

УДК 619:616-099-02:615.9

UDC 619:616-099-02:615.9

ПЕРСПЕКТИВЫ РАСШИРЕНИЯ СПЕКТРА ПРИМЕНЕНИЯ ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ В ВЕТЕРИНАРИИ

PROSPECTS FOR EXPANDING THE RANGE OF HEPATOPROTECTORS APPLICATION IN VETERINARY

Кузьмина Елена Васильевна
д.в.н.

Kuzminova Elena Vasilevna
Dr.Sci.Vet.

Семененко Марина Петровна
д.в.н.

Semenenko Marina Petrovna
Dr.Sci.Vet.

Старикова Елена Алексеевна
к.в.н.

Starikova Elena Alekseyevna
Cand.Vet.Sci.

Тяпкина Евгения Викторовна
к.в.н.

Tyapkina Evgenia Viktorovna
Cand.Vet.Sci.

Ферсунин Александр Викторович
к.в.н.
Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт, Краснодар, Россия

Fersunin Alexander Viktorovich
Cand.Vet.Sci.
Krasnodar research veterinary institute, Krasnodar, Russia

В настоящей работе изложены результаты доклинического изучения фармакологических свойств нового лекарственного средства, состоящего из фосфолипидов и антиоксидантов. Установлено, что препарат гепавитол при экспериментальном поражении печени у лабораторных крыс проявляет гепатозащитное действие

This article presents the results of pre-clinical study of the pharmacological properties of a new medicine composed of phospholipids and antioxidants. It is found that the medicine called Gepavitool in experimental damage of the liver of laboratory rats shows some hepatoprotective effects

Ключевые слова: ВЕТЕРИНАРИЯ, ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, ГЕПАТОПРОТЕКТОР, ФОСФОЛИПИДЫ, КАРОТИН, СЕЛЕН

Keywords: VETERINARY MEDICINE, MEDICINES FOR ANIMALS, HEPATOPROTECTOR, PHOSPHOLIPIDS, CAROTIN, SELENIUM

Заболевания печени у животных занимают одно из ведущих мест в списке болезней от общего числа незаразной патологии. Животноводство терпит значительный экономический ущерб от гепатопатий вследствие падежа животных, снижения продуктивности, воспроизводительной способности, резистентности, развитием на этом фоне многих инфекционных и незаразных болезней, а также ростом прямых материальных затрат на проведение лечебно-профилактических мероприятий [7,12,21].

Печень – это самая крупная железа организма, выполняющая множество функций, необходимых для поддержания жизни, играющая основную роль в метаболизме (биосинтезе, секреции, детоксикации и экскреции) различных веществ. Одной из главных функций печени является барьер-

ная – обезвреживание ядов и токсинов, а также защита организма от патогенных бактерий. Орган обладает большими функциональными способностями, однако печень является высокоаэробной, кислородзависимой тканью, что обуславливает высокую чувствительность гепатоцитов к повреждающему действию различных токсикантов. Ответной реакцией организма на внешнее негативное воздействие является состояние, получившее название окислительный стресс – усиление окислительных реакций в органах и тканях, индуцируемое вредными факторами окружающей среды, сопровождающееся увеличением концентрации свободнорадикальных форм метаболитов, нарушающих процессы обмена веществ и энергии в организме, а также ведущих к деструкции клеточных мембран и патологически измененным функциям клеток, в том числе и гепатоцитов. Патологические изменения печени отражаются на всех органах и системах, провоцируя возникновение заболеваний различной нозологии [15,17,18].

Однако уровень перекисного окисления липидов зависит не только от уровня свободных радикалов, но и от функции антиоксидантной защиты. Для профилактики и лечения различных заболеваний печени все шире используются антиоксиданты, они замедляют процессы свободнорадикального окисления, действуют на стадии образования свободных радикалов, их связывания и разрушения, а также утилизации продуктов окисления, из которых образуются новые радикалы. К веществам, обладающим антиоксидантной активностью, способностью ограничить перекисное окисление липидов и стабилизировать биомембраны, относят каротиноиды, препараты селена и их комбинации [3,20].

Каротиноиды представляют собой многочисленную группу пигментов, входящих в состав клеток микроорганизмов, высших растений и водорослей, а также животных и человека. Также существуют каротиноиды антропогенного происхождения, которые искусственно синтезированы человеком, с применением физико-химических методов

[6,10]. Известно, что бета-каротин является мощным антиоксидантом, повышающим интенсивность роста и неспецифическую резистентность животных, обладающим иммуномодулирующим действием в отношении гуморального звена иммунитета, положительно влияющим на репродуктивные функции организма. Кроме того, каротин обладает антиканцерогенной и антимуtagenной активностью [1,9,14].

