

© Климкина Е.И., 2014  
УДК 615:616.36

## ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ОКСИПИРИДИНА НА РАЗВИТИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

*Е.И. Климкина*

ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия  
Министерства здравоохранения РФ, г. Смоленск

**В условиях экспериментального токсического поражения печени изучено гепатопротекторное действие оригинального химического соединения – 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилат. Показано, что соединение эффективно снижает активность печеночных ферментов (аспарагиновой и аланиновой аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы), содержание общего билирубина и активность свободнорадикального окисления, инициированных интоксикацией  $CCl_4$ . Протекторное действие вещества на функцию печени подтверждено морфологически.**

**Ключевые слова:** токсический гепатит, 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилат, гепатопротекторный эффект.

В последние годы возросло количество токсических поражений печени, обусловленных загрязнением окружающей среды, профессиональными и бытовыми вредностями. При заболеваниях печени применяются препараты разных фармакологических групп. Особое место среди них принадлежит гепатопротекторам – лекарственным средствам, улучшающим метаболические процессы в печени и способствующим восстановлению ее функций при различных повреждениях [4, 6]. Однако, эффективность этих средств при поражениях печени различной этиологии недостаточно высока.

Свободнорадикальная концепция поражения печени открыла новые возможности для применения в практической гепатологии лекарственных средств с антиоксидантной направленностью действия [1, 10]. Сегодня предложено достаточно много веществ с антиоксидантной и антигипоксантной активностью, и их поиск продолжается [3, 5, 9, 16]. В экспериментальных и клинических исследованиях были выявлены гепатопротекторные и гастропротекторные свойства производного 3-

оксипиридина – мексидола [8, 13]. Тем не менее, проблема применения синтетических антиоксидантов в качестве гепатопротекторов остается малоизученной.

Целью настоящего исследования явилось изучение гепатопротекторных свойств нового производного 3-оксипиридина – 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилата.

### Материалы и методы

Опыты проведены на белых лабораторных крысах массой 150-200 г. Токсическое поражение печени вызывали четыреххлористым углеродом ( $CCl_4$ ). Опытным крысам подкожно вводили  $CCl_4$  в виде 50% раствора в подсолнечном масле в дозе 0,4 мл на 100 г массы животного 1 раз в день на протяжении 4-х первых дней опыта [7]. Наблюдение за животными вели в течение 7 дней, по истечении которых крысы подвергались одномоментной декапитации.

Оригинальное химическое соединение 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилат под лабораторным шифром ИБХФ (синтезировано в НИИ биохимической физики РАН г. Москва про-

фессором Л.Д. Смирновым) вводили в дозе 10 мг/кг/сут внутрибрюшинно. Препарат сравнения альфа-токоферола ацетат – в дозе 50 мг/кг/сут внутримышечно. Вещества вводили 1 раз в сутки первые 4 дня параллельно с  $CCl_4$  за один час до его введения, затем еще три дня.

Биохимическому исследованию подвергалась сыворотка крови животных. В ней определяли активность ферментов: аспарагиновой (АсАТ) и аланиновой аминотрансфераз (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также общий белок и концентрацию общего билирубина. Эти исследования выполнены на биохимическом анализаторе «Ultra» фирмы «Копе» (Финляндия) с использованием реактивов фирм Vital и Olvex (Россия) и фирмы Human (ФРГ).

Оценку активности свободнорадикального окисления (СРО) проводили методом хемилюминесценции в сыворотке крови и супернатанте гомогената ткани печени на отечественном люминометре фирмы «Диалог» с помощью программы <CL3603>. Для инициации ПОЛ в исследуемый материал добавляли 0,1 мл 3% раствора перекиси водорода и двухвалентное железо (12,5 мМ). Измеряли величину светосуммы, отражающую интенсивность образования свободных радикалов и участие в процессе СРО антиоксидантных систем [11].

Биоптаты ткани печени подвергали гистологическому исследованию. Для этого образцы ткани печени стандартного размера 3×3×2 см извлекали из левой доли в течение 10 минут после декапитации и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Затем готовили парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону.

Результаты экспериментальных исследований подвергали статистической обработке на компьютере с помощью пакетов StatGraphics v 5.0 и Maple. Гипотезы о средних значениях проверяли с помощью t-критерия Стьюдента.

