

А. К. Вороніна¹, Г. І. Борщевський²

Гепатопротекторна ефективність препарату Лесфаль за експериментального гепатиту в щурів

¹ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ²ПАТ «Фармак», м. Київ

Ключові слова: гепатит, есенціальні фосфоліпіди, Лесфаль

Численні епідеміологічні дослідження свідчать про наявність безпосереднього причинно-наслідкового зв'язку хімічного забруднення довкілля та зростання порушень з боку основних органів та систем, серед яких захворюванням печінки належить питома вага. Незважаючи на те, що хвороби гепатобіліарної системи внаслідок дії хімічних сполук як токсикологічна проблема розглядаються вже понад 100 років [1], вони залишаються актуальними й нині.

При захворюваннях печінки та інших органів часто порушується не тільки зовнішньо секреторна функція, а й інші функції печінки, що негативно впливають на перебіг захворювання. Тому виникає потреба у використанні лікарських засобів, яким притаманний широкий спектр гепатопротекторної дії. У зв'язку з цим слід відзначити лікарські засоби, в основі яких лежать есенціальні фосфоліпіди [2, 3].

Роль фосфоліпідів у реалізації їхньої гепатопротекторної дії зумовлена здатністю забезпечувати біологічну активність зв'язаних з мембранами білків і рецепторів, регулювати метаболічні процеси між внутрішньоклітинним і міжклітинним простором, брати участь у синтезі ейкозаноїдів тощо.

Експериментальні та клінічні результати підтверджують припущення, що фосфоліпіди проявляють захисну, лікувальну та регенеративну дію стосовно біологічних мембран ендотеліальних клітин синусів і гепатоцитів.

ПАТ «Фармак» створено ін'єкційний препарат на основі есенціальних фос-

фоліпідів. Розроблена технологія дозволяє отримувати гомогенний препарат у вузькому діапазоні наночастинок, із зменшеним вмістом етанолу, що підвищує стабільність препарату на основі есенціальних фосфоліпідів.

Мета дослідження – оцінка гепатопротекторної ефективності препарату Лесфаль виробництва ПАТ «Фармак» на моделі експериментального гепатиту та обґрунтування доцільності його застосування в клініці.

Матеріали та методи. Препарат Лесфаль (розчин для ін'єкцій) містить субстанцію «Есенціальних фосфоліпідів». Експериментальне дослідження виконано на білих статевозрілих щурках-самцях (*Rattus norvegicus*). Лабораторні тварини були надані ПП «Біомодель-сервіс» (м. Київ). Термін акліматизації склав 7 днів.

Тваринам згодовували *ad libitum* стандартний раціон для лабораторних тварин, що постачався фірмою «Phoenix» («Фенікс», Україна). Вода із міського водогону (після оберненого осмосу й стерилізації УФ-випромінюванням) подавалася *ad libitum*. Для підстилки використовували попередньо автоклавовану тирсу вільхи (*Alnus glutinosa*).

У кімнатах для утримання тварин підтримували наступні умови: температура – 20–24 °С, вологість – 30–70 %, цикл освітлення – 12 год світло/12 год темрява.

З метою вивчення гепатопротекторної ефективності препарату Лесфаль виробництва ПАТ «Фармак» щурів було розподілено на три групи по 10 тварини у кожній: перша – контрольна, тваринам якої вводили розчинник (вода для ін'єкцій); у щурів другої

групи моделювали токсичний гепатит шляхом внутрішньочеревинного введення протягом 7 днів 50 % олійного розчину тетрахлорметану (ТХМ) у дозі 0,5 мл/кг маси тіла [4]; третя група — те саме, що й для попередньої групи, але додатково за 2 год до введення розчину ТХМ протягом 7 днів та 3 днів після припинення експозиції ТХМ щурам внутрішньочеревинно вводили Лесфаль у дозі 44,26 мг/кг маси тіла. Протягом усього експерименту спостерігали за станом тварин, їхнім зовнішнім виглядом та поведінкою.

Через 24 год після останнього введення Лесфалю під легким ефірним наркозом брали кров зі стегнової вени та піддавали евтаназії методом цервікальної дислокації.

Печінку відмивали через воротну вену 1 % розчином KCl та гомогенізували в 0,05М Трис-HCl буфері (pH 7,5). Усі процедури виконували з дотриманням холодого режиму ($t +4^{\circ}\text{C}$).

