



СПХФУ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)
Фармацевтический факультет

Гусева Александра Олеговна

**Исследовательская работа
по специальности 33.05.01 Фармация
на тему:**

**«Влияние эмпagliфлозина и орнитина на показатели липидно-углеводного
обмена и оксидативного стресса при экспериментальной неалкогольной
жировой болезни печени»**

Руководители работы:

Доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Болотова Вера Цезаревна

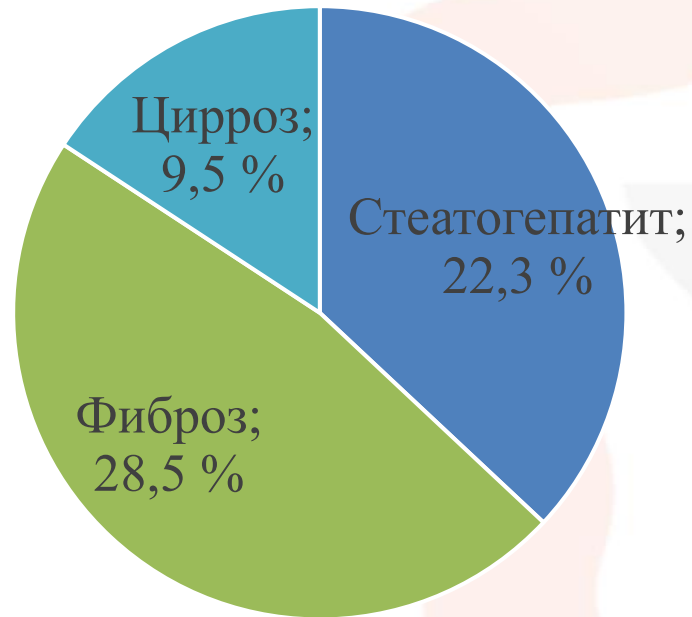
Доцент кафедры биохимии Спасенкова Ольга Михайловна

Санкт-Петербург 2021 г.

Актуальность работы

Глобальная распространенность НАЖБП
составляет около 25% (по данным на 2016 г.)

**Частота встречаемости различных форм патологии
в общей популяции в мире**



**Распространенность НАЖБП по регионам, N=8
млн. чел.**



Лазебник Л.Б., Голованова Е.В., Туркина С.В., Райхельсон К.Л., Оковитый С.В., Драпкина О.М. и др. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;1(1):4-52.

Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, Wai-Sun Wong V, Yilmaz Y, George J, Fan J, Vos MB. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019 Jun;69(6):2672-2682.

Цель и задачи исследования

Целью исследования было изучение влияния эмпаглифлозина и орнитина на динамику биохимических показателей липидного и углеводного обмена, а также показатели оксидативного стресса при НАЖБП у лабораторных животных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить показатели липидного и углеводного обмена в печени и крови у мышей на модели неалкогольной жировой болезни печени с добавлением к гиперкалорийной диете тетрахлорметана в сравнении с интактными животными;
- 2) Изучить биохимические показатели системы перекисного окисления и антиоксидантного статуса животных с экспериментальной НАЖБП в сравнении с интактными;
- 3) Оценить действие препаратов эмпаглифлозина и орнитина на жировой и углеводный обмен, а также процессы перекисного окисления и антиоксидантный статус у экспериментальных животных с НАЖБП.

Материалы и методы

Объект исследования. Эмпаглифлозин представляет собой (2S,3R,4R,5S,6R)-2-[4-хлоро-3-[[4-[(3S)-оксолан-3-ил]оксифенил]метил]фенил]-6-(гидроксиметил)оксан-3,4,5-триол.

➤ Является обратимым, высокоактивным, селективным и конкурентным ингибитором натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (SGLT2). Препятствует реабсорбции глюкозы в проксимальных почечных канальцах.

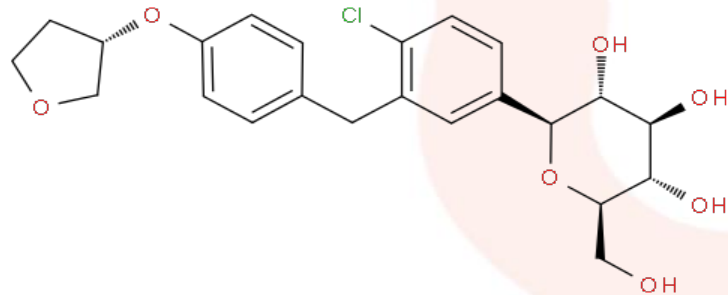


Рисунок 1. Химическая формула эмпаглифлозина

Референтный препарат. Орнитин представляет собой L-альфа,бета-диаминовалериановую кислоту в виде аспартата.

➤ Гепатопротекторное, гипоазотемическое средство в лекарственной форме гранул для приготовления раствора для приема внутрь в дозе 1,5г/кг.

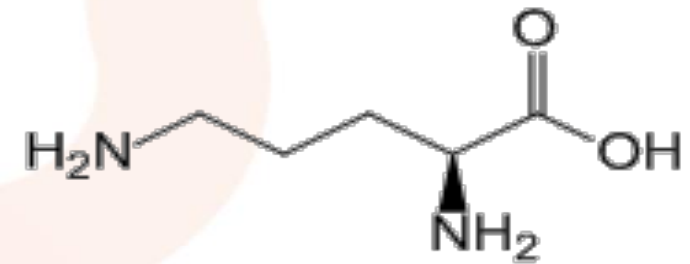


Рисунок 2. Химическая формула орнитина

Материалы и методы

Животные: 100 мышей-самцов
линии C57Bl/6, массой тела 20-25 г.



1 группа (25 мышей)	Интактные животные
2 группа (25 мышей)	Экспериментальная, на которой была поставлена модель НАЖБП
3 группа (25 мышей)	Модель НАЖБП + эмпagliфлoзин (Джардинс®, испытуемый препарат)
4 группа (25 мышей)	Модель НАЖБП + L-орнитин (референсный препарат)

Исследуемый препарат и препарат сравнения вводили в течение всего эксперимента (20 недель) 1 раз в день в следующих дозировках: эмпagliфлoзин 2мг/кг; L-орнитин 1,5г/кг.

Модель НАЖБП:

Высокожировая западная диета и инъекционное введение тетрахлорметана (CCl₄)

✓ Диета включала добавление 21,1% говяжьего жира топленого, 41% d-фруктозы и 1,25% холестерина к стандартному корму, а также 42 г/л d-фруктозы в питьевую воду.

✓ CCl₄ вводился один раз в неделю внутрибрюшинно в дозе 0,32мг/г массы тела, предварительно растворенный в миндальном масле

Интактные животные получали стандартный корм и питьевую воду без добавок.

