

Л. Б. Бондаренко<sup>1</sup>, А. К. Вороніна<sup>2</sup>, Г. М. Шаяхметова<sup>1</sup>,  
І. С. Блажчук<sup>1</sup>, Т. А. Карацуба<sup>1</sup>, В. М. Коваленко<sup>1</sup>

## Дослідження ефективності лікарського засобу на основі есенціальних фосфоліпідів на моделі токсичного гепатиту

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України», м. Київ

<sup>2</sup>Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

*Ключові слова:* есенціальні фосфоліпіди, гепатопротекторна дія, тетрахлорметан, гепатит

Зі зростанням технологічного та хімічного навантаження на людство в ХХІ столітті люди все частіше стикається з гепатотоксичними агентами (хімічними реагентами, ліками та пестицидами) у процесах трудової діяльності та повсякденного існування. Як наслідок кількість захворювань печінки також росте в усьому світі. Наслідки токсичного ураження печінки гепатотоксичними речовинами дуже серйозні та викликають серйозне занепокоєння вчених у всьому світі [1]. Пошук ефективних засобів лікування уражень печінки є глобальною проблемою охорони здоров'я [2]. Токсичні хімікати, ксенобіотики, алкоголь, неправильне харчування [3], вірусні та мікробні інфекції шкідливі для клітин печінки та здатні їх незворотно вражати.

Есенціальні фосфоліпіди в другій половині ХХ століття знайшли широке медичне застосування в медичній практиці як гепатопротекторні препарати для захисту та покращання функції печінки [4]. Однак оскільки медичне застосування таких препаратів розпочалось ще до остаточного формування світової системи контролю за безпечністю та ефективністю лікарських засобів, то натеper у від-

критому доступі більшість опублікованих досліджень ефектів «есенціальних» фосфоліпідів стосується клінічних випробувань. Доклінічні дані є розрізненими, поодинокими, фрагментарними та стосуються лише окремих препаратів даної групи [4, 5]. Це зумовлено тим, що загалом результати доклінічного вивчення конкретних лікарських засобів на основі фосфоліпідів є корпоративною власністю фірм-виробників і не доступні для світової наукової спільноти. Однак доклінічні дослідження здатні суттєво доповнити сукупність існуючих знань щодо механізмів дії досліджуваних сполук, кінетики їхніх специфічних фармакологічних ефектів і фармакодинаміки.

*Мета дослідження* – оцінка лікувального та профілактичного впливу лікарського засобу на основі есенціальних фосфоліпідів (Ессенціале Н) на пошкодження печінки, що спричинене тетрахлорметаном (ТХМ) у щурів, для отримання додаткової наукової інформації про придатність даного препарату для лікування захворювань печінки.

*Матеріали та методи.* Усі процедури дослідження відповідають вимогам національних регуляторних органів [6]. Із метою вивчення гепатопротекторної ефективності препарату Ессенціале Н на моделі гострого токсичного гепатиту білих щурів самців

(*Rattus norvegicus*) було розподілено на три групи по 10 тварини у кожній: перша – контроль, яким вводили розчинник; щурам другої групи (токсичний гепатит) протягом 7 днів вводили внутрішньоочеревино 50 % олійний розчин ТХМ у дозі 0,5 мл/кг маси тіла; третя група – протягом 7 днів щурам вводили внутрішньоочеревино тест-зразок у дозі 44,26 мг/кг, а через 2 год – 50 % олійний розчин ТХМ у дозі 0,5 мл/кг маси тіла, потім 3 дні тварини отримували тільки тест-зразок [7]. Обрана доза відповідає рекомендованій для застосування в клініці з урахуванням коефіцієнта видової чутливості [8]. Режим введення було обрано відповідно до методичних рекомендацій національних регуляторних органів [6].

Як тест-зразок використовували препарат Ессенціале Н, розчин для ін'єкцій (Ей, Наттерманн енд Сайі ГмбХ, Німеччина).

Протягом усього періоду введення препарату спостерігали за станом тварин, їхнім зовнішнім виглядом і поведінкою.