#### **Результаты и их обсуждение**

В сыворотке крови опытных животных, подвергшихся  $CCl_4$ -интоксикации, значительно повышалась активность

АлАТ и АсАТ, а также фермента ЛДГ. Наряду с возрастанием активности ферментов-маркеров цитолиза в сыворотке крови опытных животных заметно увеличивалась концентрация общего билирубина, свидетельствующая о нарушении резорбции этого соединения из крови клетками печени, дальнейшего связывания его с глюкуроновой кислотой и выведения (табл. 1). Активность щелочной фосфатазы и концентрация общего белка существенно не изменялись ( $p>0,05$ ). Приведенные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что токсическое поражение печени  $CCl_4$  сопровождается выраженным синдромом цитолиза гепатоцитов.

Учитывая направленность изменений биохимических показателей в сыворотке крови, свидетельствующих об активации цитолитических процессов в печени, мы провели морфогистологическое изучение биоптатов печени. Морфологическая картина ткани печени крыс на 7 сутки после начала интоксикации  $CCl_4$  свидетельствовала о развитии токсического гепатоза, проявлявшегося жировой дистрофией печени, признаками снижения белковосинтетической функции, а также начальными признаками воспаления в виде незначительной лейкоцитарной инфильтрации (рис. 1, 2). Наши результаты по изменению активности ферментов и морфогистологических показателей печени в условиях экзогенной интоксикации организма животных полностью согласуются с данными других авторов, установленных в аналогичных исследованиях [16].

Интоксикация опытных животных тетрахлоридом углерода инициировала значительное усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). При этом отмечалась достоверная активация СРО как в гомогенате печени, так и в сыворотке крови (табл. 2, 3). Наибольшие нарушения изучаемых показателей происходили в ткани печени, что можно объяснить непосредственным действием гепатотропного яда на орган-мишень.

Как видно из таблицы 1, введение опытным животным соединения ИБХФ и токоферола с целью коррекции токсического гепатита показало положительную

Таблица 1

**Влияние производного 3-оксипиридина и токоферола на биохимические показатели сыворотки крови при интоксикации крыс  $CCl_4$  ( $M \pm m$ )**

Группы животных	АлАТ (ед/л)	АсАТ (ед/л)	ЛДГ (ед/л)	ЩФ (ед/л)	Общий белок (ед/л)	Общий билирубин (мкмоль/л)
Интактная (контроль) n=10	67,11± 7,95	195,44± 13,63	1601,33± 206,54	555,89± 72,82	64,0± 2,43	7,83± 0,12
$CCl_4$ -интоксикация n=12	599,91± 153,14 p<0,01	623,36± 40,25 p<0,01	2781,18± 194,47 P<0,01	583,36± 37,93 p>0,05	70,4± 2,43 p>0,05	12,67± 2,10 P<0,05
$CCl_4$ + ИБХФ n=10	135,80± 17,85 p<0,01 p <sub>1</sub> <0,01	289,70± 26,49 p<0,01 p <sub>1</sub> <0,01	1985,40± 313,70 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,05	583,20± 62,60 p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05	67,1± 1,86 p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05	10,30± 0,76 p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05
$CCl_4$ + Токоферол n=10	203,27± 14,74 p<0,01 p <sub>1</sub> <0,05	255,63± 30,83 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,01	1514,80± 175,76 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,01	503,64± 61,90 p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05	63,0± 2,33 p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05	8,40± 0,22 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,05

*Примечание.* Во всех таблицах достоверность различий: p – по отношению к показателям интактных животных, p<sub>1</sub> – по отношению к группе животных с  $CCl_4$ -интоксикацией без лечения

динамику изменений биохимических показателей в сыворотке крови. Так, под влиянием 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилата (ИБХФ) наблюдалось снижение активности АлАТ на 77,4%, АсАТ – на 53,5%, ЛДГ – на 28,6% и снижение содержания общего билирубина на 18,7%. При этом показатели активности щелочной фосфатазы и содержания общего белка в сыворотке крови достоверно не изменялись по сравнению с опытными животными без лечения.

При применении препарата сравнения токоферола ацетата для коррекции  $CCl_4$ -интоксикации было отмечено снижение активности АлАТ на 66,1%, АсАТ – на 59%, ЛДГ – на 44,5% и снижение концентрации общего билирубина в сыворотке крови на 33,1% по отношению к животным без лечения. Активность ЩФ и содержание общего белка достоверно не изменялись. Сопоставление результатов действия двух веществ позволяет отметить, что ИБХФ по эффективности влияния на биохимические показатели крови в условиях  $CCl_4$ -интоксикации примерно соответствует токоферолу, а по влиянию на активность АлАТ даже превосходит его.