Результаты исследования

Гистологическое исследование тканей печени

Печень здоровых животных

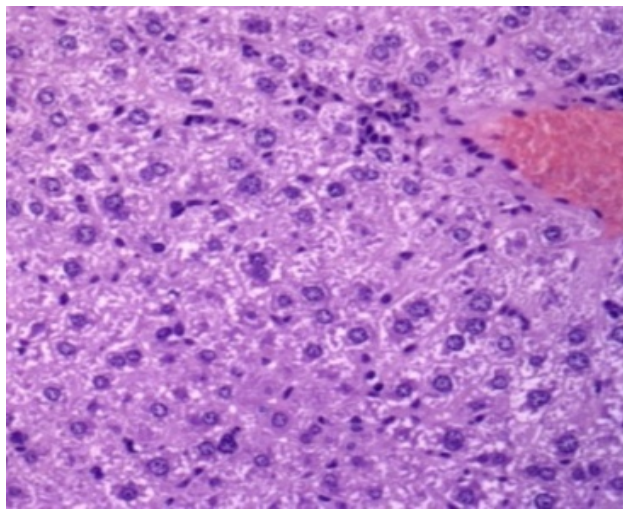


Рисунок 3. Нормальная гистологическая картина тканей печени. Структура печеночной ткани сохранена, портальные тракты без фиброза и патологической инфильтрации

Печень животных с НАЖБП

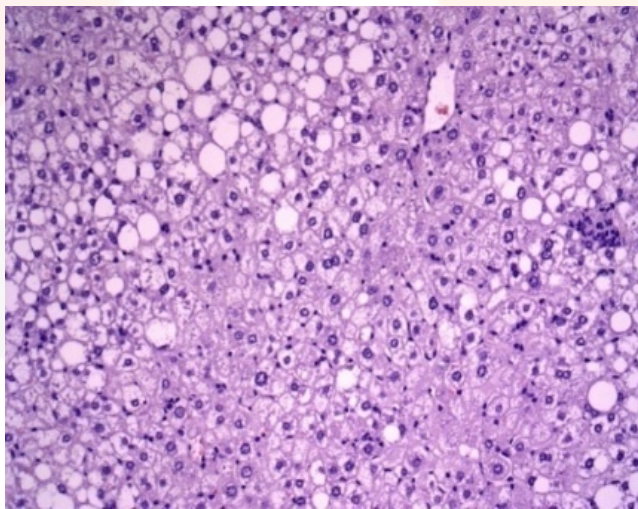


Рисунок 4. Умеренно выраженная баллонная дистрофия и центролобулярные некрозы, слабо выраженный гранулематозный холестатический гепатит, умеренно выраженная крупно-среднекапельная жировая дистрофия 30-40% гепатоцитов

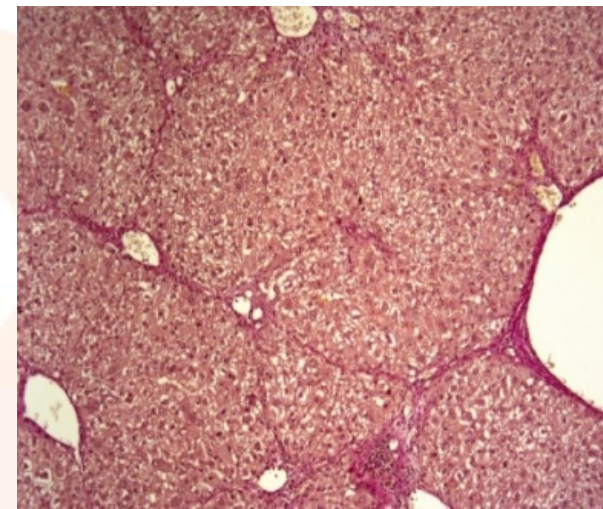


Рисунок 5. Умеренно выраженный фиброз

Результаты исследования

Гистологическое исследование тканей печени

**Печень животных, получавших
эмпаглифлозин**

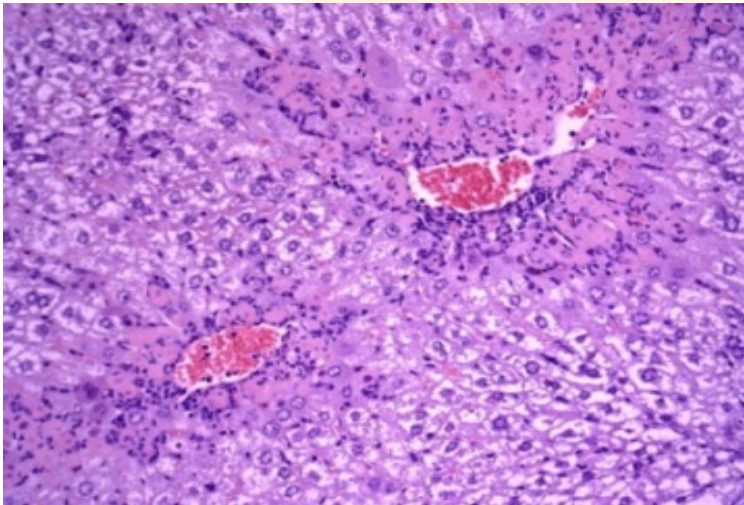


Рисунок 6. Слабо выраженный
гранулематозный холестатический
гепатит

**Печень животных, получавших L-
орнитин**

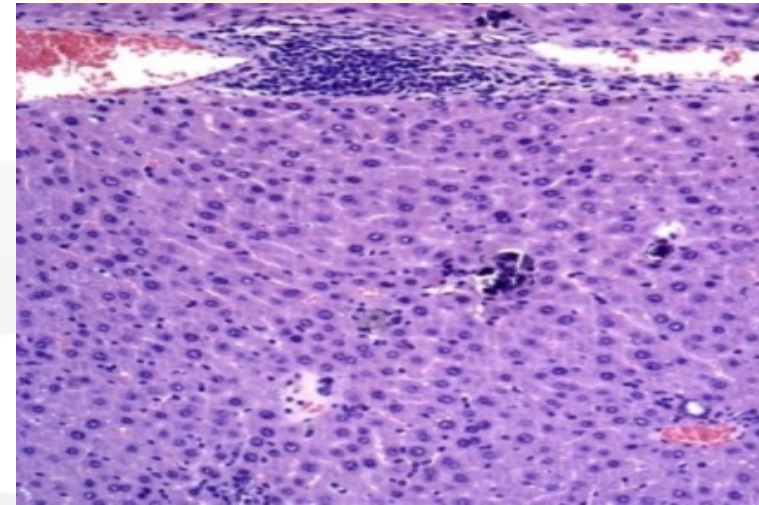
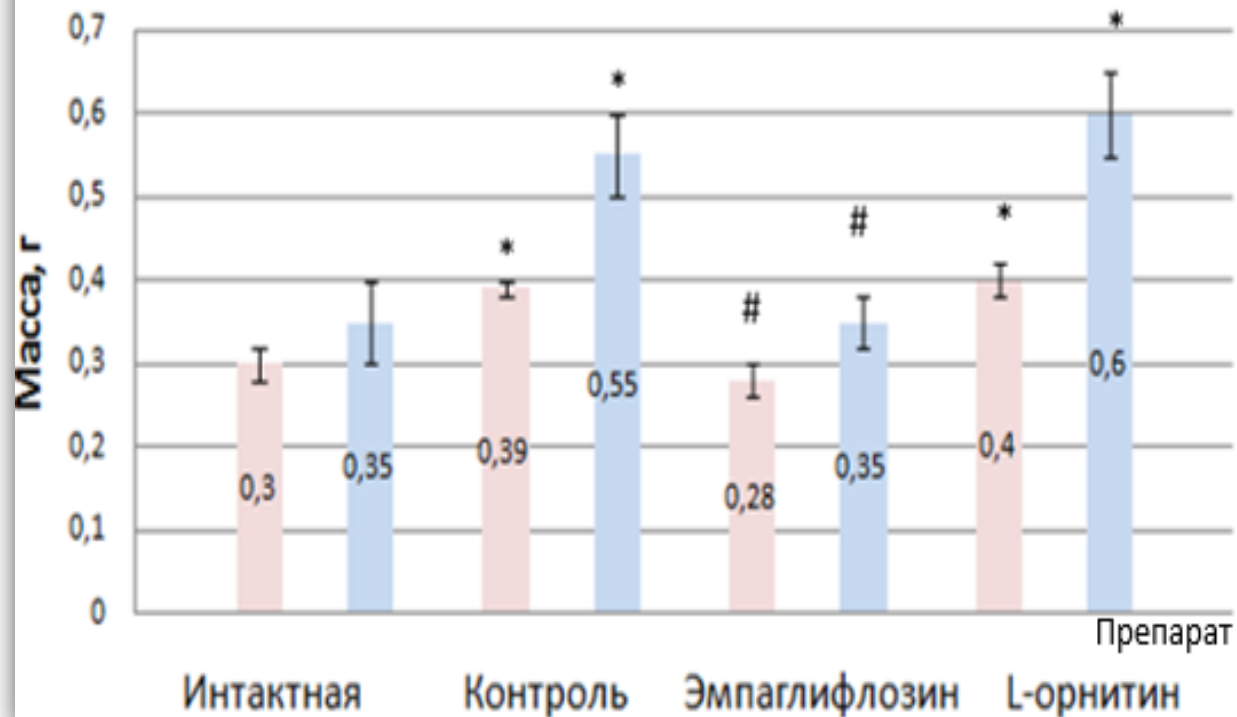


