

ШАМАРДИНА ЛЮБОВЬ АЛЕКСАНДРОВНА

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ПРИ МОДЕЛИ-
РОВАНИИ СИНДРОМА РЕЙЕ И КОРРЕКЦИИ ЕГО ГЕПАТОПРОТЕК-
ТОРАМИ**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Научные руководители:	доктор медицинских наук, профессор Суходоло Ирина Владимировна доктор медицинских наук, профессор, заслуженный работник высшей школы РФ Венгеровский Александр Исаакович
Официальные оппоненты:	доктор медицинских наук, профессор Красноженов Евгений Павлович доктор медицинских наук, профессор Хазанов Вениамин Абрамович
Ведущая организация:	Новосибирская государственная медицинская академия

Защита состоится «___» _____ 2004 г. в ___ ч. на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 в Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «___» «_____» 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета		А.В. Герасимов
--	--	----------------

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Синдром Рейе проявляется как острая энцефалопатия в сочетании с тяжелым нарушением функций печени. Большинство больных – дети школьного и дошкольного возрастов. Основная часть случаев синдрома Рейе связана с приемом противовоспалительных и противогистаминных лекарственных средств на фоне вирусных инфекций верхних дыхательных путей, ветряной оспы, диареи вирусной этиологии [Reye R. et al., 1963; Monto A.S., 1999; Thabet F. et al., 2002]. Летальность при данной патологии составляет 85% [Hayase, Y., 1997; Yoshida Y. et al., 1999; Thabet F. et al., 2002]. В патогенезе синдрома Рейе основное значение имеет повреждение митохондрий гепатоцитов с нарушением биоэнергетики, β -окисления длинноцепочечных и среднецепочечных жирных кислот и синтеза мочевины. Дефекты метаболизма часто обусловлены уменьшением содержания свободного карнитина [Glasgow F. T. et al., 1999; Kakuda T.N., 2000; Szewczyk A., 2002].

Моделью синдрома Рейе, наиболее близкой к нему по структурно-метаболическим проявлениям, является поражение печени и головного мозга, вызванное 4-пентеновой (аллилуксусной) кислотой [Glasgow A. M., 1975]. Широкое распространение, высокая летальность и недостаточная эффективность современных методов фармакотерапии синдрома Рейе определяют необходимость изучения лекарственных препаратов, способных сдерживать прогрессирование поражения печени и способствовать восстановлению ее детоксикационной функции, что снизит токсическую нагрузку на головной мозг.

Созданные кафедрами фармакологии и фармацевтической технологии Сибирского государственного медицинского университета совместно с Томским институтом химии нефти СО РАН и Тихоокеанским институтом биоорганической химии ДВО РАН гепатопротекторы эпфир (комплекс полярных липидов озерного илового осадка, содержащий фосфолипиды, сульфолипиды и каротиноиды), лохеин (экстракт сибирского растения солянка холмовая, включающий бетаин, флавоноиды и минеральные вещества), максар (полифенолы дальневосточного растения маакия амурская) проявляют при токсическом гепатите более высокую гепатопротективную активность, чем зарубежные гепатопротекторы эссенциале и легалон [Саратиков А.С., Венгеровский А. И., 1995; Шаловой А.А. и др., 1996].

Необходимо изучить воздействие данных гепатопротекторов на течение экспериментального синдрома Рейе и выбрать препарат, способный наиболее эффективно нормализовать функции печени.

Цель исследования

Оценка морфофункциональных изменений в печени крыс при различных моделях синдрома Рейе и воздействии гепатопротекторов лохеина, максара, легалона, эпфира и эссенциале при экспериментальном синдроме Рейе.

Задачи исследования

1. Изучить морфофункциональные изменения в печени крыс при различных моделях синдрома Рейе (интоксикация 4-пентеновой кислотой и ацетилсалициловой кислотой на фоне действия пирогенала).

2. Оценить терапевтическое действие лохеина, максара и легалона, введенных в течение 7, 14 и 30 дней после окончания инъекций 4-пентеновой кислоты, на морфофункциональное состояние печени крыс.

3. Оценить терапевтическое действие эплира и эссенциале, введенных в течение 7, 14 и 30 дней после окончания инъекций 4-пентеновой кислоты, на морфофункциональное состояние печени крыс.

4. Сравнить терапевтическую эффективность лохеина, максара, эплира, эссенциале и легалона при экспериментальном синдроме Рейе.

