Гепатит (1-ша доба)	$M \pm m$	6,37±0,31	0,124±0,009	5,309±0,142	2,773±0,051
	% (2-1)	232,5*	185,1*	168,7*	230,7*
Гепатит (2-га доба)	$M \pm m$	6,89±0,37	0,152±0,011	6,184±0,135	3,230±0,059
	% (3-1)	251,5*	226,8*	196,5*	268,7*
Гепатит (3-тя доба)	$M \pm m$	4,37±0,20	0,116±0,008	4,827±0,098	2,555±0,061
	% (4-1)	159,5*	173,2*	153,4*	212,6*
Гепатит (5-та доба)	$M \pm m$	3,75±0,19	0,106±0,007	4,368±0,109	2,230±0,047
	% (5-1)	136,9*	158,2*	138,8*	185,5*
Гепатит (7-ма доба)	$M \pm m$	3,09±0,15	0,088±0,006	3,106±0,110	1,934±0,055
	% (6-1)	112,8	131,3*	98,8	160,9*
Гепатит (10-та доба)	$M \pm m$	3,14±0,18	0,078±0,007	3,458±0,121	1,431±0,039
	% (7-1)	114,6	116,4	109,9	119,0

Примітка. * — вірогідність при $P < 0,05$.

1 добу після затравки тварин вміст ДК у МЕ та ПЧ шурів відповідно збільшувався на 232,5 та 185,1 % ($P < 0,05$). Паралельно на 168,7 та 230,7 % ($P < 0,05$) збільшувався вміст МДА. Накопичення продуктів пероксидації ліпідів з часом продовжувалося й досягло максимальних показників у кінці 2-ї доби розвитку токсичного гепатиту. Так, вміст ДК у МЕ та ПЧ відповідно дорівнював 251,5 і 226,8 % ($P < 0,05$), а МДА — 196,5 і 268,7 % ($P < 0,05$). Починаючи з кінця 2-ї доби вміст продуктів ПОЛ поступово зменшувався; ДК і МДА у МЕ при довільному відновленні досягали контрольних величин на 7-му добу дослідження, а у печінці — на 10-ту добу (див. таблицю). Таким чином, у даній серії досліджень було встановлено, що галактозаміновий гепатит спричинював суттєву активацію ПОЛ у МЕ та ПЧ, що стало підґрунтям для вивчення впливу нових БАР на процеси пероксидації ліпідів.

Курсове профілактично-лікувальне введення БАР продемонструвало, що вони гальмували пероксидацію ліпідів. Введення похідного нікотинової кислоти — МІГУ-4 не виявило зрушень вмісту ДК і МДА, тобто МІГУ-4 повністю запобігав накопиченню продуктів ПОЛ, що свідчить про його виражену антирадикальну дію (рисунок). Причому визначення вмісту ДК і МДА впродовж наступних 3 діб не виявило ніяких відхилень від контрольних величин.

Введення МІГУ-5 — похідного нікотинаміду — теж продемонструвало його превентивну дію на підвищення вмісту продуктів ПОЛ. Проте його вплив на показники, що вивчаються, був дещо меншим, ніж МІГУ-4. Підвищення вмісту ДК і МДА у МЕ і ПЧ шурів на фоні введення МІГУ-5 спостерігалось протягом 1 і 2-ї доби після затравки тварин, хоча це підвищення не було таким критичним, яким воно було без введення БАР. Ми зазначили, що при довільному відновленні вміст