Рисунок 7. Слабо выраженный
гранулематозный холестатический
гепатит

Результаты исследования

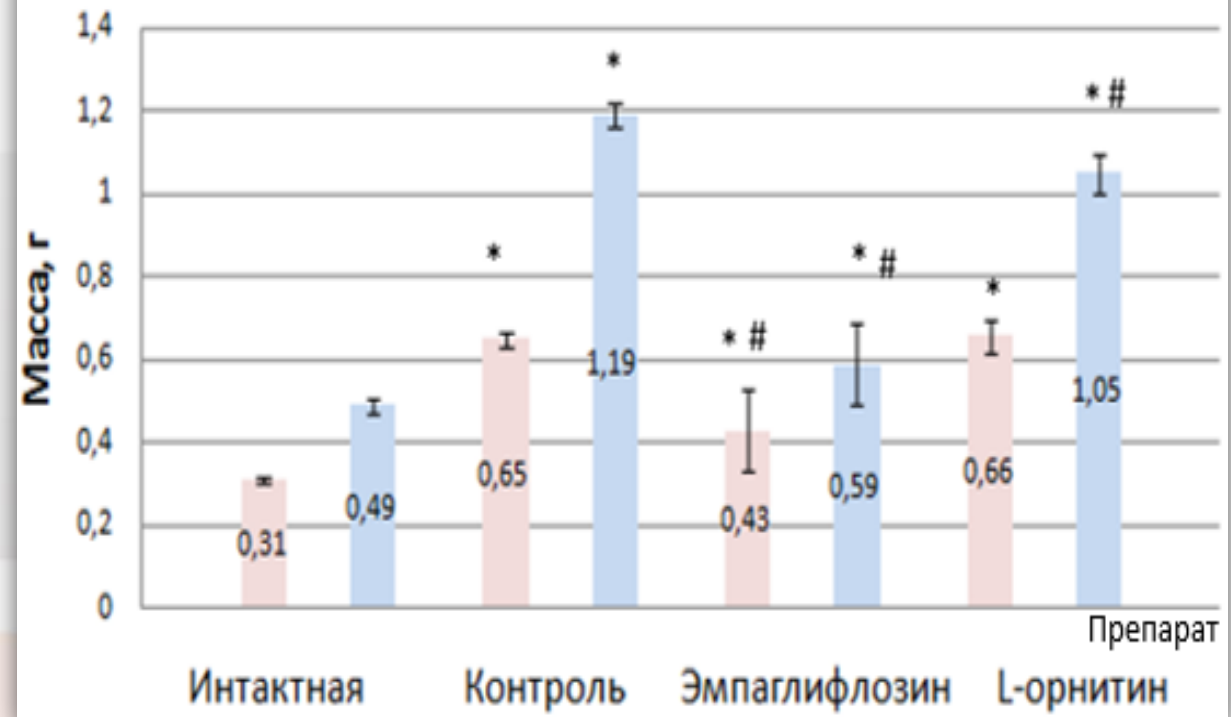
Показатели массы жирового депо на 10-й неделе

Эпидидимальный жир Висцеральный жир



Показатели массы жирового депо на 20-й неделе

Эпидидимальный жир Висцеральный жир

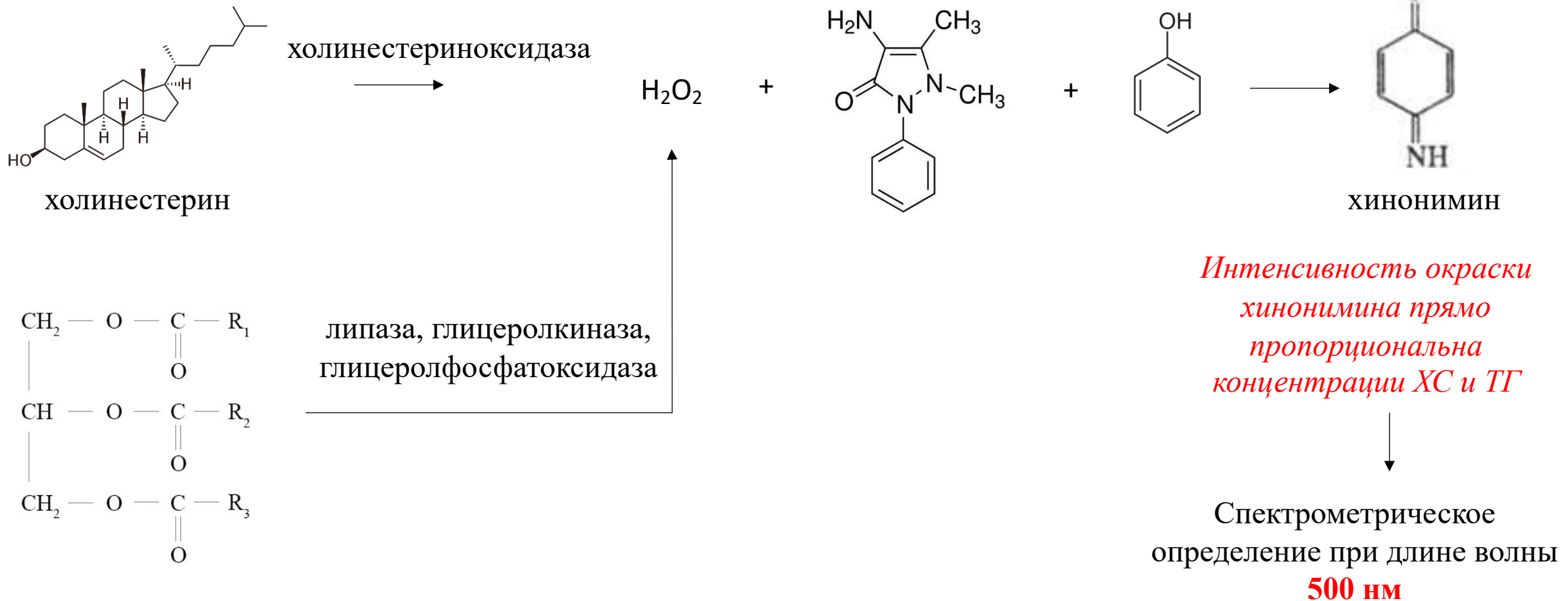


* $P < 0,05$ по сравнению с интактной группой;
$P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Материалы и методы

