



УДК 616-005.4: 615.217.34:547.756

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ СПИРОЦИКЛИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО ОКСИНДОЛА В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ИШЕМИИ ПЕЧЕНИ

Н.А. ЦУБАНОВА
С.Ю. ШТРЫГОЛЬ

Национальный фармацевтический университет Украины, Харьков

e-mail: tsubanova@rambler.ru

Изучено влияние спироциклического производного оксиндола в дозе 5 мг/кг и препаратов сравнения вита-мелатонина (5 мг/кг) и тиотриазолина (48 мг/кг), на летальность животных, активность цитолиза, свободнорадикальное окисление и функциональную активность печени в условиях острой экспериментальной ишемии.

Установлено выраженное антиоксидантное, антицитолитическое действие спироциклического производного оксиндола в дозе 5 мг/кг. Установлено, что суммарная гепатопротекторная активность нового соединения превышает активность препаратов сравнения вита-мелатонина и тиотриазолина.

Ключевые слова: спироциклическое производное оксиндола, острая ишемия печени, гепатопротекторное действие

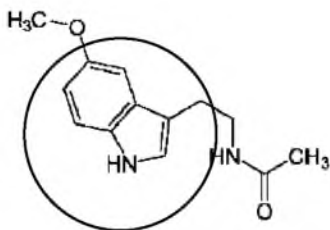
По статистике ВОЗ более 30% взрослого населения Земли страдает теми или иными заболеваниями печени. Согласно данным МЗ РФ, более 4 тысяч человек умирают ежегодно от причин, обусловленных заболеваниями печени [1].

Одной из тяжелейших патологий печени является гипоксический гепатит (ГГ), он же ишемический гепатит или шок печени. По данным зарубежных авторов [2], ГГ признан наиболее частой причиной острого повреждения печени у реанимационных больных, с распространенностью до 10% [3]. Пациенты с признаками острой печеночной гипоксии/ишемии имеют значительно больший риск смертности [4]. Уровень госпитальной летальности от ГГ составляет 61,5%, при этом перечень лекарственных препаратов для оптимальной фармакокоррекции этой патологии является недостаточным.

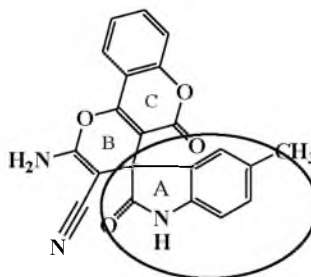
Сложность механизмов развития ишемического поражения печени исключает монотерапию в связи с недостаточностью воздействия только на одно звено патологического каскада, а отсутствие эффективных препаратов политропного действия обуславливает необходимость назначения лекарственных комбинаций, при которых возрастает риск развития негативного действия [6].

Актуальным направлением в современной медицине и фармации является создание, изучение и внедрение в медицинскую практику лекарственных препаратов с полиорганным действием, а именно антигипоксическим, гепатопротекторным и способностью восстанавливать энергетический метаболизм в поврежденных клетках печени при лечении и профилактике ишемических и реперфузионных повреждений ткани печени и ее микроциркуляторного русла.

Перспективным соединением в этом аспекте можно рассматривать новое вещество – 4,3'-спиро[(2-амино-3-нитрил-4,5-дигидропирано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол], в дальнейшем соединение 77, которое по строению ядра молекулы (4Н-пирано[3,2-с]хромен) является структурным аналогом мелатонина и было синтезировано в НФаУ к.ф.н. Редькиным Р.Г., проф. Шемчуком Л.А. (рис.).



а



б

Рис. Химическая структура мелатонина (а) и 4,3'-спиро[(2-амино-3-нитрил-4,5-дигидропирано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндола] (б), обведено структурное ядро молекул.



В предыдущих исследованиях установлено, что это соединение 77 является лидером среди 29 спироциклических производных оксиндола по антигипоксическому действию [7]. Также для соединения 77 установлена гепатопротекторная активность на модели острого токсического (тетрахлорметанового) гепатита [8].