Научная новизна работы

Впервые установлено, что наиболее адекватной моделью синдрома Рейе является интоксикация 4-пентеновой кислотой в дозе 20 мг/кг при внутрибрюшинном введении крысам в течение 7 дней. Изменения ангио- и цитоархитектоники печени при введении 4-пентеновой кислоты в дозе 50 мг/кг 10 раз через 4 ч или ацетилсалициловой кислоты на фоне действия бактериального липополисахарида пирогенала в большей степени отличаются от морфофункциональных проявлений синдрома Рейе. В течение 30 дней после прекращения инъекций 4-пентеновой кислоты не происходит спонтанного восстановления морфофункциональных показателей печени у крыс.

Гепатопротекторы лохеин, максар, легалон, эплир и эссенциале проявляют высокую терапевтическую активность при экспериментальном синдроме Рейе. Лечение экспериментальных животных этими препаратами в течение 7, 14, 30 дней сопровождается регрессом морфофункциональных нарушений в печени, вызванных введением 4-пентеновой кислоты.

Эффект гепатопротекторов при экспериментальном синдроме Рейе зависит от продолжительности фармакотерапии – максимально выраженное лечебное действие регистрируется при введении гепатопротекторов в течение 30 дней. Максар и эссенциале в большей степени, чем другие гепатопротекторы, уменьшает морфофункциональные нарушения в печени крыс при экспериментальном синдроме Рейе.

Практическая значимость работы

Экспериментально обоснована целесообразность включения лохеина, максара, легалона, эплира и эссенциале в комплексную терапию синдрома Рейе. При его экспериментальной модели гепатопротекторы восстанавливают гистоархитектонику печени, препятствуют развитию некрозов гепатоцитов, стимулируют процессы регенерации и нормализуют активность митохондриальных и лизосомальных ферментов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Внутривентрикулярное введение крысам 4-пентеновой кислоты или ацетилсалициловой кислоты на фоне действия пирогенала позволяет воспроизвести морфофункциональные нарушения в печени, характерные для синдрома Рейе. Наиболее адекватной моделью синдрома Рейе у крыс является интоксикация 4-пентеновой кислотой в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней.

2. Гепатопротекторы лохеин, максар, легалон, эплир и эссенциале, введенные в течение 7, 14, и 30 дней на фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой, нормализуют гистоархитектонику печени, предотвращают развитие жировой дистрофии и восстанавливают активность внутриклеточных ферментов гепатоцитов.

3. Максар и эссенциале в большей степени, чем другие гепатопротекторы, оказывают положительное влияние на течение экспериментального синдрома Рейе.

4. Лучшие результаты терапии экспериментального синдрома Рейе достигаются при введении гепатопротекторов в течение 30 дней.

Апробация и публикации

Материалы диссертационного исследования докладывались на Межрегиональной научной конференции Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150-летию со дня рождения академика И. П. Павлова (Томск, 1999); IV съезде Научного общества гастроэнтерологов России (Москва, 2004); 9-й Российской конференции "Гепатология сегодня" (Москва, 2004). По теме диссертации опубликовано 6 работ.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного строению печени при жировых дистрофиях различной этиологии, патогенезу и клинике синдрома Рейе, 4-х глав, отражающих результаты экспериментальных исследований. Работа изложена на 153 с., иллюстрирована 29 таблицами и 29 рисунками. Библиография включает 248 источников, из них 125 зарубежных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили в осенне-зимнее время на 600 белых беспородных крысах-самцах массой 200-220 г. Животные находились в стандартных условиях вивария, в параллельно исследуемых группах (по 20 крыс) имели одинаковую массу тела, контролируемую ежедневным взвешиванием для коррекции вводимой дозы препаратов. Все манипуляции (взвешивание, введение препаратов, умерщвление животных) осуществляли с 9 до 12 ч.

Исследовали две экспериментальные модели синдрома Рейе у крыс:

1) интоксикация 4-пентеновой кислотой:

а) крысам вводили внутривентрикулярно 4-пентеновую кислоту в дозе 20 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 сут [Sakaida N. et al., 1990];

