

# ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОТРАВЛЕНИЙ

## ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТИОФАНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

В. И. Смольякова<sup>1</sup>, М. Б. Плотников<sup>1</sup>, Г. А. Чернышева<sup>1</sup>, И. С. Иванов<sup>1</sup>,  
А. Е. Просенко<sup>2</sup>, Н. В. Кандалинцева<sup>2</sup>

На модели токсического  $CCl_4$ -гепатита у крыс исследовано гепатопротекторное действие тиофана. Показано, что тиофан восстанавливает нарушенную антиоксидантную функцию печени, оказывает нормализующее влияние на активность маркеров цитолиза, улучшает синтетическую функцию печени, углеводный и жировой обмен. По выраженности гепатопротекторного эффекта тиофан подобен силимарину.

**Ключевые слова:** гепатопротекторы, тиофан, силимарин, отравление тетрахлорметаном

### ВВЕДЕНИЕ

Поступление в организм ксенобиотиков различной природы усиливает свободнорадикальные процессы и обусловленное ими перекисное окисление липидов (ПОЛ) [5]. Усиление ПОЛ приводит к нарушению структуры мембран гепатоцитов и угнетению различных функций печени [1, 5, 6, 14, 17]. В связи с этим представляют интерес гепатопротекторы, которые снижают интенсивность процессов ПОЛ, что способствует стабилизации структуры клеточных мембран [2, 14, 16, 17].

Тиофан — бис-[3-(3,5-ди-трет-4-гидроксифенил)-пропил]сульфид — новый препарат, относящийся к классу пространственно-затрудненных фенольных соединений, обладает высокой антиоксидантной активностью и низкой токсичностью [3]. Являясь одновременно фенольным и серосодержащим антиоксидантом, тиофан проявляет антирадикальные и противопероксидные свойства [4]. Ранее нами в эксперименте было показано, что тиофан способен снижать выход аланинаминотрансферазы в русло крови и уменьшать концентрацию малонового диальдегида в гомогенате печени при токсическом гепатите, вызванном  $CCl_4$  [5], что обосновывает перспективность дальнейшего углубленного исследования этого соединения в сравнении с эталоном (силимарин).

Целью настоящей работы является исследование гепатопротекторной активности тиофана согласно требованиям Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [10].

<sup>1</sup> Лаборатория фармакологии кровообращения (зав. — проф. М. Б. Плотников) НИИ фармакологии СО РАМН, 634028, Томск, пр. Ленина, 3.

<sup>2</sup> НИИ химии антиоксидантов ГОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет», Новосибирск.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 40 крысах-самцах Вистар массой 280–340 г, которых содержали на стандартной лабораторной диете. Крысы были разделены на 4 группы: интактные ( $n = 10$ ), группа негативного контроля ( $n = 10$ ), группа позитивного контроля (силимарин,  $n = 10$ ) и опытная группа (тиофан,  $n = 10$ ). У 30 животных моделировали острый токсический гепатит подкожным введением 0,4 мл на 100 г массы 50 % масляного раствора  $CCl_4$  в течение 4 суток [1]. Крысам контрольной и интактной групп вводили 1 мл 1 % крахмальной слизи ежедневно в желудок в течение 7 дней, начиная через сутки после последней инъекции  $CCl_4$ . Крысам группы позитивного контроля в желудок вводили препарат сравнения силимарин (100 мг/кг), крысам опытной группы — тиофан (100 мг/кг) в виде суспензии в 1 % крахмальной слизи по той же схеме.

Исследование антиоксидантной, экскреторной, противовоспалительной и синтетической функций печени проводили в соответствии с рекомендациями [10].

Антиоксидантную функцию печени исследовали по результатам гексеналовой пробы. На следующий день после проведения гексеналовой пробы и через 1 ч после последнего введения препарата или крахмальной слизи животных наркотизировали тиопентал-натрием (60 мг/кг внутривенно) и проводили забор проб крови из общей сонной артерии. Кровь стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия из расчета 9:1 и центрифугировали при 1800 g. Для получения сыворотки часть крови забирали без добавления антикоагулянта и после этапа свертывания пробы крови центрифугировали при 2000 g.