Метод определения холестерина и триглицеридов в сыворотке крови

Колориметрический метод

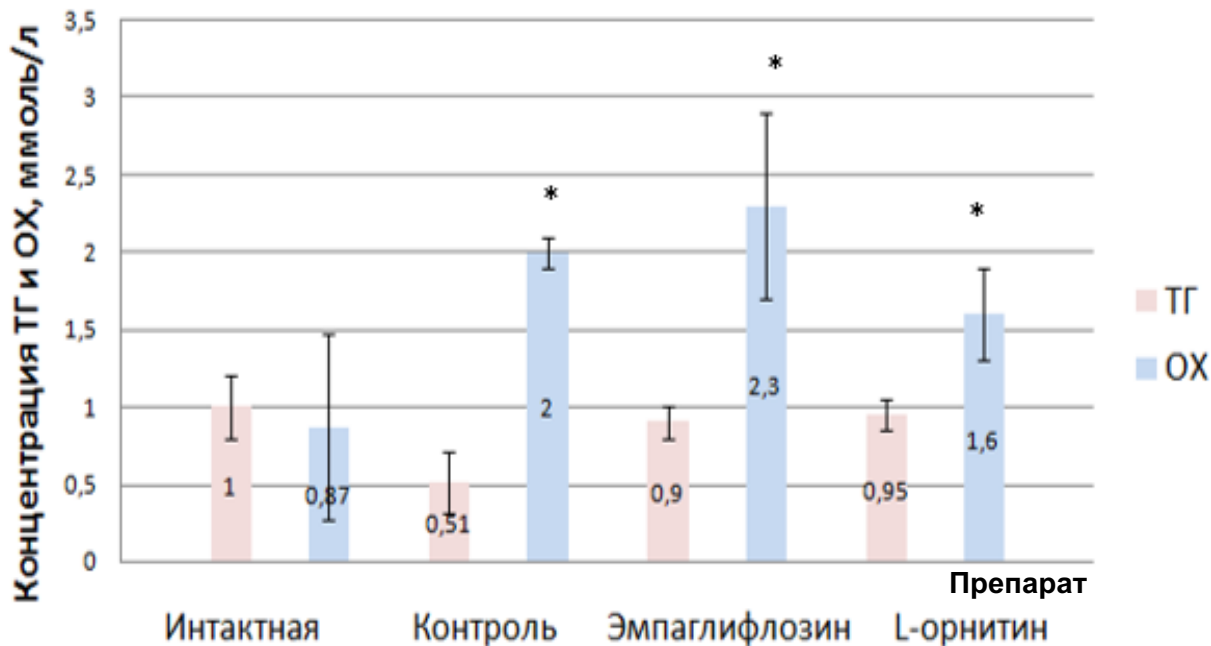


Artiss JD, Zak B. Measurement of cholesterol concentration. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, Eds. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC Press. – 1997. – P. 99-114.

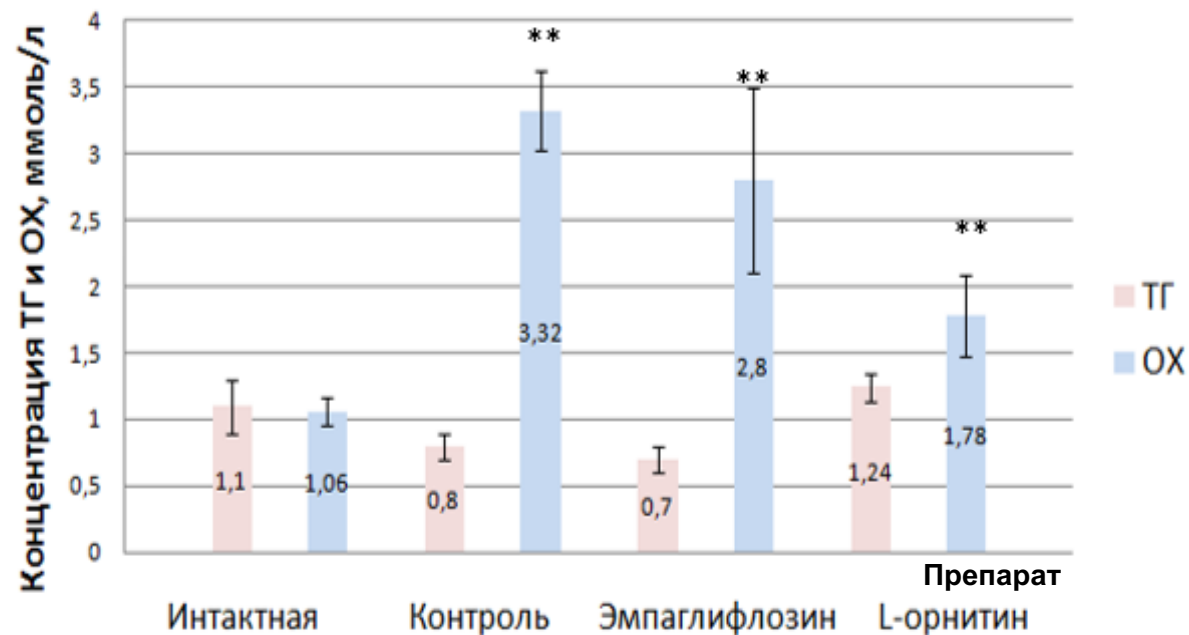
Результаты исследования

Исследование уровня триглицеридов и холестерина сыворотки крови

Показатели липидного обмена к 10-й неделе исследования



Показатели липидного обмена к 20-й неделе исследования



* $P < 0,05$ по сравнению с интактной группой на 10-й неделе эксперимента

** $P < 0,05$ по сравнению с интактной группой на 20-й неделе эксперимента

Материалы и методы

Метод определения гликогена в тканях печени

100 мг исследуемой печени + 0,9 мл 33% КОН

↓ *нагревают на водяной бане 20 мин.*

+1,3 мл 96% этилового спирта

↓ *кипятят, охлаждают на ледяной бане,
центрифугируют*

надосадочную жидкость сливают и пробирки высушивают

↓

+ 0,9 мл дистиллированной воды + 1,3 мл 96% этилового спирта

↓

+ 0,2 мл насыщенного раствора хлорида аммония

↓

нагревают на водяной бане 5 мин.

+ 0,2 мл воды + 2,6 мл йодного реактива

** Контрольная проба: 0,2 мл
насыщенного раствора
хлорида аммония + 0,2 мл
дистиллированной воды + 2,6
мл йодного реактива*

Спектрофотометрирование при
460 нм против контрольной пробы

Результаты исследования



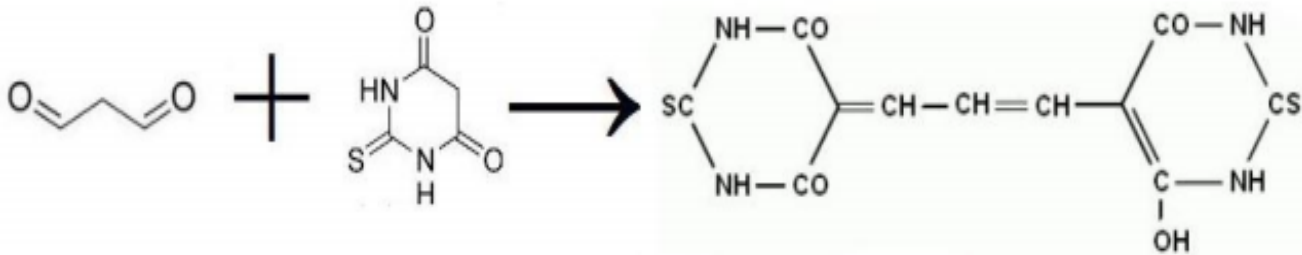
** $P < 0.05$ по отношению к интактной группе животных*

*** $P < 0.05$ по отношению к интактной и контрольной группе животных*

Материалы и методы

Метод определения перекисного окисления липидов

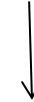
Оценку перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях печени определяли по содержанию конечного продукта – *малонового альдегида*.