Распределение животных по экспериментальным группам

Серия эксперимента	Распределение животных по группам	Количество животных	Вводимые препараты
1 серия	Интактные животные	20	-----
	Контроль 1	20	Вода для инъекций
	Контроль 2	20	Растворители препаратов
	4-Пентеновая кислота, 7 инъекций	20	4-Пентеновая кислота, 20 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней
	4-Пентеновая кислота, 10 инъекций	20	4-Пентеновая кислота, 50 мг/кг 10 раз через каждые 4 ч.
	Ацетилсалициловая кислота + пирогенал	20	Препарат ацетилсалициловой кислоты для инъекций аспизол (50 мг/кг) через час после введения пирогенала (0,2 мг/кг) однократно
2 серия	4-Пентеновая кислота + крахмальная слизь, 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, крахмальная слизь ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
	4-Пентеновая кислота + оливковое масло, 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, оливковое масло ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
	4-Пентеновая кислота + дистиллированная вода, 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, дистиллированная вода ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
3 серия (фармакотерапия экспериментального синдрома Рейе)	4-Пентеновая кислота + лохеин, 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, лохеин (5 мг/кг) ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
	4-Пентеновая кислота + легалон, 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, легалон (200 мг/кг) ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
	4-Пентеновая кислота + максар 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, максар (200 мг/кг) ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
	4-Пентеновая кислота + эплир, 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, эплир (30 мг/кг) ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
	4-Пентеновая кислота + эссенциале, 7, 14, 30 дней	60	4-Пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно 7 дней, эссенциале (80 мг/кг) ежедневно с 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней
Итого:		600	

б) крысам вводили внутривнутрибрюшинно 4-пентеновую кислоту в дозе 50 мг/кг, 10 раз через 4 ч [Sugimoto T. et al., 1990];

2) интоксикация ацетилсалициловой кислотой на фоне действия бактериального липополисахарида пирогенала.

Крысам, не получавшим в течение 1 сут пищи, вводили внутривнутрибрюшинно пирогенал в дозе 0,2 мг/кг и спустя 1 ч – ацетилсалициловую кислоту (аспизол, “Bayer”) в дозе 50 мг/кг однократно [Kilpatrick L. et al., 1989].

В результате проведенных исследований, была выбрана адекватная модель синдрома Рейе – интоксикация 4-пентеновой (аллилуксусной) кислотой. Данная модель позволяет воспроизводить синдром Рейе, в том числе отдельные стадии патологических процессов, что подтверждается результатами морфологических и гистохимических исследований. Экспериментальный синдром Рейе можно использовать для оценки эффективности и установления механизма действия лекарственных средств, регулирующих функции печени.

Крысы в течение 7 дней ежедневно получали внутривнутрибрюшинные инъекции 0,5% водного раствора 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг. С 8-го дня после начала интоксикации крысам вводили в желудок ежедневно эпфир (30 мг/кг), эссенциале (80 мг/кг), лохейн (5 мл/кг, что соответствует 160 мг/кг экстрактивных веществ), максар (200 мг/кг) или легалон (200 мг/кг). Дозы препаратов являются терапевтически эффективными [Саратиков А.С. и соавт., 2001]. Продолжительность фармакотерапии составляла 7, 14 и 30 дней (табл. 1).

Лохейн применяли в виде жидкого водно-спиртового экстракта, легалон – в виде суспензии в 1% крахмальной слизи, эпфир – в виде раствора в оливковом масле, эссенциале – в ампульном растворе. Навеску максара растворяли в небольшом количестве этилового спирта, затем добавлением воды создавали тонкую суспензию вещества.

Через сутки после последнего введения препаратов крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. У животных вскрывали брюшную полость, осматривали и извлекали печень. Для исследования брали образцы центральной и периферической части правой доли печени. Образцы печени фиксировали в 10% нейтральном формалине, жидкости Карнуа и замораживали в жидком азоте. Фиксированные кусочки проводили через спирты и заливали в парафин по стандартной методике.

Парафиновые срезы толщиной 5 мкм исследовали с помощью следующих гистологических методик:

1. окраска гематоксилином и эозином;
2. окраска по Эйнарсону на РНК и ДНК;
3. ШИК-реакция по Мак-Манусу на гликоген и гликопротеины с контролем амилазой.

Из замороженных в жидком азоте образцов печени изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Их окрашивали суданом черным В на липиды. Тетразолийевым методом по S. Loyda выявляли активность сукцинатдегидрогеназы, NADH_2 -тетразолийредуктазы, NADPH_2 -тетразолийредуктазы и β -оксибутиратдегидрогеназы [Лойда З., 1982], методом одновременного азосочетания по Burstone определяли активность кислой и щелочной фосфатаз [Лойда З., 1982].

Количественную оценку продуктов ферментативных реакций проводили одноволновым методом с помощью цитофотометра ЛЮМАМ-И-3 с объективом 40, размером зонда 0,1 мм в проходящем свете с длиной волны 576 нм. Все данные выражали в условных единицах оптической плотности [Журавлева Т. Б., Прочуханов Р. А., 1978]:

$$A = \lg I''/I,$$

где A – оптическая плотность исследуемого поля, I'' – интенсивность светового потока, проходящего через предметное и покровное стекла микропрепарата, минуя срез, I – интенсивность светового потока, проходящего через окрашенные участки цитоплазмы клеток.