Через 24 год після останнього введення препарату в тварин під легким ефірним наркозом брали кров зі стегнової вени, а потім їх піддавали евтаназії методом цервікальної дислокації. Печінку відмивали *in situ* через воротну вену охолодженим 1 % розчином КСl, після чого вилучені для біохімічного вивчення шматочки печінки зберігали до використання в рідкому азоті. Усі процедури виконували з дотриманням холодового режиму (4 °С).

Печінку, яку було призначено для біохімічних досліджень, після розморожування гомогенізували у співвідношенні 1:4 (о/о) в 0,05 моль/л трис-НСl буфері (рН 7,4), що містив (у моль/л): 0,025 сахарози, 0,005 MgCl<sub>2</sub>, 0,025 КСl, 0,008 СаCl<sub>2</sub>. Отримували мікросомну фракцію печінки за мето-

дом S. A. Kamath, F. A. Kummerow, K. A. Narayan, проводячи субфракціонування на рефрижераторній центрифугі фірми Жоан (Франція) [9]. Гомогенізацію та субфракціонування виконували з дотриманням холодового режиму (4 °С).

Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів у мікросомальній фракції печінки досліджували, оцінюючи швидкість накопичення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою за методом І. Д. Стальної та Т. Г. Гарішвілі [10].

Вміст відновленого глутатіону в печінці визначали згідно з методом J. Sedlak і R. Lindsay [11] за реакцією з реактивом Еллмана (5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна кислота), враховуючи, що в загальному пулі SH-груп відновлений глутатіон складає 95 %.

Білок у всіх фракціях печінки визначали за методом О. Н. Lowry [12]. Активність аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ), а також вміст білірубину, холестерину в сироватці крові досліджували за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Prestige 24i (Японія), використовуючи тест-набори фірми Cormay (Польща).

Для мікроскопічного дослідження шматочки печінки фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, за стандартною методикою зневоднювали в етанолі зростаючих концентрацій і поміщали в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4–5 мкм фарбували гематоксиліном і еозином. Окремо на заморожених зрізах виявляли нейтрофільний жир Суданом чорним В. Мікроскопію та мікрофотографування проводили за допомогою мікроскопа OLIMPUS BX41.

Нормальність розподілу отриманих даних перевіряли за тестом Шапіро-Уїлка. Отримані дані представляли

як середнє значення  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ) для нормально розподілених змінних або як медіану та 25 і 75 квантилі [Me (25 %; 75 %)] для змінних з ненормальним розподілом. Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) для нормально розподілених змінних та за критерієм Красскела-Уолліса для змінних з ненормальним розподілом. Для статистичної обробки даних використовували програму STATISTICA 10. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною в разі значення  $p \leq 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Глутатіон відіграє вирішальну роль у захисті клітин, вступаючи в реакції кон'югації з потенційно токсичними електрофілами або продуктами ліпопереокиснення [13]. Результати вивчення вмісту відновленого глутатіону (нмоль/мг білка) у печінці самців щурів на моделі ТХМ-індукованого гепатиту після застосування Ессенціале Н наведено в таблиці 1. Аналізуючи отримані дані, можна констатувати, що гостре отруєння щурів ТХМ

супроводжується збільшенням майже в 3 рази вмісту відновленого глутатіону в печінці щурів порівняно з показником інтактних тварин. Значне збільшення синтезу відновленого глутатіону в організмі може бути результатом адаптивної реакції для послаблення цитохром Р-450 2Е1-залежного оксидативного стресу та токсичності [13] у результаті введення ТХМ (індуктора цитохрому 2Е1). Важливо зазначити, що індукція цитохрому Р-450 2Е1 є причиною гіперпродукції вільних радикалів й активних форм кисню (АФК), які ініціюють ланцюгові реакції окиснення мембранних ліпідів і створюють передумови до розвитку окисного стресу, що, у свою чергу, призводить до численних структурно-функціональних порушень у клітинах. Застосування препарату Ессенціале Н запобігало різкому збільшенню вмісту відновленого глутатіону в печінці щурів, а отже й утворенню в організмі АФК і реактивних метаболітів у результаті введення гепатотоксину – ТХМ.