Применение ИБХФ и токоферола на фоне экспериментального токсического

гепатита приводило к достоверному снижению активности процессов СРО в гомогенате печени и сыворотке крови по сравнению с группой животных без лечения (табл. 2, 3). Эти данные свидетельствуют о том, что исследуемые вещества обладают антиоксидантной активностью. В гомогенате печени при интоксикации животных  $CCl_4$  активность токоферол – на 108% (p<sub>1</sub><0,01), ИБХФ – на 114% (p<sub>1</sub><0,01). Применение ИБХФ приводило к снижению показателя величины светосуммы в гомогенате печени практически до уровня показателей интактных животных (табл. 2).

Сопоставимые данные были получены и при исследовании активности СРО в сыворотке крови животных в условиях фармакологической коррекции токсического гепатита (табл. 3). Так, например, применение ИБХФ приводило к достоверному снижению величины светосуммы на 72% (p<sub>1</sub><0,01) относительно опытных животных без лечения. Активность ПОЛ у животных этой экспериментальной группы достоверно превышала аналогичный показатель интактной группы животных на 23% (p<0,05). Более значимо снижал активность ПОЛ в сыворотке крови опыт-

ных животных препарат сравнения токоферола ацетат. На фоне его введения средний показатель величины светосуммы в

сыворотке крови превышал аналогичный показатель интактных животных всего лишь на 9,5% ( $p > 0,05$ ).

Таблица 2  
**Влияние производного 3-оксипиридина и токоферола на активность СРО в гомогенате печени при интоксикации крыс  $CCl_4$  ( $M \pm m$ )**

Группы животных	Показатель светосуммы	% к контролю
Интактная (контроль) n=12	12847,16±1028,67	100%
$CCl_4$ (без лечения) n=11	28558,60±1620,06 $p < 0,01$	222,3%
$CCl_4$ + ИБХФ n=10	13908,89±2850,19 $p > 0,05$ ; $p_1 < 0,01$	108,3%
$CCl_4$ + токоферол n=10	14690,71±1871,86 $p > 0,05$ ; $p_1 < 0,01$	114,3%

Таблица 3  
**Влияние производного 3-оксипиридина и токоферола на активность СРО в сыворотке крови при интоксикации крыс  $CCl_4$  ( $M \pm m$ )**

Группы животных	Показатель светосуммы	% к контролю
Интактная (контроль) n=12	79086,11±2113,85	100%
$CCl_4$ (без лечения) n=11	138573,30±6492,37 $p < 0,01$	195,2%
$CCl_4$ + ИБХФ n=10	95735,29±7865,86 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,01$	122,9%
$CCl_4$ + токоферол n=10	86603,64±5384,43 $p > 0,05$ ; $p_1 < 0,01$	109,5%

Проанализировав приведенные выше результаты по СРО, можно отметить, что наиболее эффективно корригирует процессы ПОЛ в печени крыс на фоне интоксикации животных тетрахлоридом углерода соединение 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилат, эффективность которого по показателю величины светосуммы оказалась выше, чем у токоферола ацетата.

Сопоставляя результаты исследования активности процессов СРО в условиях интоксикации животных  $CCl_4$ , можно обнаружить некоторые различия между показателями величины светосуммы в гомогенате печени и сыворотке крови. Это объясняется тем, что повышение активности процессов пероксидации липидов в сыворотке крови может быть следствием не только выхода продуктов ПОЛ из поврежденного органа в кровь, но и результатом

выраженной стрессорной реакции животных на проведение манипуляций. На наш взгляд, исследование активности процессов СРО в гомогенате печени наиболее объективно отражает изменения ПОЛ у животных с интоксикацией  $CCl_4$  на фоне применения фармакологических средств, так как количество гидроперекисей в клетках этого органа зависит только от его функционального состояния, в то время как уровень гидроперекисей в плазме крови отражает суммарную реакцию организма, в том числе и на стресс.