Активність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у печінці досліджували, оцінюючи швидкість накопичення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти) за методом І. Д. Стальної та Т. Г. Гаришвілі [5].

Білок у гомогенаті печінки визначали за методом О. Н. Lowry [6].

Активність аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ), а також вміст білірубину, холестерину в сироватці крові досліджували на біохімічному аналізаторі Prestige 24i (Японія), використовуючи тести фірми Cormay, Польща.

Тканину печінки досліджували традиційними гістологічними методами. Препарати фарбували гематоксиліном і еозином. На заморожених зрізах виявляли нейтрофільний жир Суданом чорним В. Мікроскопію і мікрофотографування проводили за допомогою мікроскопа OLIMPUS BX41. Статистичну обробку результатів проводили методом варіаційної статистики з визначенням t -критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Дані біохімічних показників сироватки крові щурів з тетрахлорметановим гепатитом

та результати застосування Лесфалю наведено в таблиці 1. За даної моделі токсичного гепатиту спостерігали збільшення вмісту загального білірубину в сироватці крові щурів майже в 2,6 разу порівняно з контрольними тваринами. Введення Лесфалю значною мірою сприяло нормалізації вмісту білірубину, який зменшився на 43 % порівняно з даним показником у тварин з експериментальним гепатитом. У сироватці крові нелікованих тварин на 35 % збільшився вміст холестерину відносно щурів контрольної групи. У тварин, що отримували Лесфаль, даний показник залишився на рівні контролю.

У результаті проведених досліджень нами також встановлено, що в сироватці крові щурів за умов введення ТХМ активність АлАТ і АсАТ збільшилася відповідно в 1,9 та 1,3 разу порівняно з контролем. Це свідчить про активацію маркерних ферментів цитолізу при введенні гепатотоксину і зростання некрозодистрофічних порушень у гепатоцитах. Також за умов введення ТХМ відмічалось значне зниження коефіцієнта де Рітца (АсАТ/АлАТ) – на 29 %, що характеризує високий ступінь ураження печінки. Застосування Лесфалю за умов гострого токсичного гепатиту сприяло зниженню активності АлАТ на 35 %, а АсАТ на 12 % (табл. 2), співвідношення АсАТ/АлАТ було на рівні контролю.

Збільшення лужнофосфатазної активності сироватки крові в 1,3 разу при введенні гепатотоксинів вказує на розвиток холестаза. При лікувально-профілактичному введенні Лесфалю активність лужної фосфатази значно зменшилась, хоча й не досягла рівня контролю.

Визначення активності ГГТ має велике значення для діагностування захворювань печінки. У групі з експериментальним гепатитом даний показник збільшився в 5,6 разу порівняно з контролем. У тварин, що отримували Лесфаль, активність ГГТ знизилася майже в 3 рази порівняно з нелікованими щурами, що разом з рівнем активності АлАТ, АсАТ і ЛФ є доказом гепатопротекторної активності даного препарату.

Деякі біохімічні показники сироватки крові щурів-самців за умов ТХМ-індукованого гепатиту та внутрішньочеревинного застосування Лесфалю в дозі 44,26 мг/кг протягом 10 днів ($M \pm t, n \geq 6$)

| Показник | Експериментальна група | | |
|------------------------------|------------------------|------------------|----------------------|
| | Контроль | ТХМ | ТХМ + Лесфаль |
| Загальний білірубін, ммоль/л | 1,88 ± 0,18 | 4,8 ± 0,6* | 2,72 ± 0,3*. ** |
| Холестерин, ммоль/л | 1,66 ± 0,09 | 2,20 ± 0,05 * | 1,67 ± 0,13 ** |
| Активність АлАТ, МО/л | 63,44 ± 3,35 | 119,45 ± 12,77* | 77,82 ± 6,10 ** |
| Активність АсАТ, МО/л | 157,00 ± 8,16 | 210,82 ± 13,44* | 186,55 ± 7,33*. ** |
| Коефіцієнт де Рітіса | 2,47 | 1,76 | 2,4 |
| Активність ЛФ, МО/л | 280,66 ± 15,08 | 352,76 ± 26,43 * | 209,61 ± 19,02 *. ** |
| Активність ГГТ, МО/л | 0,29 ± 0,12 | 1,63 ± 0,20 * | 0,59 ± 0,18 ** |