Це підтверджується й нашими даними стосовно інтенсивності про-

Таблиця 1

*Вміст відновленого глутатіону та інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (за вмістом малонового діальдегіду) у печінці самців щурів на моделі ТХМ-індукованого гепатиту й при застосуванні Ессенціале Н ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )*

Показник	Контроль	ТХМ-індукований гепатит	ТХМ-індукований гепатит + Ессенціале Н
Вміст відновленого глутатіону, нмоль/мг білка	8,95 $\pm$ 0,30	26,27 $\pm$ 0,85*	19,92 $\pm$ 2,65*, **
Вміст відновленого глутатіону, мкмоль/г тканини	1,25 $\pm$ 0,11	3,65 $\pm$ 0,35*	2,64 $\pm$ 0,31*, **
МДА, нмоль/хв • мг білка	0,301 $\pm$ 0,019	0,350 $\pm$ 0,008*	0,285 $\pm$ 0,014**

Примітка. Тут і в табл. 2: \*вірогідні зміни порівняно з контролем; \*\*вірогідні зміни порівняно з ТХМ-індукованим гепатитом.

цесів перекисного окиснення ліпідів. Результати дослідження інтенсивності накопичення малонового диальдегіду в печінці щурів наведено в таблиці 1. Аналіз даних таблиці 1 наочно демонструє узгодженість змін вмісту відновленого глутатіону та процесів перекисного окиснення ліпідів за умов токсичного гепатиту та введення препарату есенціальних фосфоліпідів. Згідно з цими даними, швидкість утворення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою в печінці щурів з ТХМ-індукованим гепатитом збільшувалась на 16 % порівняно з контролем. Застосування Ессенціале Н сприяло суттєвому зниженню рівня процесів перекисного окиснення ліпідів та вмісту відновленого глутатіону в печінці. Подібний характер змін відзначався й у роботах інших авторів [13].

Результати вивчення біохімічних показників сироватки крові щурів за умов ТХМ-індукованого гепатиту та застосування Ессенціале Н наведено в таблиці 2.

Білірубін сироватки крові – лабораторний показник, що широко застосовується для діагностики захворювань печінки. За даної моделі токсичного гепатиту спостерігалось збіль-

шення вмісту загального білірубіну в сироватці крові в 2,6 разу порівняно з контролем. Введення досліджуваного препарату значною мірою сприяло нормалізації даного показника: вміст білірубіну зменшився на 37 % за введення Ессенціале Н порівняно з групою з токсичним гепатитом.

Одержані результати цілком узгоджуються з даними авторів, що досліджували ефект іншого препарату есенціальних фосфоліпідів – Ессенціале-форте на більш жорсткій моделі токсичного гепатиту ( $\text{CCl}_4$  у дозі 0,7 мл/кг маси тіла, 7 діб) із використанням меншої в 10 разів дози препарату (4,3 мг/кг Ессенціале-форте) [4]. В їхніх експериментах при токсичному гепатиті рівень загального білірубіну зростав у 5,7 разу, а застосування Ессенціале-форте на тлі гепатиту призводило до нормалізації даного показника, як і в наших експериментах.

У сироватці крові тварин з токсичним гепатитом вірогідно збільшився вміст холестерину (на 35 %) порівняно з показником щурів групи контролю. У тварин, що отримували Ессенціале Н на тлі гепатиту, даний показник вірогідно не відрізнявся від контролю.

Таблиця 2

*Біохімічні показники сироватки крові щурів-самців за умов ТХМ-індукованого гепатиту та застосування Ессенціале Н ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )*

Показник	Контроль	ТХМ-індукований гепатит	ТХМ-індукований гепатит + Ессенціале Н
Загальний білірубін, мг/дл	1,88 ± 0,18	4,80 ± 0,6*	3,03 ± 0,29*, **
Холестерин, ммоль/л	1,66 ± 0,09	2,20 ± 0,05*	1,68 ± 0,11**
Аланінамінотрансфераза, МО/л	63,44 ± 3,35	119,45 ± 12,77*	80,50 ± 9,50**
Аспаратамінотрансфераза, МО/л	157,0 ± 8,16	210,82 ± 13,44*	178,0 ± 13,83**
Лужна фосфатаза, МО/л	280,66 ± 15,08	352,76 ± 26,43*	335,01 ± 25,22
Гамма-глутамілтрансфераза, МО/л	0,29 ± 0,12	1,63 ± 0,20*	0,99 ± 0,18*, **

У роботах інших авторів також відмічалась тенденція до зростання вмісту загального холестерину в сироватці крові за умов токсичного гепатиту, однак ці зміни не досягали рівня вірогідності [4].