Количественная характеристика включала анализ состояния интралобулярных гепатоцитов и печеночных клеток пограничной пластинки. За гепатоциты пограничной пластинки принимали клетки первой зоны, имеющие непосредственный контакт с портальным трактом. Состояние гепатоцитов оценивали вокруг всех портальных трактов исследуемого препарата. Гепатоциты второй и третьей зон, не имеющие контакта с портальным трактом, относили к интралобулярным. Некротические и регенераторные процессы также изучали отдельно в перипортальной и интралобулярной зонах. Для оценки выраженности вышеуказанных процессов в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, считали количество фокальных некрозов и количество двухъядерных гепатоцитов на 1000 клеток. Полученные данные выражали в процентах.

Оценку достоверности различий средних значений полученных показателей осуществляли с помощью t -критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни для несвязанных выборок. Достоверными считали различия между выборками, при которых значение абсолютного показателя точности (p) было равно или меньше 0,05 [Автандилов Г. Г., 1990]. Все описанные этапы математического анализа были выполнены с использованием пакета программ «Statistica for Windows».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После инъекций 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней летальность животных составляла 20%. В печени крыс развивались выраженная дискомплексация печеночных пластинок, циркуляторные нарушения, умеренная инфильтрация портальных трактов лимфоцитами, плазмоцитами и гистиоцитами. В центральных отделах печеночных долек отмечалась выраженная дистрофия гепатоцитов. Ядра печеночных клеток были полиморфны по форме, размерам и тинкториальным свойствам. РНК распределялась в цитоплазме гепатоцитов в виде огрубевших глыбок перинуклеарно, содержание РНК в клетках снижалось. Содержание липидов в гепатоцитах увеличивалось в 3 раза по сравнению с данным показателем в контрольной группе. Преимущественно в центральной части долек появлялись фокальные некрозы гепатоцитов (количество некротизированных клеток в интралобулярной зоне было в 6 раз, в зоне пограничной пластинки в 4 раза выше, чем в контрольной группе) ($p < 0,05$). Количество двухъядерных гепатоцитов существенно снижалось в интралобуляр-

ной зоне печеночных долек (на 58%) и менее значительно в зоне пограничной пластинки (на 14%) ($p < 0,05$). Гликоген располагался в цитоплазме гепатоцитов в виде крупных, интенсивно окрашенных «чернильных пятен».

Введение крысам 4 пентеновой кислоты в дозе 50 мг/кг через 4 ч 10 раз на протяжении 2 сут приводило к летальности 25% животных. При гистологическом исследовании в печени крыс регистрировалась более выраженная, чем при введении 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг, дисконкомплексация печеночных пластинок. В центральных и промежуточных зонах долек развивалась мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, встречались клетки со среднекапельным ожирением. Содержание липидов в гепатоцитах было в 3,8 выше, чем у контрольных животных. Количество фокальных некрозов в зоне пограничной пластинки увеличивалось в 10 раз, в интралобулярной зоне долек – в 8,4 раза ($p < 0,05$). Количество двухъядерных гепатоцитов в зоне пограничной пластинки было ниже на 44%, в интралобулярной зоне – на 77%, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Гликоген определялся только в гепатоцитах перипортальной зоны в виде «чернильных пятен».

Введение ацетилсалициловой кислоты на фоне действия пирогенала приводило к гибели 35% крыс. В печени животных выявлялись резко выраженная дисконкомплексация печеночных пластинок во всех отделах долек, лимфогистиоцитарная инфильтрация портальных трактов и центральных вен, внутридольковые инфильтраты. В центральной и промежуточной зонах долек развивалось диффузное мелко- и среднекапельное ожирение гепатоцитов. Содержание липидов возрастало в 6 раз. Количество фокальных некрозов было существенно выше, чем в контрольной группе (в 15,6 раза в зоне пограничной пластинки и в 11,1 раза – в интралобулярной зоне долек) ($p < 0,05$). Во всех отделах печеночных долек отмечалось тотальное угнетение процессов регенерации. Количество двухъядерных гепатоцитов снижалось на 72% в зоне пограничной пластинки и на 87% – в интралобулярной зоне. Гликоген в цитоплазме клеток практически отсутствовал.