Примітка. Тут і в табл. 1, 2: *вірогідні зміни порівняно з контролем;

**вірогідні зміни порівняно з групою нелікованих тварин.

Таблиця 2

Швидкість аскорбатзалежного утворення продуктів ПОЛ у печінці самців щурів за умов ТХМ-індукованого гепатиту та внутрішньочеревинного застосування Лесфалю в дозі 44,26 мг/кг протягом 10 днів ($M \pm t, n \geq 6$)

| Показник | Експериментальна група | | |
|------------------------------------|------------------------|----------------|-----------------|
| | Контроль | ТХМ | ТХМ + Лесфаль |
| ТБК - реактанти, нмоль/хв*мг білка | 0,301 ± 0,019 | 0,350 ± 0,008* | 0,285 ± 0,014** |

Лікувально-профілактичне застосування Лесфалю сприяло суттєвій нормалізації швидкості аскорбатзалежного утворення продуктів взаємодії з тіобарбітуровою кислотою, що є критерієм стану ПОЛ у печінці.

Згідно з даними, представленими в таблиці 2, швидкість аскорбат-залежного утворення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою в печінці нелікованих щурів збільшувалась на 16 % порівняно з контролем.

При зовнішньому огляді щурів контрольної та дослідних груп ознак патологічних змін виявлено не було. Тварини залишалися активними, шерстний та шкірний покрови чисті, ознак ушкоджень, запальних гіперпластичних відхилень не спостерігали. Очі, ніс, губи та зовнішні статеві органи нормальної будови. На слизових оболонках ознак ушкоджень та запальних уражень також не спостерігали.

При розтині цих тварин серозні оболонки плевральної та навколосерцевої порожнин були гладенькими, блискучими, без проявів ушкоджень та запалення, кількість вільної серозної рідини в порожнинах не збільшена.

Що стосується черевної порожнини, то в усіх тварин, яким вводили, досліджуваний препарат на фоні експериментального гепатиту, індукованого ТХМ, у вісцеральній серозній оболонці очеревини печінки спостерігалася запальна реакція, що супроводжувалась адгезією часток печінки. Якщо у тварин контрольної групи край органу були конусоподібної форми, то в дослідних тварин вони були закруглені, а печінка – з коричневато-жовтуватим відтінком.

При мікроскопічному дослідженні оглядових препаратів печінки контрольних і дослідних тварин порушень гістоархітекτονіки органу не спостерігали. Тканина мала характерний часточковий малюнок. Гепатоцити, в основному, з незмінними властивостями, у більшості мали полігональну форму з чіткими контурами. У цитоплазмі паренхіматозних клітин виявлялися базофільні брилки, ядра круглої форми, з дрібним хроматином, у них розміщувались по 1–2 ядерця. Вісцеральна очеревина та фіброзна капсула печінки в 70 % випадків у групі тварин з гострим гепатитом і в 60 % при застосуванні Лесфалю були осередковані потовщені,

розрихлені й інфільтровані гістіоцитами, лімфоцитами. У цих тварин під капсулою виявляли значно збільшені за розміром кулеподібні гепатоцити з зернистою чи оптично пустою цитоплазмою. Ядра в таких клітинах були невеликих розмірів з щільною каріоплазмою, ядерця в них не визначалися.

У печінці нелікованих тварин та щурів, яким вводили Лесфаль, у цитоплазмі гепатоцитів виявляли вакуолі. При фарбуванні Суданом чорним В у паренхіматозних клітинах контрольних тварин реакція на жир була негативною, тоді як у тварин дослідних груп реакція на ліпіди була позитивною.

Застосування Лесфалю сприяло зменшенню ознак жирової інфільтрації гепатоцитів, де переважали дрібні та середні ліпідні включення.

Слід відзначити, що в усіх тварин з тетрахлорметановим гепатитом та у деяких тварин, яким вводили Лесфаль, поряд з незмінними ядрами подекуди зустрічали поодинокі, значно збільшені за розміром ядра. Хроматинові зерна в них були грубими, розміщувалися дифузно по каріоплазмі чи поблизу кардіолеми.