Состояние экскреторной функции печени исследовали по тесту ретенции бромсульфалеина (БСФ, «Sigma»). Ретенцию БСФ в крови (%) определяли в сыворотке крови модифицированным методом по Kienle и Knüchel [12]. Для оценки выраженности вос-

палительной реакции на введение  $CCl_4$  после забора проб крови проводили вскрытие животных и изъятие печени. После взвешивания органа рассчитывали коэффициент масса печени/масса тела в процентах. Экскреторную и антитоксическую функции печени оценивали по содержанию в сыворотке крови общего билирубина (ОБ), свободного билирубина (СБ) и конъюгированного билирубина (КБ). Определения проводили спектрофотометрически по методу Эберлейна [9]. Выраженность цитолиза гепатоцитов определяли по активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ). Для оценки синтетической функции печени в сыворотке крови определяли содержание общего холестерина (ОХ) и липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), а в плазме крови — фибриногена (ФГ) и общего белка (Б). Содержание ОХ и ЛПВП, активность ферментов АсАТ и АлАТ определяли в сыворотке спектрофотометрически. Концентрацию ФГ оценивали методом тромбообразования по Клаусу на коагулометре KG-4 (“Cormay”, Польша). Уровень глюкозы в цельной крови измеряли с помощью глюкометра SmartScan (“Lifescan”, США). Определение содержания липидов проводили гравиметрически после высушивания липидных экстрактов, полученных из гомогената ткани печени крыс. Экстракцию липидов из гомогената печени проводили по методу [8]. Кроме того, в водной фракции гомогената ткани печени определяли содержание триглицеридов. Биохимические исследования проводили с помощью стан-

дартных наборов фирм “Вектор-Бест” (Россия) и “Технология-стандарт” (Россия). Спектрофотометрические исследования проводили на приборах Hitachi, модель 557 (Япония) и Cary 50 Scan (Varian, Австралия).

Все процедуры на крысах проводили в соответствии с положениями Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Животных по окончании эксперимента умерщвляли передозировкой эфирного наркоза.

Результаты обрабатывали с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0. В таблице представлены средние значения показателей и стандартные ошибки среднего значения. Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) между сериями определяли с помощью U-теста Манна-Уитни и  $t$ -критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных контрольной группы введение  $CCl_4$  вызывало достоверное увеличение массы печени (на 29 %) по сравнению с показателем у интактных крыс (таблица), что свидетельствует о развитии воспалительных процессов в органе. Развитие выраженного эндотоксикоза в контрольной группе привело к нарушению антитоксикационной и экскреторной функций печени. Продолжительность гексеналового сна контрольных животных составила  $26,4 \pm 1,5$  мин, что на 86 % превосходило показатель интактных крыс. Утилизация БСФ печенью контрольных животных замедлялась — ретенция БСФ увеличивалась в 2,3 раза. В

**Влияние тиофана (100 мг/кг) и силимарина (100 мг/кг) на показатели функции печени при отравлении тетрахлорметаном**

Показатель	Интактные животные (n = 10)	Контроль (n = 10)	Силимарин (n = 10)	Тиофан (n = 10)
Коэффициент масса печени/масса тела, %	$3,74 \pm 0,10$	$4,76 \pm 0,11^*$	$4,19 \pm 0,16^{*+}$	$3,98 \pm 0,16^+$
Продолжительность гексеналового сна, мин	$14,2 \pm 1,6$	$26,4 \pm 1,5^*$	$16,0 \pm 2,0^+$	$20,0 \pm 2,3^+$
<i>Сыворотка крови</i>				
Ретенции БСФ, %	$5,4 \pm 1,7$	$12,3 \pm 1,0^*$	$7,1 \pm 1,9^+$	$8,4 \pm 1,3^+$
Активность аланинаминотрансферазы, Е/л	$37,3 \pm 3,5$	$47,9 \pm 3,7^*$	$39,2 \pm 3,9$	$36,1 \pm 2,6^+$
Активность аспаратаминотрансферазы, Е/л	$50,1 \pm 7,9$	$71,4 \pm 5,5^*$	$62,6 \pm 3,5$	$55,1 \pm 3,8^+$
Свободный билирубин, мМ/л	$0,5 \pm 0,14$	$1,62 \pm 0,12^*$	$0,59 \pm 0,13^+$	$1,01 \pm 0,24^+$
Конъюгированный билирубин, мМ/л	$1,61 \pm 0,14$	$2,91 \pm 0,48^*$	$2,00 \pm 0,36$	$1,72 \pm 0,22^+$
Общий билирубин, мМ/л	$2,10 \pm 0,18$	$4,52 \pm 0,51^*$	$2,59 \pm 0,28^+$	$2,73 \pm 0,25^+$
Липопротеиды высокой плотности, мМ/л	$1,54 \pm 0,06$	$1,36 \pm 0,07$	$1,56 \pm 0,11^+$	$1,58 \pm 0,07^+$
Общий холестерин, мМ/л	$2,09 \pm 0,04$	$1,80 \pm 0,09^*$	$1,84 \pm 0,05^*$	$1,84 \pm 0,07^+$
<i>Плазма крови</i>				
Фибриноген, г/л	$2,58 \pm 0,07$	$2,26 \pm 0,08^*$	$2,63 \pm 0,14^+$	$2,59 \pm 0,21^*$
Общий белок, г/л	$57,97 \pm 0,73$	$50,91 \pm 1,97^*$	$55,96 \pm 1,72^+$	$55,04 \pm 0,54^{*+}$
<i>Цельная кровь</i>				
Глюкоза, мМ/л	$5,7 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,3^*$	$6,2 \pm 0,2^+$	$5,8 \pm 0,4^+$
<i>Липидный экстракт ткани печени</i>				
Масса липидов, мг/мл	$1,87 \pm 0,05$	$12,99 \pm 0,78^*$	$6,59 \pm 0,40^{*+}$	$6,77 \pm 0,36^{*+}$
<i>Водный экстракт ткани печени</i>				
Триглицериды, мг/г ткани	$6,94 \pm 1,59$	$33,72 \pm 3,35^*$	$17,40 \pm 0,73^{*+}$	$18,11 \pm 1,87^{*+}$