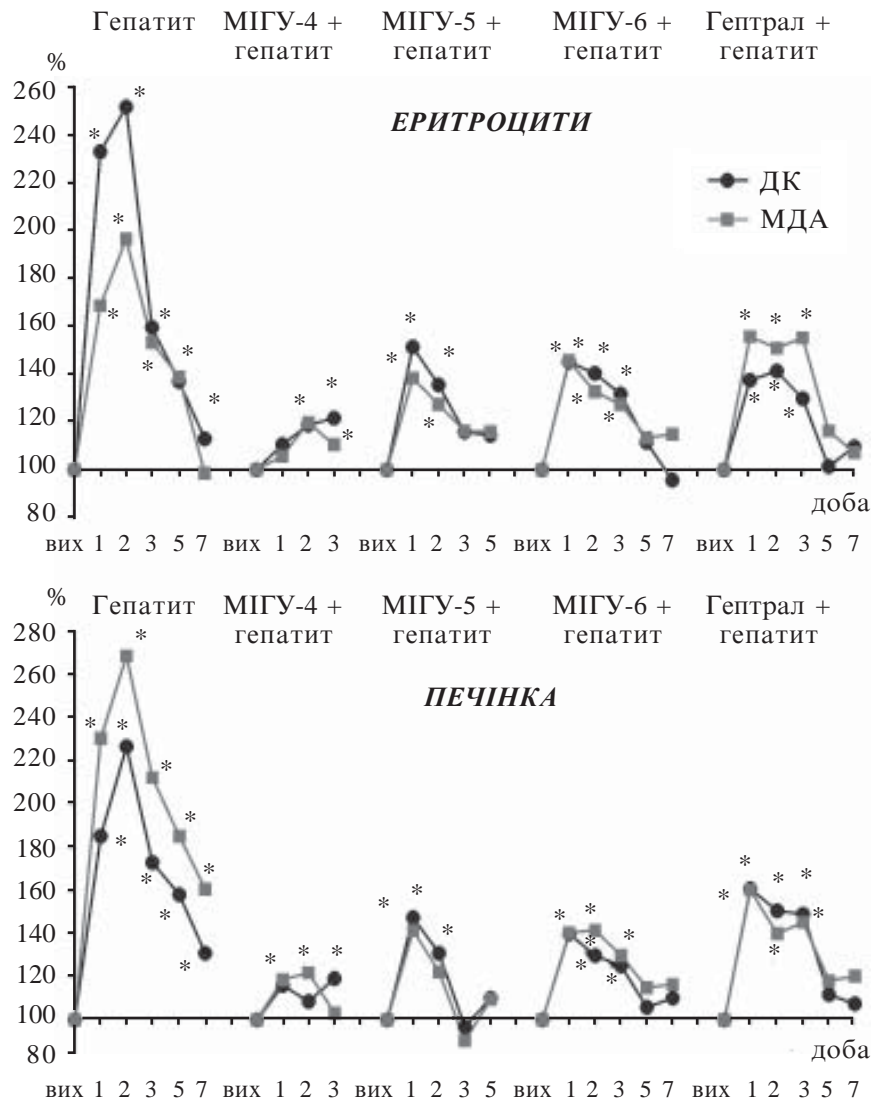


Рисунок. Вплив біологічно активних речовин на вміст дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду в мембранах еритроцитів і печінці шурів в умовах галактозамінового гепатиту (відсоток відносно контролю)

ДК і МДА збільшувався у 2,5–2 рази, а при введенні МІГУ-5 — тільки у 1,5 рази. Важливим є і те, що на 3-тю добу спостереження показники, що вивчаються, не відрізнялися від контрольних величин і залишалися такими протягом наступних 2–3 діб дослідження (див. рисунок).

Антирадикальні властивості проявив також МІГУ-6. Його введення запобігало різкому збільшенню вмісту ДК і МДА. За силою впливу цей ефект можна порівняти з МІГУ-5, тобто збільшення ДК і МДА не перевищувало 1,5 рази від вихідних даних. Проте повна нормалізація вмісту продуктів ПОЛ спо-

стерігалася на 5-ту добу і продовжувала зберігатися далі (див. рисунок).

Таким чином, усі БАР, які досліджувалися, виявили виражені антирадикальні властивості, що полягали у запобіганні накопиченню продуктів ПОЛ — ДК і МДА у мембранах еритроцитів і печінці тварин. За силою фармакологічного ефекту ці БАР розташовуються у такій послідовності: МІГУ-4 > МІГУ-5 > МІГУ-6.

Важливою характеристикою дії цих БАР було їх порівняння з дією гепатопротектора гептралу, який нами досконально вивчений.

Результати дослідження свідчать, що за антирадикальною дією (за вираженістю ефекту та часом відновлення) гептрал не відрізнявся від МІГУ-6, проте значно поступався МІГУ-5 і особливо МІГУ-4.

Таким чином, у похідних ОЕДФ із біолігандами виявлено виражені антирадикальні властивості, які слід детальніше дослідити за допомогою інших методичних прийомів.

Висновки

1. Галактозаміновий гепатит суттєво стимулює процеси пероксидації ліпідів у мембранах еритроцитів і печінці щурів. Найбільш виражені зміни відбуваються у кінці 2-ї доби спостереження, коли вміст ДК і МДА збільшувався майже у 2,5–2 рази. Ці зміни спостерігалися як у мембранах еритроцитів, так і у печінці і за вираженістю були майже однаковими.

2. Спостереження за довільним відновленням вмісту продуктів ПОЛ показало, що у МЕ ДК і МДА досягали контрольних величин на 7-му добу, а у печінці — на 10-ту добу. Ці дані послужили підставою для вивчення впливу нових БАР на процеси пероксидації ліпідів при галактозаміновому гепатиті.

3. Усі БАР, які досліджувалися, виявили виражені антирадикальні властивості, що полягали у запобіганні накопиченню продуктів ПОЛ при галактозаміновому гепатиті.

4. За силою фармакологічного впливу синтезовані БАР можна розмістити так: МІГУ-4 > МІГУ-5 > МІГУ-6. Повністю запобігав зрушенню вмісту ДК і МДА, які спостерігалися при гепатиті, МІГУ-4; МІГУ-5 відновлював їх вміст на 3-тю добу спостереження, а МІГУ-6 — на 5-ту добу.