У печінкових часточках інфільтрація мала дифузний характер. Це свідчить про наявність хронічної форми запального процесу. У деяких тварин дослідних груп зрідка зустрічалися

гепатоцити з ознаками альтерації, цитоплазма їхня була еозинофільною, ядра були деформовані чи лізовані. Спостерігали також осередки повнокрів'я міжчасточкових вен і синусоїдів, у просвіті останніх відмічали збільшену кількість мононуклеарів. Зірчасті ретикулоендотеліоцити осередковано були активними, ядра їх збільшені за розміром, витягнуті форми, інтенсивно фарбувалися гематоксиліном.

Таким чином, за даних умов експерименту в нелікованих щурів з експериментальним гепатитом виявлена значна запальна реакція в капсулі і вісцеральній очеревині печінки, тоді як при застосуванні Лесфалю вона спостерігалася в меншій кількості тварин і носила осередкований характер.

Також, у тварин, які отримували Лесфаль, ознаки жирової інфільтрації гепатоцитів спостерігалися в меншому ступені, переважали дрібні та середні ліпідні включення порівняно з нелікованими тваринами.

На моделі токсичного ураження печінки тетрахлоретаном встановлено, що згідно з даними біохімічного аналізу маркерів пошкодження печінки в сироватці крові та морфологічних досліджень печінки препарат Лесфаль виробництва ПАТ «Фармак» проявляє гепатопротекторну ефективність.

1. Zimmerman H. J. Hepatotoxicity // Appleton-Century-Crofts / H. J. Zimmerman. – 1978. – New-York.
2. Григоренко Е. И. Опыт лечения больных с алкогольным и неалкогольным стеатогепатитом препаратом «Энерлив» / Григоренко Е. И., Левченко М. В., Пуздря Е. Г. // Крымский терапевтический журнал. – 2008. – № 2. – С. 4–9.
3. Короткий В. Н. Эссенциальные фосфолипиды в комплексном лечении больных с печеночной недостаточностью, вызванной длительной механической желтухой / Короткий В. Н., Колосович И. В., Чегусов В. В. // Медицина сегодня. – 2008. – № 10 (245).
4. Uma Maheswari M. Antihepatotoxic effect of grape seed oil on rat / Uma Maheswari M, Rao PG M. // Journal of Applied Sciences and Environmental Management. – V. 9, № 3. – P. 77–80.
5. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Стальная И. Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биологии: под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
6. Protein measurement with Folin phenol reagent / Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.

А. К. Воронина, Г. И. Борщевский **Гепатопротекторная эффективность препарата Лесфаль при экспериментальном гепатите у крыс**

Острые и хронические заболевания печени являются важными причинами заболеваемости и смертности во всем мире. Обычные медицинские методы лечения многих таких заболеваний имеют ограниченную эффективность. Целью данного исследования было оценить гепатопротекторное действие препарата Лесфаль производства ПАО «Фармак» на модели экспериментального гепатита у крыс, вызванного четыреххлористым углеродом (CCl₄). Было установлено, что препарат

Лесфаль проявил гепатопротекторное действие, приводя к снижению активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и гамма-глутамил трансферазы, а также к нормализации уровня билирубина и холестерина. Гепатопротекторная активность была также подтверждена результатами гистологического исследования ткани печени.

Ключевые слова: гепатит, эссенциальные фосфолипиды, Лесфаль

A. K. Voronina, G. I. Borshchevskiy

Hepatoprotective efficiency L'esfal in rats with experimental hepatitis

Acute and chronic liver diseases are important causes of morbidity and mortality worldwide. Conventional medical therapies for many of these diseases have limited efficacy. The aim of this study was to evaluate the hepatoprotective action of L'esfal produced by «Farmak» for liver damage in rat induced by carbon tetrachloride(CCl_4). It was found that the L'esfal exhibited moderate hepatoprotective effect as confirmed by lowering the serum activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and gamma-glytamil transferase and normalize bilirubin and cholesterol levels. The hepatoprotective activity was also supported by histopathological studies of liver tissue.

Key words: hepatitis, ессенціальні фосфоліпиди, L'esfal

Надійшла: 07.02.2013 р.

Контактна особа: Вороніна Алла Костянтинівна, кандидат біологічних наук, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680.
Тел.: +38 0 44 456 78 65. Електронна пошта: alla_voronina@ukr.net