Ткань печени+физ.раствор = Гомогенат



+ 20% ТХУ = Осаждение белков



Надосадочная жидкость+0,8% р-р

Тиобарбитуровой кислоты

*Контрольная проба – физ.раствор+р-р

Тиобарбитуровой кислоты



Окрашенный в розовый цвет комплекс,
имеющий максимум поглощения при 530
нм

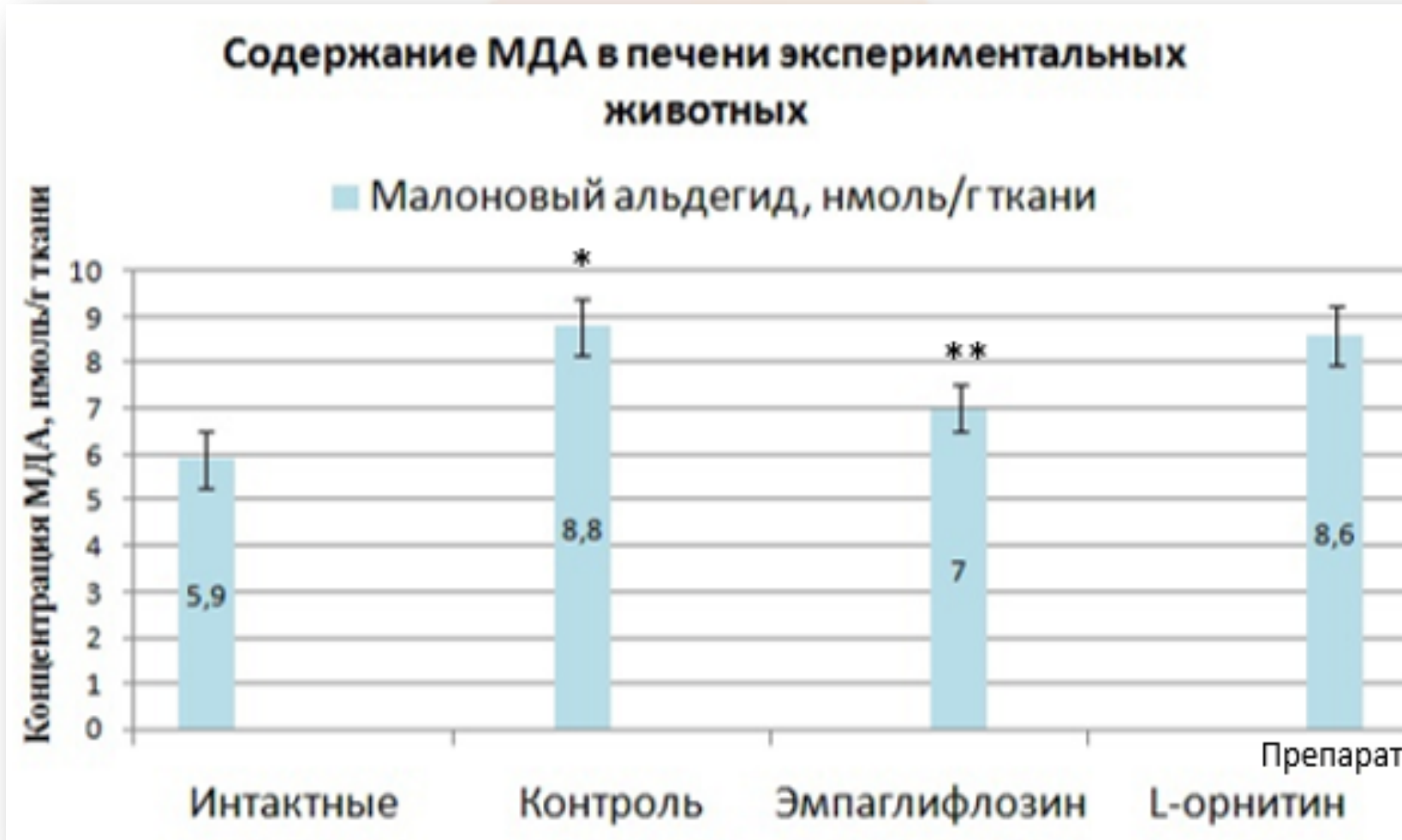
Материалы и методы

Метод определения перекисного окисления белков

Гомогенат печени 1: 50 (0,25 М раствора сахарозы в 50 мМ трис-солянокислом буфере, pH=7,4)