У результаті проведених досліджень встановлено, що в сироватці крові щурів групи з токсичним гепатитом активність АлАТ і АсАТ збільшилась відповідно в 1,9 і 1,3 разу порівняно з контролем (табл. 2). Це свідчить про активацію маркерних ферментів цитолізу при введенні гепатотоксину й про посилення некрозо-дистрофічних порушень у гепатоцитах. Застосування Ессенціале Н призводило до зниження активності АлАТ і АсАТ на 33 % і 16 % відповідно та їхньої фактичної нормалізації (табл. 2).

Також за умов уведення ТХМ відмічалось значне зниження коефіцієнта де Рітіса (АсАТ/АлАТ) – на 29 %, що характеризує високий ступінь ураження печінки. При застосуванні Ессенціале Н співвідношення АсАТ/АлАТ нормалізувалось.

Одержані результати щодо змін активності АлАТ і АсАТ за умов уведення ТХМ цілком узгоджуються з даними інших авторів [4], хоча в їхньому дослідженні не була досягнута виражена нормалізація даних показників за введення Ессенціале-форте, можливо, через занижку дозу препарату, обрану авторами.

Збільшення лужно-фосфатазної активності сироватки крові в 1,3 разу за введення гепатотоксину вказує на розвиток холестазу (табл. 2). За умов застосування Ессенціале Н активність ЛФ значно зменшилась (вірогідних відмінностей від рівня даного фермента в контрольній групі відзначено не було). У роботах інших авторів за аналогічних змін активності ЛФ при токсичному гепатиті не вда-

лось досягнути нормалізації даного показника при введенні есенціальних фосфоліпідів, можливо, також через занадто низьку дозу препарату, обрану дослідниками [4].

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 (табл. 2). У тварин, що отримували Ессенціале Н, активність ГГТ вірогідно знизилась у 1,7 разу порівняно з показником групи токсичного гепатиту, що разом з корекцією активностей АлАТ, АсАТ і ЛФ може бути доказом гепатопротекторної активності досліджуваного препарату.

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

При розтині цих тварин серозні оболонки плевральної та навколосерцевої порожнини гладенькі, блискучі, без проявів ушкоджень і запалення, кількість вільної серозної рідини в порожнинах не збільшена.

Що стосується червоної порожнини, то в усіх тварин, яким вводили ТХМ, і в тварин, яким вводили Ессенціале Н на тлі гепатиту, індукованого ТХМ, у вісцеральній серозній оболонці очеревини та фіброзній капсулі печінки спостерігалась запальна реакція, яка супроводжувалась адгезією часток печінки. Якщо в тварин групи контролю краї органа були конусоподібної форми, то в експериментальних тварин вони були заокруг-

лені, а печінка мала коричнево-жовтий відтінок.

При мікроскопічному дослідженні препаратів печінки контрольних і дослідних тварин порушень гістоархітекτονіки органа не спостерігалось. 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 токсичного гепатиту й у 55 % після застосування Ессенціале Н на моделі гепатиту були осередковано потовщені, розрихлені й інфільтровані гістіоцитами та лімфоцитами. У цих тварин під капсулою виявлялися значно збільшені в розмірі кулеподібні гепатоцити зі зернистою чи оптично пустою цитоплазмою. Ядра в таких клітинах були невеликих розмірів з щільною каріоплазмою, ядерця в них не визначались.

У печінці тварин групи токсичного гепатиту та щурів, яким вводили Ессенціале Н на тлі гепатиту, індукованого ТХМ, у цитоплазмі гепатоцитів виявлялися вакуолі. При фарбуванні Суданом чорним В у паренхіматозних клітинах тварин групи контролю реакція на жир була негативною, тоді як у тварин решти груп реакція на ліпіди була позитивною.