Цель исследования – выяснить влияние спироциклического производного оксиндола на выживаемость животных, биохимические показатели функционального состояния печени в условиях острой печеночной ишемии.

Материалы и методы. Исследования проводили на крысах массой 180-240 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами GLP. При работе исполняли требования Директивы Совета ЕС по вопросам защиты животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей.

Острую ишемию печени моделировали под тиопентал-натриевым наркозом (35 мг/кг) путем наложения специального зажима на сосудистую ножку печени и желчевыводящий проток. Оклюзия продолжалась 25 мин. Животные были распределены на следующие группы:

1. Псевдооперированные животные (под наркозом вскрывали брюшную полость и препарировали сосудистую ножку печени и желчевыводящий проток, после чего рану послойно ушивали).
2. Контрольная патология (25-минутная окклюзия сосудистой ножки печени и желчевыводящего протока).
3. Животные, которые получали соединение 77 в дозе 5 мг/кг (доза максимального антигипоксического эффекта) ежедневно внутривентрикулярно на протяжении 3 суток, в последний раз за 40 мин до моделирования ишемии.
4. Животные, получавшие препарат сравнения вита-мелатонин (аналог структурного ядра соединения 77) в дозе 5 мг/кг в аналогичном режиме.
5. Животные, которые получали препарат сравнения тиотриазолин (синтетический гепатопротектор) в дозе 48 мг/кг в аналогичном режиме.

Доза вита-мелатонина, как структурного аналога соответствует дозировке изучаемого соединения. Доза тиотриазолина соответствует среднесуточной терапевтической дозе для человека и пересчитана для крыс с использованием коэффициента видовой чувствительности.

Регистрировали выживаемость животных в течение 24 ч, по истечении суток животных выводили из эксперимента (под эфирным наркозом) осуществляли забор биоматериала для биохимических исследований.

Антицитолитическую активность изучаемого соединения и препаратов сравнения оценивали по уровню в сыворотке крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ), о противовоспалительной активности судили по коэффициенту массы печени, о холестазае – по активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в крови. Изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса верифицировали по концентрации в гомогенате печени и сыворотке крови веществ реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК – реактанты), диеновых конъюгатов (ДК), восстановленного глутатиона (ВГ) и активности каталазы.

Также изучали показатели, характеризующие функциональное состояние печени: углеводный обмен – гликоген (гомогенат печени), глюкоза (сыворотка крови), белковый обмен и синтетическая функция – общий белок (сыворотка крови), церулоплазмин (сыворотка крови).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistika 6.0. с использованием критерия Стьюдента и углового преобразования Фишера.

Результаты и их обсуждение. Гепатопротекторную активность спироциклического производного оксиндола и препаратов сравнения оценивали по интегральному показателю – снижению летальности (табл. 1).

При 25-минутной ишемии печени без фармакологической защиты у животных группы контрольной патологии отмечался высокий уровень смертности (64,3%), что достоверно указывало на тяжесть состояния и достоверно превышало показатель у группы псевдооперированных крыс (0%, $p < 0,001$).

Лечебно-профилактическое введение соединения 77 и препаратов сравнения достоверно снижало процент летальности во всех трех опытных группах, однако необходимо отметить, что протекторное действие соединения 77 было максимально выраженным и позволило снизить летальность до 0%, в чем существенно превосходило данный показатель вита-мелатонина (40%, $p < 0,001$) и гепатопротектора тиотриазолина (25%, $p < 0,01$).

Выраженные патологические изменения на фоне острой ишемии печени в группе контрольной патологии верифицированы по увеличению в 1,4 раза коэффициента массы печени, о разрушении клеток свидетельствует рост в 2-2,3 раза активности клеточных ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке крови. Увеличение в 1,8 раза активности щелочной фосфатазы является индикатором синдрома холестаза. (табл. 2).