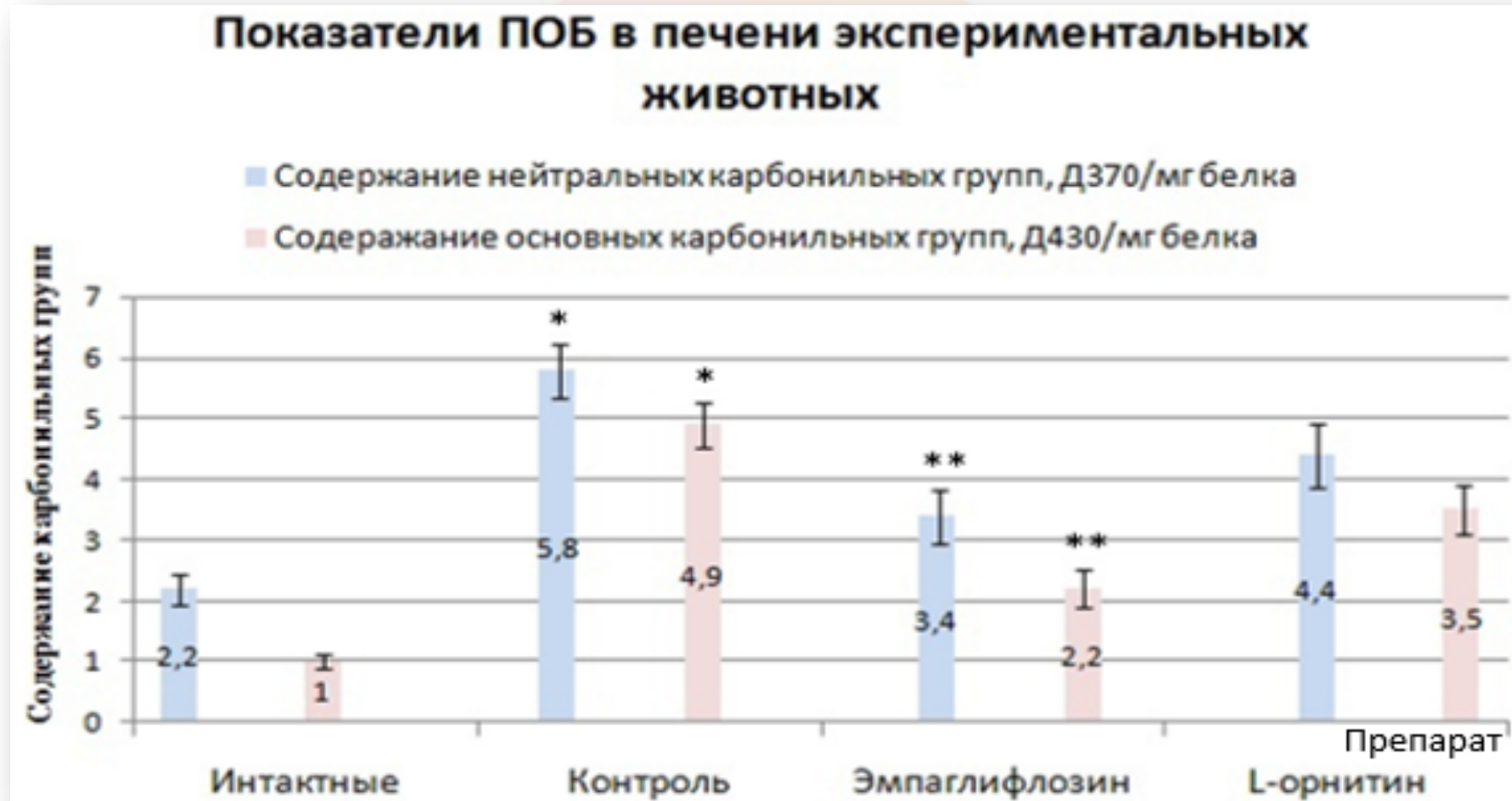
Результаты исследования



* $P < 0.05$ по отношению к интактной группе животных

** $P < 0.05$ по отношению к интактной и контрольной группе животных

Результаты исследования



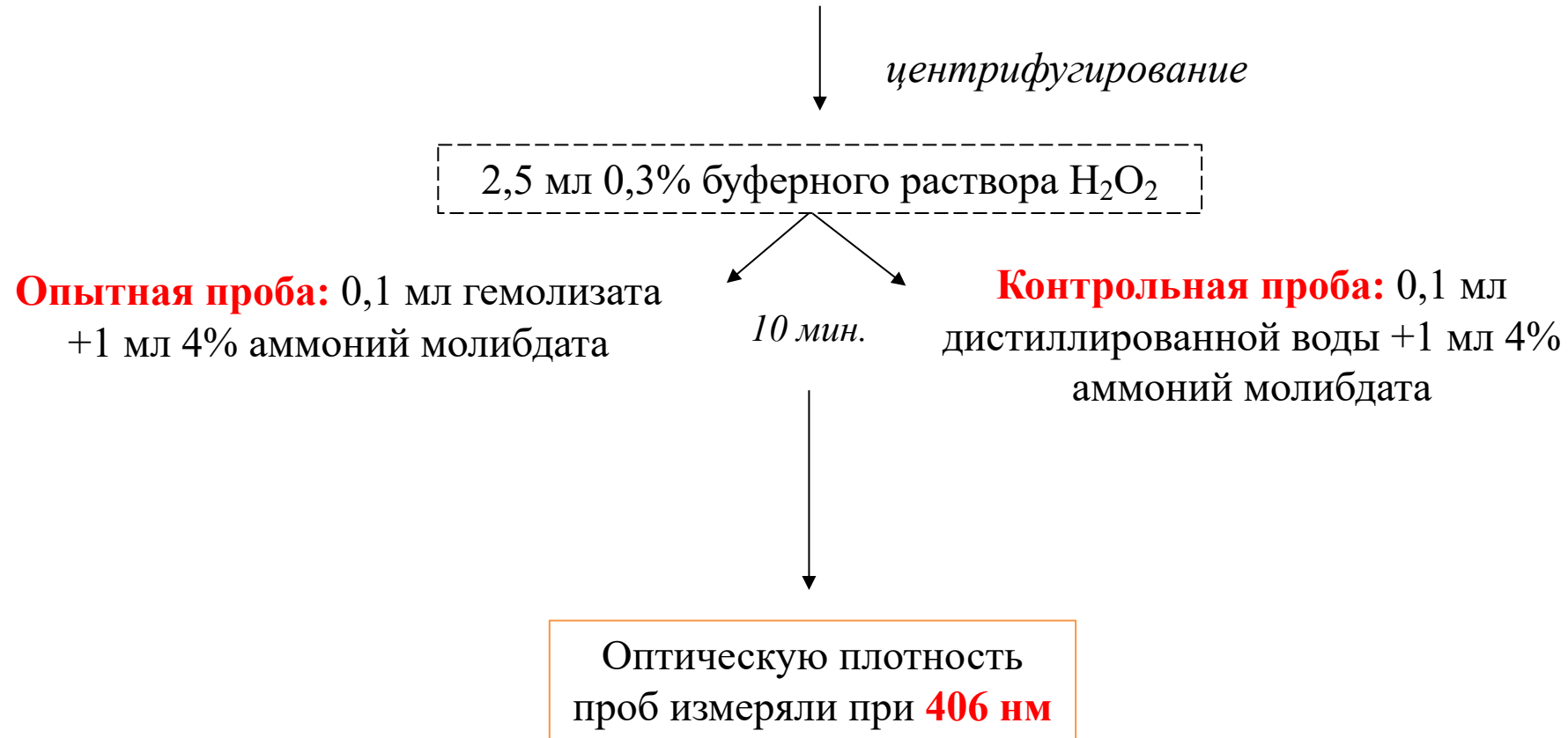
* $P < 0.05$ по отношению к интактной группе животных

** $P < 0.05$ по отношению к интактной и контрольной группе животных

Материалы и методы

Метод определения каталазы в крови

Гемолизат эритроцитов (1:50) получали при помощи 0,025 М Триссахарозного буфера pH 7,4



Материалы и методы

Метод определения СОД в крови

Гемолизат эритроцитов (1:50) получали при помощи 0,025 М Триссахарозного буфера pH 7,4

центрифугирование

3 мл 0,05М Na-карбонатного буфера pH 10,2

Опытная проба: 0,15 мл гемолизата +
0,15 мл 0,1% адреналина

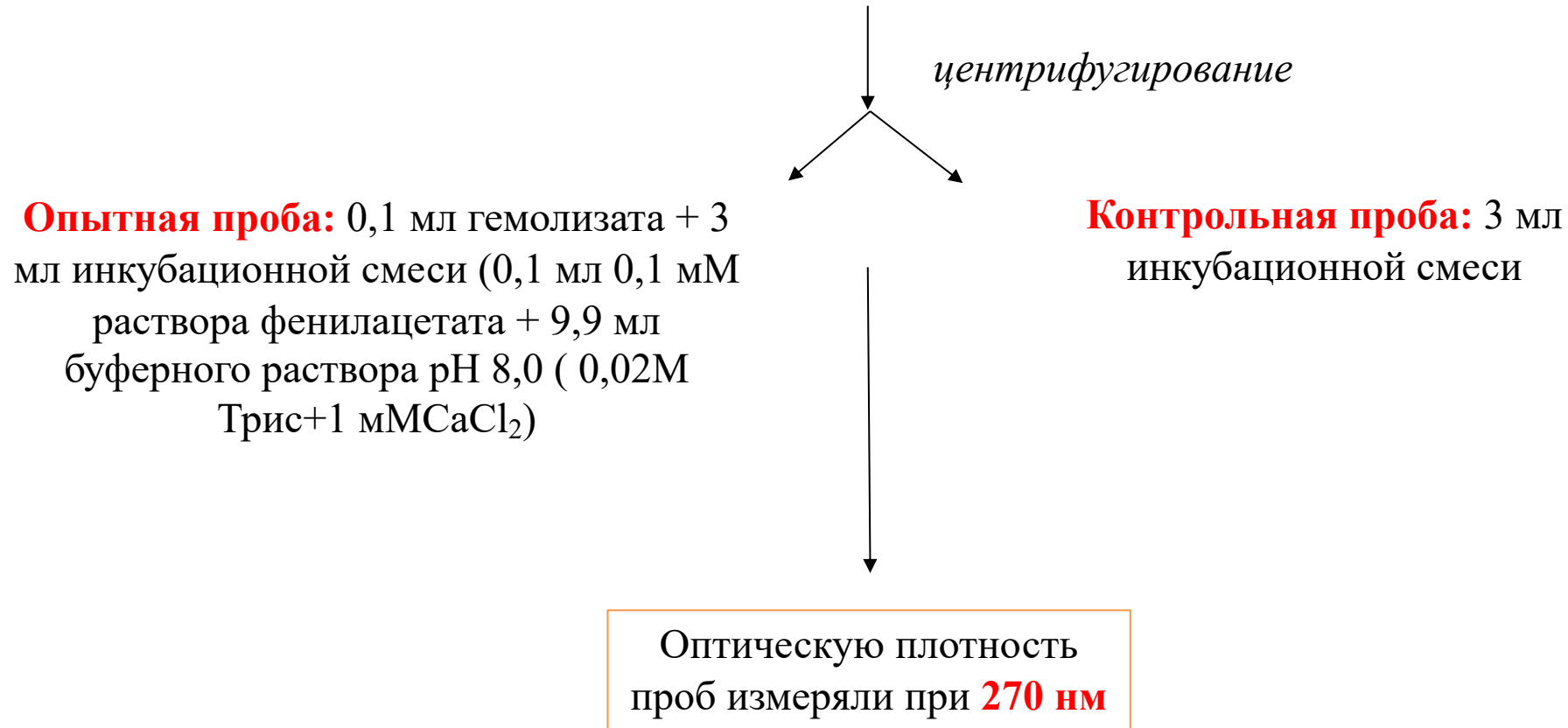
Контрольная проба: 0,15 мл
буфера+0,15 мл 0,1% адреналина