У тварин, які отримували Ессенціале Н, порівняно з групою токсичного гепатиту ознаки жирової інфільтрації гепатоцитів були меншими, переважали дрібні та середні ліпідні включення.

Слід відзначити, що в усіх тварин групи токсичного гепатиту та в деяких тварин, яким вводили Ессенціале

Н, поряд з незмінними ядрами подекуди зустрічались поодинокі значно збільшені в розмірі ядра, хроматинові зерна в яких були грубими, розміщувались дифузно по каріоплазмі чи поблизу каріолеми. У печінкових часточках інфільтрація мала дифузний характер. Це свідчить про наявність хронічної форми запального процесу.

Також зрідка зустрічалися гепатоцити з ознаками альтерації, їхня цитоплазма була еозинофільною, ядра деформовані чи лізовані. Спостерігалися також осередки повнокрів'я міжчасточкових вен і синусоїдів, у просвіті останніх відмічалася збільшена кількість мононуклеарів. Зірчасті ретикулоендотеліоцити осередковано були активними, ядра їх збільшені в розмірі, витягнутої форми, інтенсивно фарбувалися гематоксиліном.

Таким чином, за даних умов експерименту в щурів групи токсичного гепатиту виявлена значна запальна реакція в капсулі печінки та вісцеральній очеревині, тоді як при застосуванні Ессенціале Н вона спостерігалась в меншій кількості тварин і носила осередковий характер. У тварин групи, що отримувала Ессенціале Н, ознаки жирової інфільтрації гепатоцитів спостерігалися в меншій мірі, переважали дрібні та середні ліпідні включення порівняно з тваринами групи токсичного гепатиту.

Одержані результати біохімічних і морфологічних досліджень цілком узгоджуються між собою. Зокрема, відзначено підвищення рівнів активності АЛАТ і АсАТ, яке може бути ознакою втрати функціональної цілісності клітинних мембран у печінці, що завжди пов'язано з гепатонекрозом [14, 15]. Результати мікроскопічного дослідження тканин печінки при токсичному гепатиті

підтвердили ушкодження клітин печінки  $CCl_4$ . Введення Ессенціале Н зумовило значне зниження активності трансаміназ порівняно з токсичним гепатитом, що є показником стабілізації плазматичної мембрани, а також початку процесів відновлення пошкодженої печінкової тканини [16]. Подібна, але менш чітко виявлена картина була відзначена й у роботах інших авторів [4].

До складу есенціальних фосфоліпідів входять поліенілфосфатидилхоліни – це клас фосфоліпідів, який захищає печінку шляхом стимуляції регенерації клітин печінки [17]. Таким чином, зниження ферментативної активності трансаміназ у групі з введенням Ессенціале Н можна пояснити впливом поліенілфосфатидилхолінів, присутніх у препараті. Це припущення також підтверджується результатами мікроскопічного дослідження печінки щурів цієї групи. Аналіз відзначених змін у щурів другої та третьої груп дозволяє припустити, що, можливо, поліенілфосфатидилхоліни не стільки роблять гепатоцити стійкими до токсичної дії  $CCl_4$ , скільки сприяють подальшій регенерації після дії гепатотоксину.

Активність ЛФ була значно вищою в групі з токсичним гепатитом, ніж у контрольних щурів, у результаті пошкодження печінки, викликаного  $CCl_4$ . При ураженні печінки гепатотоксичними речовинами відбувається порушення виведення жовчі печінкою, холестаза, що викликає підвищення активності ЛФ у сироватці [18]. Активність ЛФ була значно нижчою в групі з введенням Ессенціале Н, ніж у групі токсичного гепатиту.

Подібним чином рівень загального білірубіну був значно підвищений у групі токсичного гепатиту порівняно з контрольною групою, можливо, внаслідок нездатності печінки метаболізувати, а потім виводити білірубін через жовчні протоки та жовчний міхур у кишечник, що вказує на ураження печінки та холестаза. Рівень білірубіну в групі з введенням Ессенціале Н знижувався, що є вагомим свідченням відновлення нормальної функції печінки та жовчних протоків.