Одним из наиболее дефицитных микроэлементов, играющим в организме важную биологическую роль, является селен, обеспечивающий активность антиоксидантной системы организма. Селен входит в состав глутатионпероксидазы, которая присутствует практически во всех клетках и биологических жидкостях человека и животных и представляет собой первую линию защиты организма от повреждающего действия перекисных радикалов [2,13].

Многочисленными исследованиями установлено, что селен оказывает защитное действие при острых и хронических интоксикациях ксенобиотиками; повышает неспецифическую резистентность организма; обладает способностью стимулировать эритро- и лейкопоз [16,19].

Современная программа комплексного лечения заболеваний печени включает два основных направления – этиотропную и патогенетическую терапию. Этиотропная терапия, как правило, применяется при вирусных гепатитах и направлена на подавление репликации возбудителя заболевания и его элиминацию. Основу патогенетической терапии составляют препараты, способствующие восстановлению структуры и функции гепатоцитов. Именно средства патогенетической терапии принято обозначать термином «гепатопротекторы». К ним относится группа фосфолипидных препаратов, оказывающих восстанавливающее действие на клеточные элементы гепатоцитов и тормозящих деструкцию клеток [11].

Фосфолипиды (ФЛ) входят в состав тканей и клеток всех живых существ, как в свободном виде, так и в виде белково-липидных

комплексов. Особенно много ФЛ содержится в оболочках и мембранах клеток, где они образуют структурную основу мембраны – фосфолипидный слой. Режим нормального функционирования мембраны зависит от микровязкости фосфолипидного слоя и подвижности молекул фосфолипидов, а также фазового состояния мембранных липидов. Отклонения биофизических характеристик фосфолипидного слоя от нормы могут зависеть от разного рода патологий. Гепатозащитное действие ФЛ основывается также на ингибировании процессов перекисного окисления липидов (восстанавливая «упаковку» полиненасыщенных жирных кислот в мембране гепатоцитов ФЛ уменьшают доступ кислорода к ним, тем самым, снижают скорость зарождения свободных радикалов) [4].

В настоящее время в медицине накоплен значительный положительный опыт изучения и терапевтического применения препаратов, содержащих ФЛ при гепатитах, дистрофии, циррозе и др. заболеваниях печени, применения их в профилактике и лечении сердечнососудистых заболеваний и использовании в качестве вспомогательных органоспецифичных веществ при доставке лекарственных средств к «биомишеням» [8]. Все это определяет широкий спектр биологического и фармакологического действия ФЛ, а также интерес к препаратам на их основе и аспектам создания, изучения и внедрения в практику ветеринарной медицины.

Учитывая вышеизложенное, в лаборатории фармакологии ФГБНУ Краснодарского НИВИ был разработан препарат гепавитол. В состав этого лекарственного средства входят фосфолипиды, бета-каротин и селен.

Изыскание новых эффективных средств фармакологической регуляции заболеваний печени, в том числе и токсических её поражений, а также необходимость проведения более безопасных клинических испытаний гепатопротекторов, обуславливает необходимость моделирования гепатитоподобного повреждения печени в лабораторных условиях. В настоящее

время наиболее перспективной моделью для скрининга и фармакологического изучения новых гепатозащитных средств признана модель повреждения печени, вызванного CCl_4 . Некоторые токсиканты и, в частности, четырёххлористый углерод вызывают поражения печени, так как в процессе метаболизма инициируют в гепатоцитах генерацию свободных радикалов, активных форм кислорода. Эти продукты вызывают перекисное окисление липидов, физико-химическую деструкцию белков, нуклеиновых кислот, нарушают внутриклеточный гомеостаз кальция. В итоге CCl_4 -гепатит характеризуется развитием функциональных нарушений, проявляющихся стеатозом и некрозом клеток печени [5].

Доклиническое изучение фармакологических свойств препарата гепавитол проводили на экспериментальной модели острого гепатита у крыс, вызванного CCl_4 , в соответствии с «Методическими указаниями по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ» (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, под общей редакцией Р.У. Хабриева, 2005).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакетов статистических программ ARCADA, Microsoft Excel XP и Statistica for Windows. Исследование количественных признаков проводилось методом сравнения средних значений двух выборочных совокупностей с определением критерия Стьюдента и уровня значимости (p). Статистически достоверными считались различия, уровень значимости которых соответствовал $p < 0,05$.