Активность ферментов в гепатоцитах после введения крысам 4-пентеновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг или ацетилсалициловой кислоты на фоне действия пирогенала значительно изменялась по сравнению с активностью в контрольной группе. Активность митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы статистически достоверно снижалась в 1,7-5,6 раза, NADH₂-тетразолийредуктазы – в 1,5-2,6 раза, NADPH₂-тетразолийредуктазы – в 2-3,7 раза, β-оксибутиратдегидрогеназы – в 1,7-3 раза ($p < 0,05$). Активность лизосомального фермента кислой фосфатазы достоверно увеличивалась в 1,7-2,1 раза при введении 4-пентеновой кислоты, и снижалась в 1,9 раза при введении ацетилсалициловой кислоты ($p < 0,05$).

Активность щелочной фосфатазы в печени крыс после введения 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг выявлялась в звездчатых ретикулоэндотелиоцитах и эндотелии сосудов, при использовании 4-пентеновой кислоты в дозе 50 мг/кг – только в эндотелии сосудов. Комбинация ацетилсалициловой кислоты и пирогенала полностью угнетала активность щелочной фосфатазы.

Таким образом, после сравнительного анализа морфофункционального состояния печени крыс при трех моделях синдрома Рейе для исследования терапевтической эффективности и механизма действия гепатопротекторов было выбрано введение 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней. Эта модель позволяет воспроизвести все проявления синдрома Рейе. Использование в качестве токсина 4-пентеновой кислоты в дозе 50 мг/кг и комбинации ацетилсалициловой кислоты с пирогеналом приводило к высокой летальности животных, что осложняло изучение фармакотерапии экспериментального синдрома Рейе.

Как отмечают А. Ф. Блюгер и А. Я. Майоре (1982), несмотря на разнообразие патогенных агентов, вызывающих поражение печени, в морфологической картине выявляются во многом однотипные изменения. Они характеризуются гемоциркуляторными расстройствами, инфильтрацией портальных трактов мононуклеарными клетками, дистрофией и деструкцией гепатоцитов. В итоге нарушается гистоархитектоника печени. Однако в связи с преимущественным поражением клеточных органелл и в зависимости от степени нарушения внутриорганного кровообращения и проницаемости сосудистой стенки для воздействия различных гепатотропных агентов характерны отличительные особенности [Лужников Е. А., 1981]. Введение крысам 4-пентеновой кислоты приводит к развитию в ткани печени микровезикулярной жировой инфильтрации [Sakaida N. et al., 1990].

Установленные нами морфогистохимические нарушения при модели синдрома Рейе соответствуют данным биохимических исследований крови. Показано, что при введении 4-пентеновой кислоты в сыворотке крови крыс значительно повышается содержание липидов и через 7, 14 и 30 дней после окончания инъекций токсина оно продолжает увеличиваться [Арбузов А.Г., 2001].

Кроме жировой дистрофии гепатоцитов при экспериментальном синдроме Рейе нами отмечены белковая дистрофия и некроз гепатоцитов преимущественно в периферической зоне долек.

Центрлобулярная локализация некрозов является характерным морфологическим субстратом острых поражений печени гепатотоксическими веществами. Токсины в печени подвергаются воздействию системы цитохрома Р-450. В результате этого в гепатоцитах образуются высокорепреактивные токсические метаболиты, которые удаляются путем конъюгации с глутатионом. Концентрация глутатиона в клетках периферической зоны ниже, а активность цитохрома Р-450 выше, чем в других отделах долек. Таким образом, высокая концентрация токсических метаболитов генерируется самими гепатоцитами, не обладающими достаточными запасами глутатиона, а некроз клеток обусловлен не прямым действием токсинов, а опосредован метаболической функцией гепатоцитов [Логинов А. С., Аруин Л. И., 1985; Щеголев А. М., 1995].

Обращает на себя внимание тот факт, что при развитии экспериментального синдрома Рейе на фоне снижения количества глюкозы в крови [Арбузов А. Г., 2001] нами выявлены значительное повышение содержания гликогена в гепатоцитах и изменение его структуры (гликоген располагался в цитоплазме клеток в виде грубых, интенсивно окрашенных гранул – «чернильных пятен»).