Положительный эффект от введения соединения ИБХФ, по-видимому, связан с тем, что, являясь производным 3-оксипиридина, он относится к структурным аналогам витамина  $B_6$ , выполняющего в организме роль физиологического антиоксиданта. Выявленная способность соединения угнетать активность процес-

сов СРО, может лежать в основе его гепатопротекторного действия в условиях интоксикации животных  $CCl_4$ . В литературе показано, что производные 3-оксипиридина регулируют процессы гидратации тканей [2, 12], оказывают противовоспалительное действие [14], что тоже может иметь отношение к гепатопротекции при токсическом поражении печени. Токоферола ацетат обладает многосторонним гепатотропным действием. Он стабилизирует мембраны гепатоцитов, ибо в виде токоферола входит в их состав в качестве обязательного структурного элемента, где находится в связи с липидными и белковыми компонентами. Кроме того, токоферол обладает антиоксидантными свойствами, являясь важным элементом антиоксидантной системы клеток.

При изучении гистологических микропрепаратов печени было установлено, что соединение ИБХФ значительно уменьшает выраженность жировой дистрофии печени в условиях токсического гепатоза (рис. 3).

Таким образом, оригинальное химическое соединение из группы производных 3-оксипиридина 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилат снижает активность печеночных ферментов-маркеров цитолиза и концентрацию общего билирубина в сыворотке крови животных, активность процессов СРО, инициированных интоксикацией  $CCl_4$ , что свидетельствует о его гепатопротекторном действии. Протекторное действие соединения на печень подтверждается морфогистологическим исследованием биоптатов печени.

#### Выводы

1. 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилат оказывает эффективное гепатопротекторное действие при токсическом поражении печени  $CCl_4$  у крыс, что подтверждается динамикой

биохимических показателей и гистологической картиной печени. По гепатопротекторной активности изученное соединение не уступает токоферолу ацетату.

2. Производное 3-оксипиридина 2,6-диметил-3-оксипиридина адамантанкарбоксилат представляет научно-практический интерес для дальнейшего экспериментального изучения в качестве потенциального лекарственного вещества, обладающего антиоксидантным и гепатопротекторным эффектами.

#### Литература

1. Гепато- и гастропротекторные свойства гипоксена / Е.И. Климкина [и др.] // Бюл. сиб. медицины. – 2006. – Т.5. – С. 98-100.
2. Кулагин К.Н. Влияние мексидола на гидратацию тканей при ЧМТ / К.Н. Кулагин, В.Е. Новиков, Л.Д. Смирнов // Психофармакология и биол. наркология. – 2002. – №3-4. – С. 403.
3. Левченкова О.С. Антигипоксанты: возможные механизмы действия и клиническое применение / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков // Вестн. Смоленской государственной медицинской академии. – 2011. – №4. – С. 43-57.
4. Левченкова О.С. Фармакодинамика и клиническое применение антигипоксантов / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2012. – Т.10, №3. – С. 3-12.
5. Новиков В.Е. Фармакология и биохимия гипоксии / В.Е. Новиков, Н.П. Катунина // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2002. – Т.1, №2. – С. 73-87.
6. Новиков В.Е. Фармакология гепатопротекторов / В.Е. Новиков, Е.И. Климкина // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2005. – Т.4, №1. – С. 2-20.

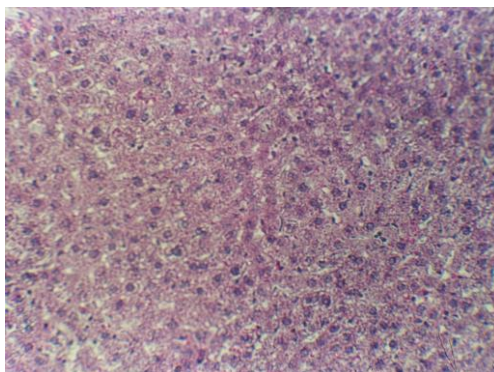


Рис. 1. Печень нормальной гистологической структуры (интактная крыса). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 80$ . Дольки одинаковых размеров, преобладание одноядерных гепатоцитов. Ядра гепатоцитов мономорфны, ядрышек не видно. Ядра клеток Купфера не увеличены, пространства Диссе не расширены. Пигмента в цитоплазме нет. В триадах количество соединительной ткани минимально, лейкоциты единичны