Виявлене підвищення рівня холестерину за токсичного гепатиту могло бути наслідком пошкодження паренхіматозних клітин печінки, що призвело до порушення ліпідного обміну в печінці [19] та підтверджується даними мікроскопічних досліджень тканин печінки з Суданом чорним В. Спостерігалось значне зниження загального рівня холестерину в групі, яка отримувала Ессенціале Н, порівняно з групою токсичного гепатиту. Це цілком узгоджується з даними клінічних випробувань, коли есенціальні фосфоліпіди використовувалися для лікування гіперхолестеринемії [20].

## Висновки

Таким чином, результати дослідження фармакологічної ефективності Ессенціале Н показали, що за даних умов експерименту він має чіткий гепатопротекторний ефект, який реалізується не тільки за рахунок мембраностабілізуючих властивостей фосфоліпідів, а й у результаті полегшення регенерації гепатоцитів.

1. Subramoniam A., Pushpangadan P. Development of phytomedicine for liver diseases. *Indian J. Pharmacol.* 1999. V. 31 (3). P. 166–175.
2. Hepatoprotective effect of *Encostemma Littorale blume* and *Eclipta alba* during ethanol induced oxidative stress in albino rats. P. Baranisrinivasan, E. K. Elumalai, C. Sivakumar et al. *Inter J. Pharmacol.* 2009. V. 5 (4). P. 268–272.
3. Marina N. Hepatotoxicity of antiretroviral: incidence, mechanisms and management. *J. Hepatol.* 2006. V. 44 (1). P. S132–S139.
4. Prophylactic and curative assessment of Essentiale Forte® on carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. O. S. Olukiran, R. O. Akomolafe, K. D. Vamitale et al. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences.* 2014. V. 2, № 3. P. 408–414. <http://dx.doi.org/10.3889/oamjms.2014.070>.
5. Дослідження підгострої токсичності лікарського засобу на основі есенціальних фосфоліпідів. Л. Б. Бондаренко, А. К. Вороніна, Г. М. Шаяхметова та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2022. Т. 16, № 4. С. 248–263. <https://doi.org/10.33250/16.04.248>.
6. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. Київ : ВД «Авіцена», 2001. 527 с.
7. Uma Maheswari M., Rao P.G.M. Antihepatotoxic effect of grape seed oil on rat. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management.* V. 9(3). P. 77-80.
8. Guidance for Industry and reviewers estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers US. Of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER. URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
9. Kamath S. A., Kummerow F.A., Narayan K.A. A simple method for the isolation of rat liver microsomes. *FEBS Letters.* 1971. V.17, №1. P. 90-92.
10. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биологии; под ред. В. Н. Ореховича. Москва : Медицина, 1977. С. 66–68.
11. Sedlak J., Lindsay R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry.* 1968. V. 25 (1). P. 192–205.
12. Protein measurement with Folin phenol reagent. O. H. Lowry, N. J. Rosebroughch, A. L. Farr, R. J. Randall. *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
13. Григор'єва Н. П., Лопушинська І. В. Кореляційні зв'язки показників системи антиоксидантного захисту нирок щурів. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2016. Т. XV, № 2 (56). Ч. 2. С. 26–28.
14. Naik S. R., Panda V. S. Hepatoprotective effect of Ginkgoselect phytosome in rifampicin induced liver injury in rats. *Fitoterapia.* 2008. V. 79. P. 439–445.
15. Rajesh M. G, Latha M. S. Preliminary evaluations of the antihepatotoxic effect of Kamilari, a polyherbal formulation. *J. Ethnopharmacol.* 2004. V. 91. P. 99–104.
16. Thabrew M. I., Joice P. D. T. M., Rajatissa W. A comparative study of the efficacy of Pavetta indica and Osbeckia octandra in the treatment of liver dysfunction. *Planta Med.* 1987. V. 53. P. 239–241.
17. Wallnoefer H., Hanusch M. Essential phospholipids in the treatment of hepatic disease. *Med Monatsschr.* 1973. V. 27. P. 131–136.
18. Redinger R. N., Small D. M. Bile composition, bile salt metabolism and gallstones. *Arch. Intern. Med.* 1972. V. 130 (4). P. 618–630.
19. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. P. Muriel, N. Alba, V. M. Perez-Alvarez et al. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 2001. V. 130. P. 219–226.
20. Essential phospholipids in the treatment of chronic pyelonephritis. A. A. Ovchinnikov, V. E. Tsvettsikh, B. A. Berdichevskii et al. *Urol. Nefrol. (Mosk).* 1996. V. 4. P. 7–9.