Экспериментальные исследования проводили на 30 лабораторных беспородных крысах со средней массой тела $210,7 \pm 3,4$ г, которых содержали в виварии при естественном световом режиме, стандартном рационе и свободном доступе к воде и пище. Животных разделили на три группы по 10 особей в каждой (по принципу парных аналогов, учитывая массу тела, развитие и клиническое состояние). У крыс первой и второй

опытной групп вызывали острый токсический гепатит путем внутрижелудочного введения CCl_4 в 50%-ном растворе на оливковом масле в дозе 0,4 мл на 100 г массы тела один раз в день, в течение 4 суток. Первая группа была контрольной (без лечения), во второй группе за один час до применения гепатотоксиканта вводили гепавитол *per os* в дозе 0,5 мл/кг массы тела ежедневно в течение 14 дней от начала опыта, третья группа служила интактным контролем (здоровые крысы). Наблюдение за клиническим состоянием животных вели на протяжении всего экспериментального периода, определяя в динамике (через день) массу тела у всех животных. Декапитацию крыс проводили через 24 ч после последнего введения гепавитола. Кровь для биохимических исследований брали в конце опыта у пяти животных из каждой группы.

Лабораторные исследования состояли из определения в сыворотке крови общего белка, мочевины, глюкозы, активности трансаминаз, щелочной фосфатазы, билирубина, холестерина – с помощью наборов фирмы «ELITech Clinical Systems». Все исследования проводились на биохимическом анализаторе Vitalab Flexor.

Эффективность гепатозащитного действия препарата оценивали по степени нормализации биохимических показателей основных патологических синдромов, наблюдающихся при поражениях печени: цитолиза – по активности в сыворотке аминотрансфераз; нарушения динамики желчи – по уровню в сыворотке крови щелочной фосфатазы, содержанию билирубина и холестерина. Кроме того, эффективность гепатопротекторного действия препарата определяли по массе тела, клиническим признакам и выживаемости животных.

В группе без лечения уже на второй день эксперимента появились внешние признаки интоксикации. Клиническая картина гепатита характеризовалась снижением массы тела (рисунок 1) – в среднем на 22,3% (к концу опыта), гиподинамией, снижением аппетита,

взъерошенностью шерсти, наблюдалась желтушность слизистых оболочек и склер, три животных пало. Крысы второй опытной группы, получавшие гепавитол, были более подвижны, явления интоксикации наступали позже (на 5-е сутки) и были менее выражены, а к 10-му дню эксперимента шерсть вернула первоначальный вид, потеря массы тела была незначительной (в среднем 6,9%), летальность в этой группе отсутствовала.