Таблица 1

Влияние спироциклического производного оксиндола и препаратов сравнения на показатель летальности у крыс с модельной патологией острой ишемии печени (статистическая обработка результатов проведена с использованием углового преобразования Фишера)

№ п/п	Группа	Летальность		Р
		погибло/ всего животных в группе	%	
1	Контроль псевдооперированные, (n=6)	0/6	0	–
2	Контрольная патология – ишемия печени, (n=14)	9/14	64,3	p ₂₋₁ <0,001
3	Соединение 77, 5 мг/кг + ишемия печени (n=8)	0/8	0	p ₃₋₂ <0,001 p ₃₋₄ <0,001 p ₃₋₅ <0,01
4	Вита-мелатонин, 5 мг/кг + ишемия печени (n=10)	4/10	40	p ₄₋₁ <0,001
5	Тиотриазолин, 48 мг/кг + ишемия печени (n=8)	2/8	25	p ₅₋₁ <0,01 p ₅₋₂ <0,05

Таблица 2.

Влияние спироциклического производного оксиндола и препаратов сравнения на коэффициент массы печени и ферментативную активность у крыс с модельной патологией острой ишемии печени (n=6) (статистическая обработка результатов проведена с использованием критерия Стьюдента)

Условия эксперимента	Коэффициент массы печени, %	Ферменты, сыворотка крови		
		АлАТ, мккат/л	АсАТ мккат/л	Щелочная фосфатаза, ммоль/л
Контроль псевдооперированные	3,53±0,13	0,61±0,02	0,58±0,02	1,18±0,11
Контрольная патология – ишемия печени	4,96±0,13 *	1,22±0,06 *	1,32±0,06 **	2,15±0,07*
Соединение 77, 5 мг/кг + ишемия печени	3,90±0,10 # \$\$ ^^	0,69±0,03 # \$\$\$	0,68±0,03 *** # \$\$	1,31±0,08 # \$\$\$
Вита-мелатонин, 5 мг/кг + ишемия печени	4,48±0,07 * ## ^^	0,86±0,05 ** ##	1,03±0,07 *** ###	1,68±0,11 *** ##
Тиотриазолин, 48 мг/кг + ишемия печени	4,21±0,09 ** ##	0,74±0,04 ****##	0,78±0,05 **** \$\$\$	1,43±0,12 #

Примечания:

1. Достоверные отличия с показателями группы псевдооперированного контроля * – p<0,001; ** – p<0,01; *** – p<0,05;
2. Достоверные отличия с показателями группы контрольной патологии # – p<0,001; ## – p<0,01; ### – p<0,05;
3. Достоверные отличия с показателями группы вита-мелатонина \$- p<0,001; \$\$- p<0,01; \$\$\$- p<0,05;
4. Достоверные отличия с показателями группы тиотриазолина ^ – p<0,001; ^^ – p<0,01; ^^ – p<0,05.

Соединение 77 проявило выраженное антицитолитическое действие, достоверно снижая активность ферментов цитолиза в сыворотке крови. Мембранопротекторное действие нового соединения также подтверждается массой печени, которая находится в границах физиологической нормы через сутки после моделирования острой ишемии. Активность щелочной фосфатазы, достоверно не отличающаяся от показателя контрольных псевдооперированных животных, свидетельствует об отсутствии холестаза.

Введение гепатопротектора тиотриазолина и вита – мелатонина достоверно восстанавливали изучаемые показатели относительно группы контрольной патологии, но в некоторых аспектах существенно уступали фармакологической активности спироциклического производного оксиндола.



Острая 25-минутная ишемия печени с последующей реперфузией сопровождалась значительной активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), увеличение уровня ТБК-реактантов и ДК в гомогенате печени и сыворотке крови в среднем в 1,4-2,6 раза, при этом активность антиоксидантной системы (АОС), судя по содержанию ВГ и активности каталазы, снижалась в 1,5-1,8 раза (табл.3).