**Л. Б. Бондаренко, А. К. Вороніна, Г. М. Шаяхметова, І. С. Блажчук,  
Т. А. Карацуба, В. М. Коваленко**

### **Дослідження ефективності лікарського засобу на основі есенціальних фосфоліпідів на моделі токсичного гепатиту**

Зі збільшенням технологічного та хімічного навантаження на людство в XXI столітті люди все частіше стикаються з гепатотоксичними агентами (хімічними реагентами, ліками та пестицидами) у процесах трудової діяльності та повсякденного існування. Як наслідок кількість захворювань печінки також росте в усьому світі. Пошук ефективних засобів лікування уражень печінки є серйозною глобальною проблемою охорони здоров'я. Есенціальні фосфоліпіди в другій половині XX століття знайшли широке застосування в медичній практиці як гепатопротекторні препарати для захисту та покращання функції печінки. Однак доклінічні дані їхнього вивчення розрізнені, поодинокі, фрагментарні та стосуються лише окремих препаратів даної групи, хоча вони здатні суттєво доповнити сукупність існуючих знань щодо механізмів дії досліджуваних сполук, кінетики їхніх специфічних фармакологічних ефектів і фармакодинаміки.



**Мета дослідження** – оцінка лікувального та профілактичного впливу лікарського засобу на основі есенціальних фосфоліпідів (Есенціале Н) на пошкодження печінки, що спричинене тетрахлорметаном (ТХМ) у щурів, для отримання додаткової наукової інформації про придатність даного препарату для лікування захворювань печінки.

Із метою вивчення гепатопротекторної ефективності препарату на основі есенціальних фосфоліпідів на моделі гострого токсичного гепатиту білих щурів самців (*Rattus norvegicus*) було розподілено на три групи по 10 тварини у кожній: перша – контроль, яким вводили розчинник; щурам другої групи (токсичний гепатит) протягом 7 днів вводили внутрішньоочеревинно 50 % олійний розчин ТХМ у дозі 0,5 мл/кг маси тіла; третя група — протягом 7 днів щурам вводили внутрішньоочеревинно препарат на основі есенціальних фосфоліпідів (Есенціале-Н) у дозі 44,26 мг/кг, а через 2 год – 50 % олійний розчин ТХМ у дозі 0,5 мл/кг маси тіла, потім 3 дні тварини отримували тільки Есенціале-Н. У кінці експерименту тварин знеживлювали, проводили макроскопічні та мікроскопічні дослідження, визначали біохімічні показники сироватки крові та печінки.

Проведені дослідження дозволили виявити гепатопротекторний ефект Есенціале Н на всі досліджені показники. Застосування препарату Есенціале Н запобігло різкому збільшенню вмісту відновленого глутатіону в печінці щурів, а отже й утворенню в організмі активних форм кисню та реактивних метаболітів у результаті введення гепатотоксину, а також сприяло суттєвій нормалізації антиоксидантного гомеостазу в печінці. У тварин, що отримували Есенціале Н, відзначалась також вірогідна корекція рівнів активності гамма-глутамілтрансaminaзи, аланінамінотрансферази, аспаратамінотрансферази та лужної фосфатази, що може бути доказом гепатопротекторної активності досліджуваного препарату. Одержані результати біохімічних і морфологічних досліджень цілком узгоджуються між собою.

За даних умов експерименту в щурів групи токсичного гепатиту була виявлена значна запальна реакція в капсулі печінки та вісцеральній очеревині, тоді як при застосуванні Есенціале Н вона спостерігалась у меншій кількості тварин і носила осередковий характер. У тварин групи, що отримувала Есенціале Н, ознаки жирової інфільтрації гепатоцитів спостерігалися в меншому ступені, переважали дрібні та середні ліпідні включення порівняно з тваринами групи токсичного гепатиту.