Оптическую плотность
проб измеряли при **347 нм**

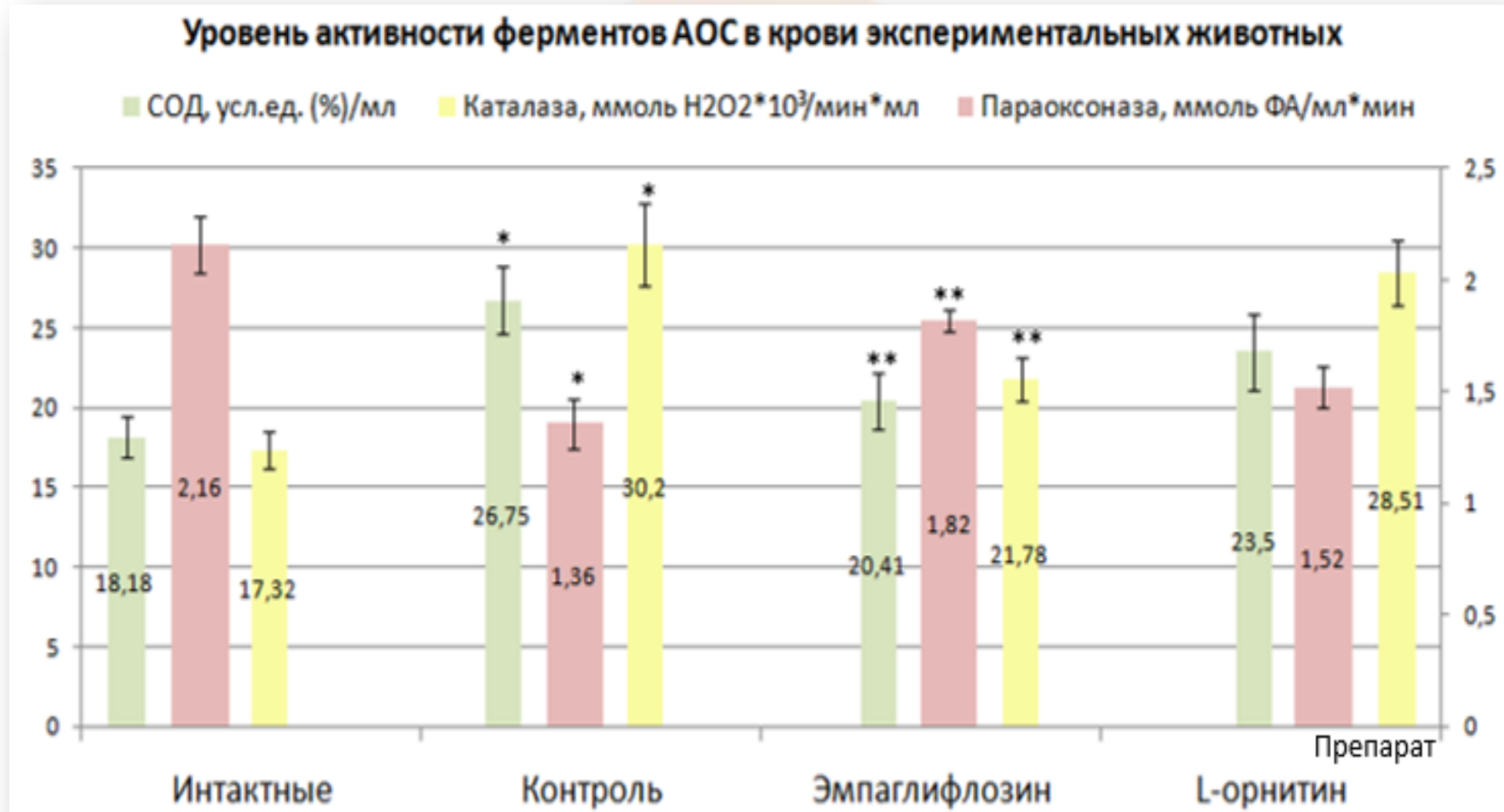
Материалы и методы

Метод определения параоксоназы в крови

Гемолизат эритроцитов (1:50) получали при помощи 0,025 М Триссахарозного буфера pH 7,4



Результаты исследования



* $P < 0.05$ по отношению к интактной группе животных

** $P < 0.05$ по отношению к интактной и контрольной группе животных

Выводы

- 1) На модели НАЖБП с добавлением к гиперкалорийной диете тетрахлорметана на мышцах установлено, что эмпаглифлозин в отличие от L-орнитина оказывает положительное влияние на динамику висцеральных жировых депо, снижая массовую долю висцерального жира в 2 раза и эпидидимального в 1,5 раза.
- 2) Выявлено, что в группе животных с НАЖБП концентрация гликогена в тканях печени снижается в 1,3 раза по сравнению с интактными животными. Под действием эмпаглифлозина данный показатель в печени снижается в 1,17 раз по сравнению с контрольной группой. L-орнитин достоверно на данный показатель не влияет.
- 3) Установлено повышение концентрации ХС в условиях НАЖБП по сравнению с интактной группой (в 3,8 раза), уровень ТГ достоверно не изменялся. L-орнитин в отличие от эмпаглифлозина снижал концентрацию холестерина в 1,8 раза на фоне лечения по сравнению с группой контрольных животных.
- 4) Доказана активация перекисного окисления липидов и белков у животных с НАЖБП, на основании показателей МДА и карбонильных групп при НАЖБП и выраженное положительное действие на эти показатели эмпаглифлозина: снижение МДА в 1,25 раз, нейтральных карбонильных групп в 1,7 раз и основных карбонильных групп – в 2,2 раза.
- 5) Доказано увеличение активности каталазы и СОД в 1,7 и 1,5 раза соответственно и снижение активности параоксоназы в 1,6 раза при НАЖБП по сравнению со здоровыми животными. Эмпаглифлозин снижает уровень каталазы и СОД в 1,4 и 1,3 раза соответственно и повышает уровень параоксоназы в 1,3 раза при экспериментальной НАЖБП, в то время как L-орнитин не влияет на этот показатель.

Описание	овальные двояковыпуклые таблетки, покрытые пленочной оболочкой светло-желтого цвета
Растворимость	ОМР в воде, МР в метаноле, этаноле и ацетонитриле, Р в 50% растворе ацетонитрил/вода, ПНР в толуоле
Однородность массы	Допустимое отклонение 10%
Распадаемость	В течение 30 минут
Растворение	Количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения, должно составлять не менее 75 % от заявленного содержания.
Определение содержания ВВ	Содержание талька должно быть не более 3%, <u>азросила</u> – не более 10%, кальция и магния <u>стеарата</u> – не более 1 %
Подлинность	УФ спектры растворов препарата и рабочего стандартного образца <u>эмпаглифлозина</u> должны иметь максимумы и минимумы при одних и тех же длинах волн в области от 200 до 400 <u>нм</u> .
Количественное определение	Метод <u>обращенно-фазовой ВЭЖХ</u> . Расчет количественного содержания проводится по площади <u>хроматографического пика</u> .