**Примечание.** \* —  $p < 0,05$  по сравнению со значениями интактных животных;

+ —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

сыворотке крови крыс контрольной группы значимо возрастало содержание билирубина: свободного — в 3,2, конъюгированного — в 1,8 и общего — в 2,2 раза. Дисфункция печени контрольных крыс сопровождалась развитием цитолитического синдрома: активность АлАТ и АсАТ в сыворотке крови повышалась на 29 и 63 % соответственно. Коэффициент де Ритеса (отношение АсАТ/АлАТ), позволяющий в известной степени судить о тяжести поражения печени, у животных контрольной группы составил 1,66 (у интактных — 1,31). Развитие токсического поражения печени приводило к выраженным расстройствам липидного обмена. Содержание липидов в печени крыс контрольной группы было в 6,9 раза выше, чем у интактных (таблица). При повреждении печени гепатотоксическими веществами развитие жировой инфильтрации печени обусловлено снижением синтеза апопротеидов, что приводит к нарушению выведения триглицеридов и липопротеидов очень низкой плотности [2]. Содержание триглицеридов в гомогенате ткани печени контрольных животных было повышено в 4,9 раза. В сыворотке крови крыс данной группы достоверно снижалось содержание ЛПВП и ОХ на 12 и 14 % соответственно. Содержание общего белка и фибриногена в плазме уменьшилось на 12 и 13 % соответственно, что отражает нарушение белково-синтетической функции печени. Часто при поражении печени выявляют гипергликемию и снижение толерантности к глюкозе [12]. В наших экспериментах у крыс контрольной группы уровень глюкозы повышался на 30 % по сравнению с интактными животными (таблица).

Таким образом, подкожное введение гепатотоксина  $CCl_4$  крысам вызывает острый токсический гепатит с воспалительной деструкцией печени, о чем свидетельствуют цитолитиз гепатоцитов и нарушение основных функций печени (антитоксической, синтетической и экскреторной), отмечается также холестаза (увеличение свободной фракции билирубина, общего билирубина и ретенции БСФ). Наши результаты согласуются с многочисленными экспериментальными данными других авторов [1, 2, 6, 11].

Введение силимарина препятствовало развитию патологических изменений печени. Масса печени была на 15 % ниже контрольного значения. Продолжительность гексеналового сна снизилась до  $16 \pm 2$  мин. Судя по значениям активности ферментов АлАТ и АсАТ, силимарин способен предотвращать цитолитиз гепатоцитов. Значимое снижение концентрации свободного и общего билирубина, а также коэффициента ретенции БСФ в сыворотке крови животных данной группы на 42, 64 и 43 % соответственно по сравнению с контролем свидетельствует о нормализации экскреторной функции печени. Кроме антиоксической и экскреторной функций печени терапевтическое введение силимарина при остром токсическом гепатите улучшало и синтетическую функцию органа: значимо возрастало содержание ЛПВП и ОБ на 15 и 10 % соответственно,

уровень глюкозы снизился на 14 %. Содержание фибриногена в плазме крови опытных животных возросло на 16 % по сравнению с контролем.

Таким образом, при терапевтическом введении силимарин проявляет выраженные гепатопротекторные свойства, улучшая антиоксическую, синтетическую и экскреторную функции, а также предотвращая цитолитиз гепатоцитов.

Введение тиофана крысам с острым токсическим гепатитом способствовало восстановлению функции печени и снижению проявления эндотоксикоза (таблица). Масса печени крыс опытной группы к концу эксперимента не отличалась от показателя интактных животных. У крыс опытной группы происходило восстановление детоксикационной функции печени. Введение препарата сокращало продолжительность гексеналового сна в 1,3 раза по сравнению с контролем. Ретенция БСФ у опытных крыс была меньше в 1,5 раза по сравнению с контрольными животными. Также значимо снизилось содержание всех фракций билирубина в (1,6 – 1,7 раза). Следовательно, тиофан способен предотвращать холестаза. Отмечено восстановление активности ферментов АлАТ и АсАТ у опытных животных после применения тиофана до значений у интактных крыс. При этом коэффициент де Ритеса в данной группе составил 1,38. Введение тиофана крысам с острым токсическим гепатитом улучшало синтетическую функцию печени и нормализовало жировой обмен: содержание ЛПВП, общего белка и фибриногена возрастало на 26, 8 и 12 % соответственно, а содержание липидов и триглицеридов в гомогенате ткани печени снижалось в 2 раза по сравнению с контролем (таблица). Кроме того, у крыс опытной группы нормализовался уровень глюкозы в крови.