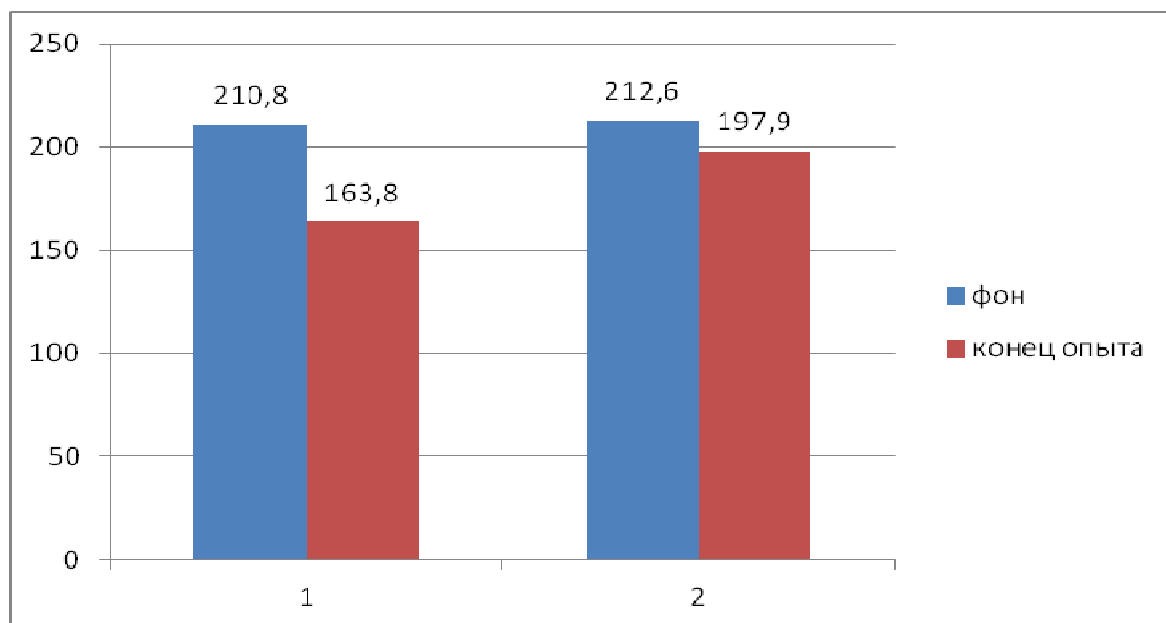


Рисунок 1 – Динамика массы тела крыс при экспериментальном гепатите, граммы

При лабораторном анализе крови (таблица 1), проводившемся в конце опыта установлено, что при острой интоксикации четырёххлористым углеродом происходит увеличение каталитической концентрации аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы. Гиперферментемия свидетельствует о нарушении целостности гепатоцитов под влиянием гепатотоксиканта. В группе без лечения токсическое поражение печени сопровождалось значительным цитолизом гепатоцитов, что отражалось в повышении активности АлАТ в 2,4 и АсАТ в 1,6 раза в сравнении со здоровыми животными.

В показателях желчеобразования у животных первой группы была зарегистрирована гипербилирубинемия (концентрация общего билирубина

выше в 2,1 раза в сравнении с интактными крысами), уровень щелочной фосфатазы возрос в 1,6 раза, что характерно для холестатического синдрома, обусловленного нарушением желчевыделительной функции гепатоцитов и поражением желчных канальцев (внутрипеченочный холестаза).

При поражении печени четыреххлористым углеродом нарушения жирового обмена выражаются в прекращении выделения триглицеридов и жирных кислот из печени в составе липопротеидов, нарушении окисления жиров, что вызывает увеличение образования кетоновых тел и изменение синтеза холестерина. Эти данные нашли подтверждение в наших опытах, концентрация холестерина в сыворотке крови крыс после введения CCl_4 была ниже в сравнении с показателями интактной контрольной группы в 1,5 раза.

Таблица 1 - Биохимические показатели крови крыс в конце опыта при экспериментальном остром гепатите ($M \pm m$; $n=5$)

| Показатели | Опытные группы | | Интактные крысы |
|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| | CCl_4 без лечения | CCl_4 + гепавитол | |
| АлАТ, Ед/л | 223,9±6,4 | 126,1±5,3* | 95,3±4,8 |
| АсАТ, Ед/л | 291,4±5,5 | 206,4±4,5* | 180,5±5,6 |
| ЩФ, Ед/л | 412,3±4,8 | 284,5±6,6* | 260,9±5,3 |
| Общий белок, г/л | 74,6±4,2 | 81,5±2,3 | 82,2±4,6 |
| Мочевина, мМ/л | 9,6±1,4 | 9,2±1,1 | 10,3±1,8 |
| Холестерин, мМ/л | 1,5±0,3 | 2,1±0,8 | 2,2±0,4 |
| Глюкоза, мМ/л | 10,8±1,4 | 11,8±1,9 | 12,1±1,7 |
| Билирубин об., мкМ/л | 9,1±1,2 | 6,2±1,5* | 4,3±0,7 |
| Креатинин, мМ/л | 59,6±3,1 | 52,4±2,3 | 51,5±1,9 |

Примечание: * – различия достоверны ($P \leq 0,05$) в сравнении с животными, получавшими CCl_4 без терапии

У животных, которых лечили гепавитолом, к концу эксперимента в сравнении с крысами первой группы достоверно снизились концентрации ферментов – АлАТ на 77,6%, АсАТ – на 41,4% и ЩФ – на 44,9%. При этом данные показатели регистрировались на более высоком уровне, по

отношению к интактным крысам. Аналогичная ситуация проявилась и в уровне общего билирубина (достоверная разница 46,8% в сравнении с животными, получавшими CCl_4 без терапии) и более высокое содержание на 44,1% по отношению к здоровым крысам. Концентрация общего холестерина во второй группе достоверно не изменялась в отношении, как нормы, так и интактного контроля.