Имеются данные о гетерогенности гликогена в нормальной ткани печени – его молекулярная масса, степень дисперсности, детали структуры могут варьировать при различных физиологических условиях [Кудрявцева М. В. и соавт., 1983]. В нормальной печени гликоген представлен главным образом легкодоступной фракцией, составляющей около 84% от его суммарного количества. У больных с тяжелой формой поражения печени доля этой фракции падает до 57%. Таким образом, по мере усиления тяжести поражения печени постоянно снижается доля легкодоступной фракции гликогена и соответственно возрастает доля труднодоступной фракции этого полисахарида. При этом значительно изменяется морфология гепатоцитов: гранулы гликогена приобретают рыхлую, комковатую структуру. Труднодоступная фракция гликогена более прочно связана с белком, ее содержание лишь слабо изменяется в условиях стимуляции гликогенолиза [Кудрявцева М. В. и соавт., 1983; Кудрявцева М. В., 1990].

В печени животных с экспериментальным синдромом Рейе, оставленных без лечения, прогрессировали морфофункциональные нарушения, развившиеся после введения 4-пентеновой кислоты.

Жировая дистрофия гепатоцитов распространялась на промежуточные и перипортальные отделы печеночных долек. При гистохимическом исследовании печени крыс через 7-30 дней после окончания введения 4-пентеновой кислоты содержание липидов в гепатоцитах увеличивалось в 1,2-1,7 раза по сравнению с содержанием липидов в клетках животных, исследованных после прекращения воздействия токсина ($p < 0,05$).

В печени у нелеченных животных через 7-14 дней значительно повышалось количество фокальных некрозов. В интралобулярных зонах долек оно возрастало в 1,3-1,5 раза, в перипортальных зонах – в 3,3-3,6 раза ($p < 0,05$). Спустя 30 дней количество некротизированных гепатоцитов незначительно снижалось.

Количество двухъядерных гепатоцитов через 7 дней после окончания введения 4-пентеновой кислоты снижалось (в 2,1 и 1,6 раза в интралобулярной и перипортальной зонах соответственно) ($p < 0,05$). Через 14-30 дней данный показатель несколько повышался, оставаясь значительно ниже, чем у животных сразу после завершения инъекций 4-пентеновой кислоты.

Спустя 7 дней у нелеченных животных содержание гликогена в гепатоцитах существенно уменьшалось, он регистрировался только в клетках перипортальной зоны в виде крупных глыбок. Через 14 дней гликоген встречался в единичных гепатоцитах перипортальной зоны в виде мелких гранул. К 30 дню этот полисахарид в печени животных не определялся.

Через 7-30 дней после прекращения введения 4-пентеновой кислоты активность сукцинатдегидрогеназы и β -оксибутиратдегидрогеназы в гепатоцитах дополнительно снижалась на 17-63% и 15-28% соответственно. Активность NADH_2 - и NADPH_2 -тетразолийредуктаз спустя 7-14 дней снижалась на 34% и 25% соответственно по сравнению с активностью у животных, исследованных сразу после окончания введения гепатотоксина. К 30 дню активность этих ферментов возрастала на 16% и 88% соответственно, оставаясь значительно ниже нормы ($p < 0,05$). Активность кислой фосфатазы через 7-30 дней дополнительно

повышалась на 18-81% ($p < 0,05$). Активность щелочной фосфатазы в эндотелиоцитах не выявлялась.

Таким образом, в печени животных с экспериментальным синдромом Рейе через 30 дней после окончания введения 4-пентеновой кислоты сохранялись глубокие морфофункциональные нарушения. Прогрессировали изменения гистоархитектоники печени, расстройства микроциркуляции, некрозы гепатоцитов, угнетение процессов регенерации, жировая дистрофия гепатоцитов, не восстанавливалась активность ферментов – маркеров внутриклеточного метаболизма.

Влияние гепатопротекторов растительного происхождения при введении в течение 7, 14 и 30 дней на морфофункциональное состояние печени крыс с экспериментальным синдромом Рейе

Изученные нами лекарственные средства лохеин, максар, легалон, эплир и эссенциале обладают высокой гепатопротективной активностью при экспериментальном остром и хроническом гепатите, вызванном тетрахлорметаном, парацетамолом, аллиловым спиртом, D-галактозамином [Белобородова Э. И., Шаловой А. А., 1993; Саратиков А. С. и соавт., 1996; Шаловой А. А. и соавт., 1996; Венгеровский А. И., 2002].

Растительные полифенолы, входящие в состав данных препаратов, проявляют антирадикальную активность в процессе обратимого окисления восстановленных фенольных форм в хиноны. Терапия растительными полифенолами сопровождается сохранением ресурсов восстановленного глутатиона и повышением функции антиоксидантной системы гепатоцитов – глутатионзависимых ферментов и супероксиддисмутазы. Полифенолы образуют хелатные комплексы с ионами железа и выключают эти катализаторы из реакций свободнорадикального окисления, стабилизируют мембраны, ингибируя фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов и вызывая накопление цАМФ в клетках [Сыров В. Н. и соавт., 1987; Виноградова Л. Ф., 1993; Altoriay J. et al., 1992].