5. Важливою характеристикою дії МІГУ-5 і 6 було те, що вони запобігали різкому збільшенню продуктів ПОЛ у 1,5 рази, тимчасом як при нелікованому гепатиті воно досягало 2,5–2 рази.

6. Порівняльний аналіз антирадикальних властивостей БАР і препарату порівняння показав, що МІГУ-6 не відрізнявся від гептралу за вираженістю ефекту та часом відновлення, проте МІГУ-5 і, особливо, МІГУ-4 суттєво його перевершували.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
2. Кучеренко Н. Е., Васильев А. Н. Липиды. — К.: Вища шк., 1985. — 247 с.
3. Кольман Я., Рем К. Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. — М.: Мир, 2000. — 469 с.
4. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В. К. Казимирко, В. И. Мальцев, В. Ю. Бутылин, Н. И. Горобец. — К.: Морион, 2004. — 160 с.
5. Губский Ю. И. Коррекция химического поражения печени. — К.: Здоров'я, 1989. — 168 с.

6. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических поврежденных сердца. — М.: Медицина, 1984. — 272 с.

7. Мансурова Ф. Х., Мухомова Х. Ш., Олимова С. О. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у больных хроническим поражением печени HCV вирусной этиологии // Пробл. ГАЭЛ. — 2004. — № 1-2 (26). — С. 34-37.

8. Логинов А. С., Матюшин Б. Н. Свободные радикалы в хронической патологии печени // Арх. патологии. — 1991. — Т. 53, № 6. — С. 75-79.

9. Richter C., Kass G. E. N. Oxidative stress in mitochondria: Its relationship to cellular Ca homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation // Chem.-Biol. Interact. — 1991. — Vol. 77. — P. 1-23.

10. Rosser B. G., Gores G. J. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications // Gastroenterology. — 1995. — Vol. 108. — P. 252-275.

11. Годован В. В., Кресюн В. Й. Патогенетичні механізми гепатозахисної дії нових похідних нікотинової кислоти та нікотинаміду // Інтегративна антропологія. — 2007. — № 1. — С. 61-68.

12. Годован В. В., Кресюн Н. В. Галактозаміновий гепатит як модель вивчення морфофункціональних порушень клітинних мембран // Одес. мед. журнал. — 2005. — № 3. — С. 11-15.

13. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунец Е. Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов // Вопр. мед. химии. — 1984. — Т. 30, № 4. — С. 125-127.

14. Стальная И. Д., Гаршивили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии: Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 66-68.

УДК 547.419.5:577.164.15:616.36

В. В. Годован, В. Й. Кресюн

КОРЕКЦІЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ПРИ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ НОВИМИ КОМПЛЕКСНИМИ СПОЛУКАМИ ГЕРМАНІЮ З БІОЛІГАНДАМИ

У статті наведено дані з вивчення впливу нових БАР класу оксіетилідендифосфонатогерманатів (з нікотиновою кислотою — МІГУ-4, нікотинамідом — МІГУ-5 і магнієм — МІГУ-6) на перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) при галактозаміновому гепатиті у щурів. Дослідження показали, що всім сполукам притаманні виражені антирадикальні властивості, що вони запобігають накопиченню продуктів пероксидації ліпідів. За силою фармакологічного впливу дані БАР можна розташувати в такій послідовності: МІГУ-4 > МІГУ-5 > МІГУ-6. Порівняльний аналіз їх антирадикальних властивостей і гепатопротектора гептралу показав, що за вираженістю ефекту і часом відновлення показників ПОЛ (дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду), що вивчаються, МІГУ-6 не відрізнявся від препарату порівняння, а МІГУ-5 і особливо МІГУ-4 суттєво його перевищували.

Ключові слова: оксіетилідендифосфонатогерманати, галактозаміновий гепатит, перекисне окислення ліпідів.

UDC 547.419.5:577.164.15:616.36

V. V. Godovan, V. Y. Kresyun

CORRECTION OF PEROXIDATIVE OXIDATION OF LIPIDS AT TOXIC HEPATITIS BY NEW COMPLEX COMPOUNDS OF GERMANIUM WITH BIOLIGANDS

The article gives the information on the influence of new BAS of oxyethylidendiphosphonate germanate (with nicotine acid — MIGU-4, with nicotinamide — MIGU-5 and magnesium — MIGU-6) on peroxidative oxidation of lipids (POL) at galactosamine hepatitis are presented. Researches showed that all compounds possess the expressed antiradical properties, preventing accumulation of peroxydative products. According to strength of the pharmacological action the BAS can be disposed in the following sequence: MIGU-4 > MIGU-5 > MIGU-6. The comparative analysis of antiradical properties of BAS and hepatoprotector heptrale showed that according to expression of the effect and time of recovery of the studied indices POL (dienic conjugates and malonate dialdehyde) MIGU-6 did not differ from preparation of comparison, and MIGU-5 and especially MIGU-4 substantially excelled it.

Key words: oxyethylidendiphosphonate germanate, galactosamine hepatitis, peroxidative oxidation of lipids.