Результати дослідження фармакологічної ефективності Есенціале Н показали, що за даних умов експерименту він має чіткий гепатопротекторний ефект, який скоріш за все реалізується не тільки за рахунок мембраностабілізуючих властивостей фосфоліпідів, а й у результаті полегшення регенерації гепатоцитів.

**Ключові слова:** есенціальні фосфоліпіди, гепатопротекторна дія, тетрахлорметан, гепатит

**L. B. Bondarenko, A. K. Voronina, G. M. Shayakhmetova, I. S. Blazhchuk, T. A. Karatsuba, V. M. Kovalenko**

### **Study of essential phospholipids preparation efficacy on toxic hepatitis model**

With the growth of technological and chemical burden on humanity in the 21<sup>st</sup> century, people are increasingly faced with hepatotoxic agents (chemical reagents, drugs and pesticides) in the processes of work and everyday existence. As a consequence, the incidence of liver disease is also on the rise worldwide. The search for effective treatments of liver damage is a major global public health problem. Essential phospholipids in the second half of the 20<sup>th</sup> century were widely used in medical practice as hepatoprotective drugs to protect and improve liver function. However, preclinical data of these studies are scattered, isolated, fragmentary and concern only individual drugs of the group, although they can significantly supplement the existing knowledge on the mechanisms of action of the studied compounds, the kinetics of their specific pharmacological effects and pharmacodynamics.

*The aim of the study* – to evaluate the therapeutic and prophylactic effects of Essentiale N on tetrachloromethane (TCM) – induced liver damage in rats in order to provide additional scientific information on the suitability of this drug for the treatment of liver diseases.

In order to study the hepatoprotective efficacy of Essentiale N on the model of acute toxic hepatitis of white rats, males (*Rattus norvegicus*) were divided into three groups of 10 animals each: the first group was the control, which was injected with only the solvent; rats of the second group (toxic hepatitis) were intraperitoneally injected with a 50 % oil solution of TCM at a dose of 0.5 ml/kg of body weight for seven days; the third group – for seven days rats were injected intraperitoneally with Essentiale N at a dose of 44.26 mg/kg, and after 2 hours – with a 50 % oil solution of TCM at a dose of 0.5 ml/kg of body weight, then for three days the animals received only Essentiale N. At the end of the experiment, the animals were sacrificed, macroscopic and microscopic studies were performed, and biochemical parameters of serum and liver tissue were determined.

The conducted studies revealed the hepatoprotective effect of Essentiale N on all studied parameters. The use of Essentiale N prevented a sharp increase in the content of reduced glutathione in the liver of rats, and hence the formation of oxidizing agents and reactive metabolites in the body as a result of hepatotoxin administration, and also contributed to a significant normalization of antioxidant homeostasis. In animals treated with Essentiale N, there was also a significant correction of the levels of GGT, ALT, AST and AP activity, which could serve as evidence of its hepatoprotective activity.

---

---

The results of biochemical and morphological studies are consistent with each other. Under these experimental conditions, in rats of the group with toxic hepatitis, a significant inflammatory reaction was found in the liver capsule and visceral peritoneum, while when Essentiale N was used, these changes were observed in a smaller number of animals and were of a focal nature. In animals of the group treated with Essentiale N, in addition, signs of fatty infiltration of hepatocytes were observed to a lesser extent, and small and medium lipid inclusions predominated compared to animals of the group with toxic hepatitis. The results of the study of Essentiale N pharmacological efficacy showed that under these experimental conditions it had a clear hepatoprotective effect, most likely realized not only due to the membrane-stabilizing properties of phospholipids, but also as a result of facilitating the regeneration of hepatocytes.

*Key words: essential phospholipids, hepatoprotective effect, tetrachloromethane, hepatitis*

---

Надійшла: 27 січня 2023 р.

Прийнята до друку: 22 березня 2023 р.

**Контактна особа:** Бондаренко Лариса Борисівна, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 67 683 26 59.  
Електронна пошта: larabon04@yahoo.com