Терапия гепатопротекторами растительного происхождения лохеином, максаром и легалоном сопровождалась регрессом морфофункциональных нарушений, вызванных в печени крыс 4-пентеновой кислотой.

Применение лохеина и максара в течение 7-30 дней восстанавливало архитектуру печеночных долек и практически нормализовало состояние центральных вен и портальных сосудов. При терапии легалоном сохранялась умеренная дисконкомплексация печеночных пластинок. На 7 день лечения регистрировалась активность щелочной фосфатазы в эндотелиоцитах синусоидов, что говорит об улучшении микроциркуляции в ткани печени. К 30 дню гепатопротективной терапии активность данного фермента восстанавливалась и в желчных капиллярах.

Гепатопротекторы растительного происхождения в результате стимуляции β -окисления жирных кислот в митохондриях печени снижают количество общих липидов и триглицеридов в сыворотке крови животных с экспериментальным синдромом Рейе [Арбузов А. Г., 2001]. Содержание липидов в гепатоцитах при

лечении лохеином в течение 7-14 дней снижалось на 19-45%, при применении максара – на 24-55%, легалона – на 8-20% ($p < 0,05$). В результате терапии лохеином в течение 30 дней содержание липидов уменьшалось на 57%, при действии максара – на 59%, легалона – на 41% ($p < 0,05$) (рис. 1). Таким образом, наиболее эффективно жировую дистрофию уменьшали лохеин и максар.

Нормализация барьерной и матриксной функций мембран гепатоцитов под влиянием гепатопротекторов, содержащих полифенолы, является эффектом, направленным на задержку в лизосомах некрозогенных ферментов с предохранением паренхимы печени от развития некрозов [Логинов А. С. и соавт., 1981; Венгеровский А. И. и соавт., 1987; Ягода А. В. и соавт., 1988; Саратиков А. С. и соавт., 1990; Рыжикова М. А. и соавт., 1998].

При терапии лохеином в течение 7 дней количество фокальных некрозов оставалось таким же, как при модели синдрома Рейе, через 14-30 дней снижалось на 16-47% в области пограничной пластинки и на 17-60% в интралобулярной зоне ($p < 0,05$). Максар в большей степени, чем лохеин и легалон, снижал количество фокальных некрозов в печени крыс. Применение максара в течение 7-14 дней уменьшало количество некротически измененных гепатоцитов на 13-22% и 18-25% в перипортальной и интралобулярной зонах долек соответственно. К 30-му дню лечения максаром количество некротизированных клеток снижалось до нормы в перипортальной зоне и на 69% в интралобулярной зоне ($p < 0,05$). Применение легалона в течение 7-14 дней практически не влияло на количество фокальных некрозов в печени, к 30-му дню лечения данный показатель снижался на 19% и 33% в перипортальной и интралобулярной зонах соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, в интралобулярной зоне печеночных долек снижение количества фокальных некрозов под воздействием гепатопротективных средств было более выражено, чем в зоне пограничной пластинки (рис. 2).

Антинекротическое действие гепатопротективных препаратов направлено на наиболее повреждаемую гепатотоксинами зону паренхимы печени. Так, при гепатите, вызванном тетрахлорметаном и парацетамолом, количество некротизированных клеток максимально снижается в централобулярном отделе печеночных долек, где гепатотоксины трансформируются цитохромом Р-450 в свободные радикалы и электрофильные интермедиаты. На фоне поражения печени аллиловым спиртом гепатопротективное действие развивается в перипортальной зоне, клетки которой испытывают дефицит восстановленного глутатиона, образующего конъюгаты с метаболитами аллилового спирта – акролеином и эпоксидами [Саратиков А. С. и соавт., 1995].