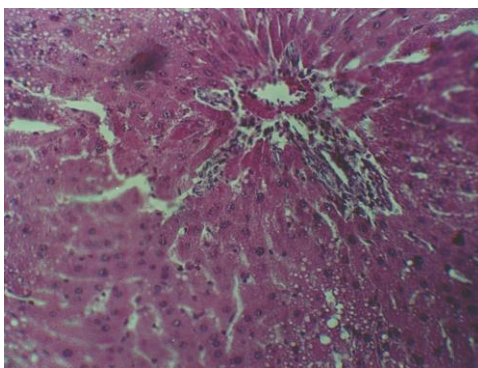


Рис. 2. Печень при  $\text{CCl}_4$ -интоксикации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 80$ . Портальный тракт с явлениями лейкоцитарной инфильтрации, инфильтрации полиморфноядерными лейкоцитами и явлениями жирового гепатоза в дольке

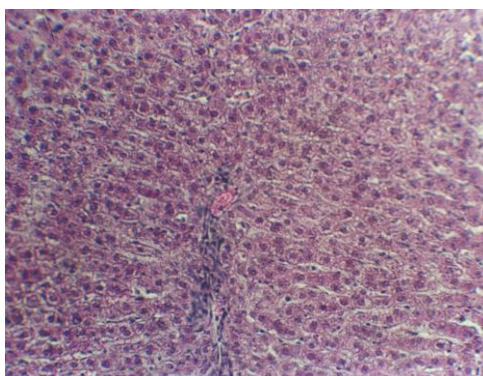


Рис. 3. Печень при  $\text{CCl}_4$ -интоксикации и лечении соединением ИБХФ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 80$ . Сохраняются признаки незначительной зернистой дистрофии, преобладают одноядерные гепатоциты. Видны единичные лейкоциты в отдельных триадах, признаки жировой дистрофии отсутствуют

7. Новиков В.Е. Влияние гипоксена на морфо-функциональное состояние печени при экзогенной интоксикации / В.Е. Новиков, Е.И. Климкина // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2009. – Т.72, №5. – С. 43-45.
8. Новиков В.Е. Гастропротекторные свойства мексидола и гипоксена / В.Е. Новиков, Н.О. Крюкова, А.С. Новиков // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – Т.73, №5. – С. 15-18.
9. Новиков В.Е. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2013. – Т.76, №5. – С. 37-47.
10. Новиков В.Е. Фармакология производных 3-оксипиридина / В.Е. Новиков, С.О. Лосенкова // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2004. – Т.3, №1. – С. 2-14.
11. Новиков В.Е. К механизму антигипоксического действия нового комплексного соединения аскорбиновой кислоты / В.Е. Новиков, Е.О. Маркова, Э.А. Парфенов // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №2. – С. 59-65.
12. Новиков В.Е. Влияние мексидола на течение посттравматической эпилепсии / В.Е. Новиков, Н.Н. Маслова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2003. – Т.66, №4. – С. 9-11.
13. Пожилова Е.В. Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, А.В. Новикова // Вестн. Смоленской государственной медицинской академии. – 2013. – Т.12, №43. – С. 56-66.
14. Тургенева Л.Б. Лечение воспалительных заболеваний пародонта мексидолом / Л.Б. Тургенева, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова // Патогенез. – 2011. – Т.9, №3. – С. 67.
15. Щулькин А.В. Исследование влияния фитоэкдистерона на выраженность окислительного стресса у крыс / А.В. Щулькин, В.В. Давыдов, Е.Н. Якушева // Вестн. Рос. воен. – мед. академии. – 2012. – № 4. – С. 196-199.
16. Angulo P. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease / P. Angulo // Ann. Hepatol. – 2002. – №1. – P. 12-19.

#### THE INFLUENCE OF NEW OXYPYRIDINE DERIVATIVE ON THE DEVELOPMENT OF TOXIC HEPATITIS

*E.I. Klimkina*

**In conditions of experimental toxic lesion of the liver, hepatoprotective effect of the original chemical compound 2,6-dimethyl-3-oxypyridine adamantane carboxylate has been investigated. It has been shown that this compound effectively reduces the activity of liver enzymes (aspartic and alanine transaminases, lactate dehydrogenase), the content of total bilirubin and activity of free radical oxidation initiated by CCl<sub>4</sub> intoxication. The protective action of the substance on the liver function has been confirmed morphologically.**

**Keywords:** *toxic hepatitis, 2,6-dimethyl-3-oxypyridine adamantane carboxylate, hepatoprotective effect.*

Климкина Е.И. – к.м.н., доц. кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» МЗ РФ.  
214019, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28.  
E-mail: nau@sgma.info.