Таким образом, результаты биохимического состояния печени показали, что применение гепавитола крысам при экспериментальном гепатите в течение 2-х недель, свидетельствует о восстановлении функционального состояния и паренхимы печени. Учитывая позитивные изменения в клинических признаках, данное лекарственное средство оказывает терапевтическое воздействие при токсическом поражении печени, что свидетельствует о целесообразности его применения в качестве гепатопротектора.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Антипов В.А., Кузьминова Е.В., Семенов М.П., Соловьев В.С. Биологические основы применения каротиноидов // Доклады РАСХ. 2008. № 4. С. 48-50.
2. Беляев В.А., Оробец В.А., Киреев И.В. Биологическая роль селена и селенодефициты у животных и птиц. Монография. Ставрополь, 2009. 163 с.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
4. Ипатова О.М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. Монография. М.: Изд. ГУ НИИ биомед. Химии РАМН, 2005. 318 с.
5. Кравченко Л.В., Трусов Н.В., Ускова М.А. и др. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса // Токсикологический вестник. – 2009. – № 1. – С. 12-18.
6. Кудинова С.П., Казарян Р.В. Перспективы использования β -каротина // Пищевая промышленность. – 1990. – № 9. – С. 60-61.
7. Кузнецов Н.И. Новые препараты для профилактики токсической гепатодистрофии и лечения животных // Ветеринария. – 1990. – № 3. – С. 9.
8. Кунц Э., Гундерманн К., Шнайдер Э. «Эссенциальные» фосфолипиды в гепатологии (экспериментальный и клинический опыт) // Терапевтический архив. – 1994. – № 2. – С. 660-672.
9. Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Коновалова Т.Г. Бета-каротинсодержащие препараты увеличивают антиоксидантный потенциал печени и миокарда // Бюл. эксп. биол. мед. – 1999. – №9. – С. 324-326.

10. Малявина В.В., Швидко Е.А., Сампиев А.М. Перспективы расширения спектра медицинского применения бета-каротина //Кубанский медицинский вестник. – 2010. – № 3/4. – С. 122-125.
11. Никитин И.Г. Гепатопротекторы: мифы и реальные возможности //Фарматека. – 2007. – № 13. – С. 14-18.
12. Пат. 2423109, Российская Федерация, МПК А61К 31/00, А61 Р43/00. Средство для нормализации обменных процессов у животных /Е.В. Кузьминова, М.П. Семеновко, А.Г. Кощаев, В.С. Соловьев. Оpubл. 10.07.2011 г., Бюл. № 19.
13. Пат. 2366273, Российская Федерация, МПК А61К 31/00, А61 Р43/00. Способ коррекции минерального и витаминного обменов в организме животных /В.А. Антипов, М.П. Семеновко, Е.В. Кузьминова, А.В. Ферсунин. Оpubл. 10.09.2009 г., Бюл. № 25 (III ч.).
14. Поддубный Н.П., Сампиев А.М. Бета-каротин опыт и перспективы применения в медицине //Краснодар. – 2000. – 34 с.
15. Рецкий М.И. Система антиоксидантной защиты у животных при стрессе и его фармакологической регуляции: Автореф. дис. д-ра биол. наук. Воронеж, 1997. 51с.
16. Родионова Т.Н., Антипов В.А., Лазарев В.Г. Фармакология селеноорганического препарата ДАФС-25 и его использование в животноводстве и ветеринарии. Саратов: ИЦ «Наука», 2010. 241 с.
17. Семеновко М.П., Кузьминова Е.В., Фомин О.А. Новые подходы к лабораторной диагностике болезней печени у высокопродуктивного молочного скота //Ветеринария Кубани. – 2014. – № 3. – С. 11-13.
18. Уша Б.В. Ветеринарная гепатология. М.: Колос, 1979. 263 с.
19. Фроловичев А.С., Трошин А.Н. Применение диацетофенилселенида в свиноводстве //Ветеринария Кубани. – 2013. – № 3. – С. 9-11
20. Burton G.W. et al. Biological antioxidants //Philosophical Transactions of Royal Society of London. – 1985. – № 3111. – P. 565-579.
21. Vursa I., Klein Z., Kucerova I. Hapatopatie u dojníc - aktualni problem velkochovu //Veterinarstvi. – 1988. – P. 153-155.