Рисунок 8. Показатели качества таблеток «Джардинс»

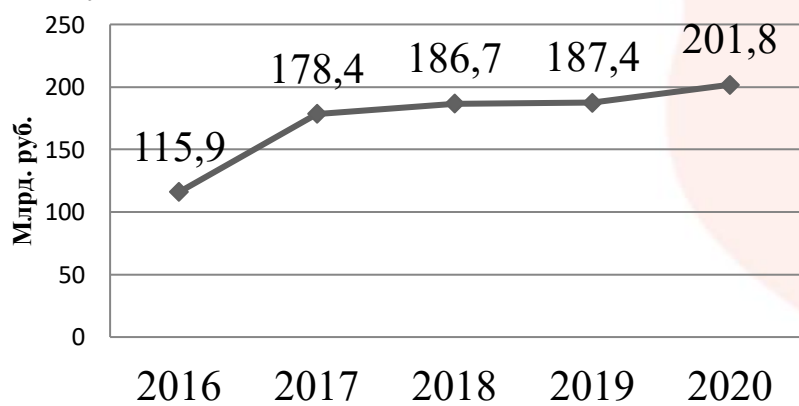


Рисунок 9. Объем и динамика продаж группы А в стоимостном выражении

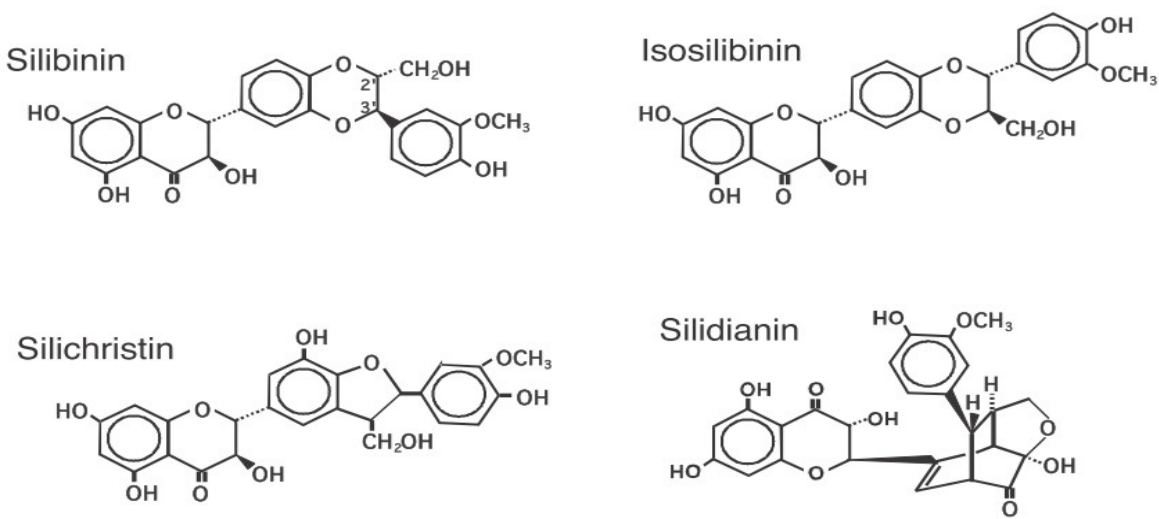


Рисунок 10. Химический состав расторопши пятнистой: комплекс флавоноидных веществ – силибина, силикрстина, силидианина, таксифолина

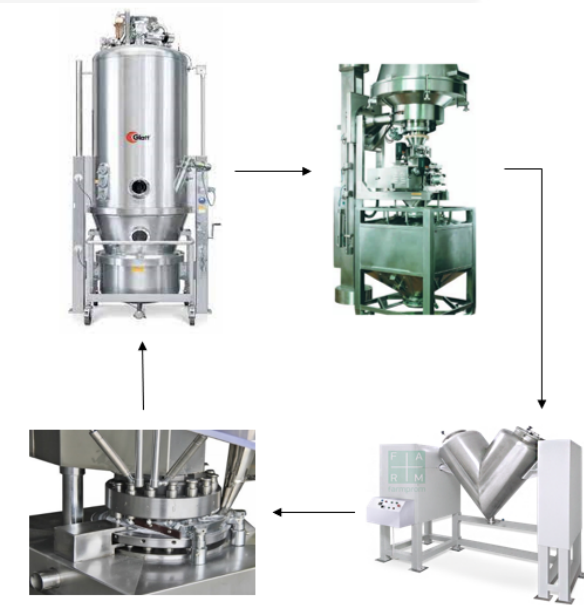
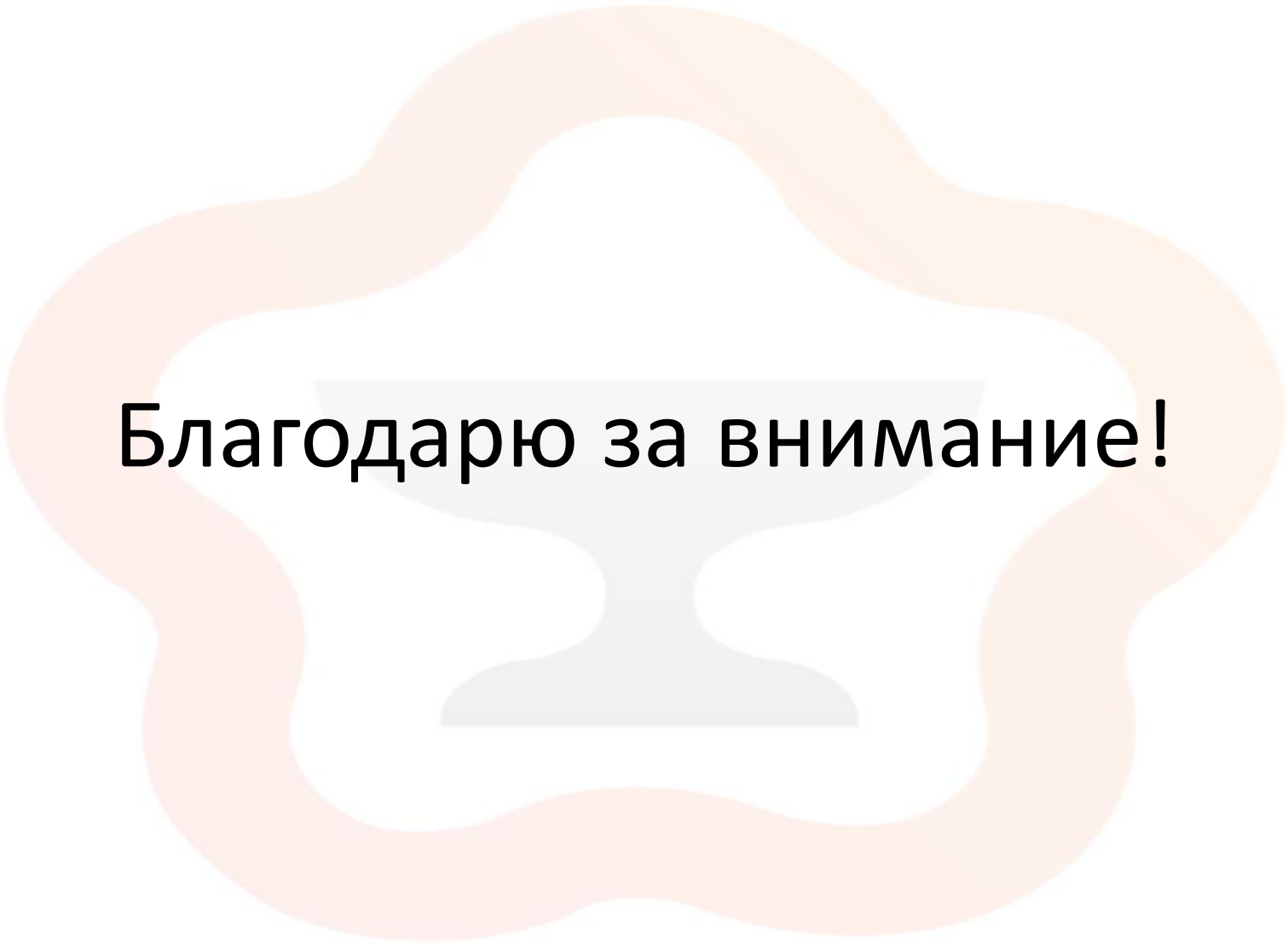


Рисунок 11. Заводская технология таблеток «Джардинс»



Рисунок 12.
Расторопша пятнистая
(*Silybum marianum* (L.)
Gaertn.)



Благодарю за внимание!