Соединение 77 проявило выраженное антиоксидантное действие в виде нормализации баланса системы ПОЛ – АОС. Снижение процессов ПОЛ верифицировано по достоверному снижению ТБК-реактантов и ДК. Существенным положительным аспектом реализации антиоксидантного действия соединения 77 является восстановление активности и ферментативного звена системы АОС (содержание ВГ), и ферментативного (активность каталазы). Антиоксидантный эффект спироциклического производного оксиндола достоверно превышает активность вита – мелатонина и тиотриазолина практически по всем показателям.

Таким образом, фармакологическое действие соединения 77 в значительной мере обеспечивается торможением перекисного окисления липидов с одновременным повышением антиоксидантной системы.

Препараты сравнения вита-мелатонин и тиотриазолин достоверно нормализуют дисбаланс системы ПОЛ-АОС относительно группы контрольной патологии.

Маркером снижения белоксинетической функции печени является снижение концентрации общего белка у группы контрольной патологии в 1,3 раза (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние спироциклического производного оксиндола и препаратов сравнения на прооксидантно-антиоксидантный баланс и показатели, характеризующие функциональную активность печени у крыс с модельной патологией острой ишемии печени (n=6) (статистическая обработка результатов проведена с использованием критерия Стьюдента)

Показатель	Условия эксперимента				
	Контроль псевдооперированные	Ишемия печени			
		Контрольная патология	Соединение 77, 5 мг/кг	Вита-мелатонин, 5 мг/кг	Тиотриазолин, 48 мг/кг
Гомогенат печени					
ТБК-реактанты, мкмоль/г	78,8±0,98	208±4,94*	111±4,38 * # \$ ^	172±2,87 * ##	162±6,53 * ## \$\$
ДК, мкмоль/г	5,93±0,36	8,49±0,21**	6,65±0,24 ## ^^	7,57±0,18 ** ###	7,00±0,26 ##
ВГ, усл. ед.	118 ±3,83	72,2± 2,80*	101±1,49 ** # \$\$ ^	82,9±3,06 * ###	91,9±2,87 ** ##
Каталаза, мкат/л	0,37 ±0,02	0,21± 0,02**	0,32±0,01 ** ## ^^	0,27±0,01 ** ###	0,30±0,01 ** ##
Гликоген, мкг/мл	1243±48,4	722±21,4 *	1147±38,6 # \$	836±19,5 * ###	1022±44,3 *** ## \$
Сыворотка крови					
ТБК-реактанты, кмоль/л	1,17±0,08	2,41±0,07*	1,63±0,07 ** # \$\$\$ ^^	2,07±0,09 * ###	1,88±0,06 * ##
ВГ, усл. ед.	61,9±2,35	41,1± 2,09 **	56,5±1,29 # \$\$\$	50,3±1,17 ** ###	52,3±1,15 ** ##
Глюкоза, ммоль/л	8,79±0,07	5,55±0,19 *	7,40±0,23 ** # \$\$\$	6,69±0,08 * ##	7,05±0,08 * \$\$\$
Общий белок, г/л	72,7±1,54	55,6± 2,29 **	68,2±1,85 # \$\$\$	60,2±1,81 **	64,4±1,59 *** ###
Церулоплазмин, г/л	0,43±0,03	0,68±0,02 **	0,48±0,02 # \$\$\$	0,59±0,02 ** ###	0,52±0,01 *** #

Примечания:

1. Достоверные отличия с показателями группы псевдооперированного контроля * – p<0,001; ** – p<0,01; *** – p<0,05;
2. Достоверные отличия с показателями группы контрольной патологии # – p<0,001; ## – p<0,01; ### – p<0,05;
3. Достоверные отличия с показателями группы вита-мелатонина \$- p<0,001; \$\$- p<0,01; \$\$\$- p<0,05;
4. Достоверные отличия с показателями группы тиотриазолина ^^ – p<0,01; ^^ – p<0,05.



У животных группы контрольной патологии зарегистрировано повышение уровня церулоплазмينا в 1,6 раз, что наряду с другими показателями характерно для острой фазы восстановления на фоне предшествующей ишемии.