Известно, что свободные радикалы, образующиеся в процессе окисления  $CCl_4$  цитохромом P-450, напрямую разрушают гем этого фермента и повреждают его фосфолипидное микроокружение, иницируя ПОЛ [11]. Процессы липидной пероксидации запускаются уже в течение первых суток после введения  $CCl_4$  [1]. Содержание продуктов ПОЛ сохраняется на повышенном уровне в течение длительного периода [6, 14]. Таким образом, вполне оправданным является применение тиофана, обладающего антиоксидантными свойствами [4], в качестве гепатопротектора в ранние сроки после токсического поражения печени.

## ВЫВОДЫ

1. При остром  $CCl_4$ -гепатите крыс тиофан проявляет выраженные гепатопротекторные свойства, способствуя восстановлению антиоксической, синтетической и экскреторной функций печени, а также нормализуя жировой обмен.

2. По выраженности гепатопротекторных эффектов тиофан не уступает препарату сравнения силимарину.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. И. Бородин, Ю. В. Башкирова, М. С. Любарский, М. А. Колпаков, *Бюл. exper. биол.*, **146**(11), 499–502 (2008).
2. Н. Д. Бунятян, А. П. Власов, А. В. Литвиненко и др., *Клин. фармакол. и терапия*, **17**(2), 94–96 (2008).
3. Т. В. Воевода, Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(4), 57–60 (2000).
4. М. И. Душкин, А. Е. Просенко, Н. В. Канадалинцева, В. В. Ляхович, *Науч. вест. Тюмен. мед. академии*, **23**(1), 11–13 (2003).
5. Н. В. Кандалинцева, А. Е. Просенко, Е. И. Терах и др., *Биоантиоксидант: Тез. докл. VII Междунар. конф.*, 56–57 (2006).
6. Л. Т. Карачурина, Т. А. Сапожникова, Ф. С. Зарудный и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(4), 56–59 (2003).
7. М. А. Колпаков, О. Р. Грек, Ю. В. Башкиров и др., *Бюл. exper. биол.*, **131**(5), 554–556 (2001).
8. А. Б. Косухин, Б. С. Ахметова, *Лаб. дело*, № 5, 335–337 (1987).
9. *Лабораторные методы исследования в клинике*, В. В. Меньшиков (ред.), Москва (1987).
10. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2005).
11. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, *Бюл. exper. биол.*, **127**(4), 392–394 (1999).
12. *Справочник по клиническим функциональным исследованиям*, А. Гиттер, Л. Хейльмейер (ред.), Москва (1966).
13. А. И. Хазанов, *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.*, № 2, 26–32 (2005).
14. И. В. Шилова, Т. В. Жаваронок, Н. И. Суслов, *Бюл. exper. биол.*, **146**(7), 54–57 (2008).
15. G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo et al., *Br. J. Pharmacol.*, **155**(6), 945–956 (2008).
16. E. el-Demerdash, Eel-D. el-Denshary, N. Al-Gharabli A. M. Osman, *Anticancer Res.*, **22**(2a), 977–984 (2002).
17. S. Merat, M. Aduli, R. Kazemi, et al., *Dig. Dis. Sci.*, **53**(8), 2246–2250 (2008).
18. L. P. Yuan, F. H. Chen, L. Ling, *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**(10), 1393–402 (2008).

Поступила 15.11.10

## HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF THIOPHANE IN RATS WITH EXPERIMENTAL CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED HEPATITIS

V. I. Smol'yakova<sup>1</sup>, M. B. Plotnikov<sup>1</sup>, G. A. Chernyshova<sup>1</sup>, I. S. Ivanov<sup>1</sup>,  
A. E. Prosenko<sup>2</sup>, and N. V. Kandalintseva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Research Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Branch of the, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemistry of Antioxidants, Novosibirsk State Pedagogical University, ul. Vilyuiskaya 28, Novosibirsk, 630126, Russia

A hepatoprotective effect of thiophan was studied on the model of carbon tetrachloride-induced hepatitis in rats. Therapeutic administration of thiophan repairs the antitoxic function of liver, normalizes cytolysis marker activity, and improves the synthetic function of liver and the carbohydrate and lipid metabolism. The hepatoprotective activity of thiophan is similar to effect of silimarin.

**Key words:** Hepatoprotectors, thiophane, silimarin, carbon tetrachloride-induced hepatitis