References

1. Antipov V.A., Kuz'minova E.V., Semenenko M.P., Solov'ev V.S. Biologicheskie osnovy primeneniya karotinoidov //Doklady RASH. 2008. № 4. S. 48-50.
2. Beljaev V.A., Orobec V.A., Kireev I.V. Biologicheskaja rol' selena i selenodeficyt u zhivotnyh i ptic. Monografija. Stavropol', 2009. 163 s.
3. Vladimirov Ju.A., Archakov A.I. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah. M.: Nauka, 1972. 252 s.
4. Ipatova O.M. Fosfoliv: mehanizm dejstvija i primenenie v klinike. Monografija. M.: Izd. GU NII biomed. Himii RAMN, 2005. 318 s.
5. Kravchenko L.V., Trusov N.V., Uskova M.A. i dr. Harakteristika ostrogo toksicheskogo dejstvija chetyrehhlorigo ugleroda kak modeli okislitel'nogo stressa //Toksikologicheskij vestnik. – 2009. – № 1. – S. 12-18.
6. Kudinova S.P., Kazarjan R.V. Perspektivy ispol'zovaniya β -karotina //Pishhevaja promyshlennost'. – 1990. – № 9. – S. 60-61.
7. Kuznecov N.I. Novye preparaty dlja profilaktiki toksicheskoj gepatodistrofii i lechenija zhivotnyh //Veterinarija. – 1990. – № 3. – S. 9.
8. Kunc Je., Gundermann K., Shnajder Je. «Jessencial'nye» fosfolipidy v gepatologii (jeksperimental'nyj i klinicheskij opyt) //Terapevticheskij arhiv. – 1994. – № 2. – S. 660-672.

9. Lankin V.Z., Tihadze A.K., Konovalova T.G. Beta-karotinsoderzhashhie preparaty uvelichivajut antioksidantnyj potencial pečeni i miokarda //Bjul. jeksp. biol. med. – 1999. – №9. – S. 324-326.
10. Maljavina V.V., Shvidko E.A., Sampiev A.M. Perspektivy rasshirenija spektra medicinskogo primenenija beta-karotina //Kubanskij medicinskij vestnik. – 2010. – № 3/4. – S. 122-125.
11. Nikitin I.G. Gepatoprotektory: mify i real'nye vozmozhnosti //Farmateka. – 2007. – № 13. – S. 14-18.
12. Pat. 2423109, Rossijskaja Federacija, MPK A61K 31/00, A61 R43/00. Sredstvo dlja normalizacii obmennyh processov u zhivotnyh /E.V. Kuz'minova, M.P. Semenenko, A.G. Koshhaev, V.S. Solov'ev. Opubl. 10.07.2011 g., Bjul. № 19.
13. Pat. 2366273, Rossijskaja Federacija, MPK A61K 31/00, A61 R43/00. Sposob korrekcii mineral'nogo i vitaminного obmenov v organizme zhivotnyh /V.A. Antipov, M.P. Semenenko, E.V. Kuz'minova, A.V. Fersunin. Opubl. 10.09.2009 g., Bjul. № 25 (III ch.).
14. Poddubnyj N.P., Sampiev A.M. Beta-karotin opyt i perspektivy primenenija v medicine //Krasnodar. – 2000. – 34 s.
15. Reckij M.I. Sistema antioksidantnoj zashhity u zhivotnyh pri stresse i ego farmakologicheskoj reguljacii: Avtoref. dis. d-ra biol. nauk. Voronezh, 1997. 51s.
16. Rodionova T.N., Antipov V.A., Lazarev V.G. Farmakologija selenoorganicheskogo preparata DAFS-25 i ego ispol'zovanie v zhivotnovodstve i veterinarii. Saratov: IC «Nauka», 2010. 241 s.
17. Semenenko M.P., Kuz'minova E.V., Fomin O.A. Novye podhody k laboratornoj diagnostike boleznej pečeni u vysokoproduktivnogo molochnogo skota //Veterinarija Kubani. – 2014. – № 3. – S. 11-13.
18. Usha B.V. Veterinarnaja gepatologija. M.: Kolos, 1979. 263 s.
19. Frolovichev A.S., Troshin A.N. Primenenie diacetofenilselenida v svinovodstve //Veterinarija Kubani. – 2013. – № 3. – S. 9-11
20. Burton G.W. et al. Biological antioxidants //Philosophical Transactions of Royal Society of London. – 1985. – № 3111. – R. 565-579.
21. Vursa I., Klein Z., Kucerova I. Hepatopatie u dojníc - aktualni problem velkochovu //Veterinarstvi. – 1988. – P. 153-155.