Содержание гликогена в гепатоцитах на фоне острой нелеченной патологии значительно снижено на 31%, о нарушении участия печени в углеводном обмене свидетельствует достоверное снижение концентрации глюкозы в сыворотке крови (табл. 3).

Соединение 77 достоверно восстанавливает функциональную активность печени (белок-синтетическую – по уровню общего белка в крови; обмена углеводов – по нормализации содержания гликогена в печени и глюкозы в сыворотке крови), при этом эффективность нового соединения не уступает классическому гепатопротектору тиотриазолину и достоверно превышает вита-мелатонин.

Таким образом, 4,3'-спиро[(2-амино-3-нитрил-4,5-дигидропирано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол] можно считать потенциальным эффективным гепатопротектором, как при токсическом так и при ишемическом поражении печени.

Выводы. На фоне острой 25 – минутной ишемии печени с последующей реперфузией новое вещество – 4,3'-спиро[(2-амино-3-нитрил-4,5-дигидропирано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндол] проявляет выраженное гепатопротекторное действие.

Политропные свойства изучаемого соединения обеспечивают воздействие на разные звенья патогенетического каскада в ишемизированной печени.

Гепатопротекторная активность изучаемого соединения по величине эффекта значительно превышает эффективность препаратов сравнения вита-мелатонина и тиотриазолина.

Литература

1. Ивашкин В.Т. Гастроэнтерология. Клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР- Медиа, 2008. – 208 с.
2. Hypoxic hepatitis – epidemiology, pathophysiology and clinical management/[Fuhrmann V., Jäger B., Zubkova A. and al.]// Wien Klin Wochenschr.- 2010.- №122(5-6).- P.129-139.
3. Ebert EC. Hypoxic liver injury// Mayo Clin Proc – 2006. – №81(9). – P. 1232-1236.
4. Hypoxic hepatitis: underlying conditions and risk factors for mortality in critically ill patients/[Fuhrmann V., Kneidinger N., Herkner H. and al.]// Intensive Care Med.- 2009.- №35(8). – P.1397-1405.
5. Raurich J.M. Hypoxic hepatitis in critically ill patients: incidence, etiology and risk factors for mortality/[Raurich J.M., Llompарт J.A., Ferreruela M.] // J Anesth.- 2011,- №25 (1).-P.50-56.
6. Способ профилактики и лечения последствий ишемического воздействия на печень/ Перьков А.А., Лазаренко С.В. //Патент РФ на изобретение RU 2456678 С1, от 20.07.2012 Бюл. № 20.-14 с.
7. Цубанова Н.А.Скрининговые исследования антигипоксического действия спироциклических 2-оксиндольных производных 2-амино-3-нитрил-4п-пирана//Клінічна фармація.-2009.-Т.13. - №. 2.-С.62-64.
8. Цубанова Н.А. Изучение гепатопротекторного действия спироциклического производного оксиндола в условиях острого тетрахлорметанового гепатита// Фармакологія та лікарська токсикологія.- 2012. –№3(28). –С.61-65.

HEPATOPROTECTIVE EFFECT ON SPIROCYCLIC OXINDOLIC DERIVATE IN THE CONDITIONS OF ACUTE LIVER'S ISCHEMIA

N.A. TSUBANOVA
S.Yu. SHTRYGOL

*National University of Pharmacy
of Ukraine, Kharkiv*

e-mail: tsubanova@rambler.ru

Influence the spirocyclic oxindolic derivate in a dose 5 mg/kg and preparations of comparison vita-melatonin (5 mg/kg) and thiotriazolin (48 mg/kg) on lethality on animals, activity of cytolysis, free-radical oxidization and functional activity of the liver in the conditions of acute experimental ischemia were studied.

The expressed antioxidant, anticytolytic action spirocyclic oxindolic derivate in dose 5 mg/kg is established. It is found that the total hepatoprotective effect of new substance exceeds activity of preparations of comparison of vita-melatonin and thiotriazolin.

Key words: spirocyclic oxindolic derivate, model acute liver 's ischemia, hepatoprotective effect