Использование гепатопротекторов растительного происхождения значительно активировало процессы регенерации в печени животных. После 7-30 дней введения лохеина и максара количество двухъядерных гепатоцитов в перипортальных отделах долек печени было достоверно, на 7-32% и 20-33% соответственно выше контрольных значений ($p < 0,05$). В интралобулярных зонах на 7-14 дни лечения лохеином и максаром данный показатель оставался ниже, чем у контрольных животных, однако, был достоверно выше, чем у животных, исследованных после окончания интоксикации. Через 30 дней терапии лохеином количество двухъядерных гепатоцитов в печени крыс нормализовалось, при ис-

Примечание к рис. 1-3

p<0,05

1-по сравнению с контролем
2-по сравнению с 4-пентеновой кислотой, 7 дней

3-по сравнению с 4-пентеновой кислотой, 7 дней без лечения

4-по сравнению с лохеином

5-по сравнению с максаром

6-по сравнению с эплиром

4-ПК – 4-пентеновая кислота

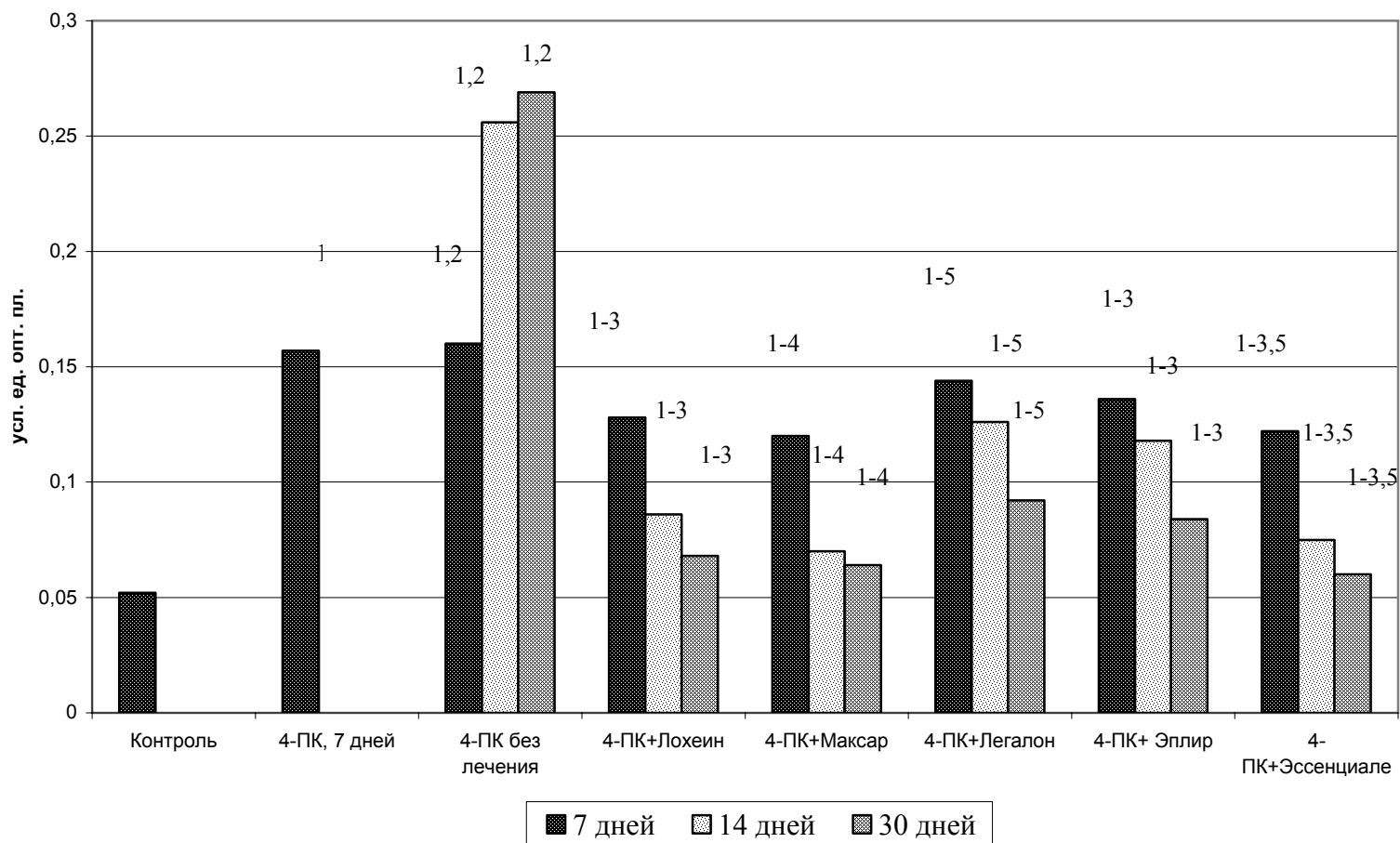


Рис. 1. Содержание липидов в гепатоцитах крыс при моделировании синдрома Рейе и коррекции его лохеином, максаром, легалоном, эплиром и эссенциале в течение 7, 14, 30 дней

пользовании максара – превышало норму на 45% ($p < 0,05$). При лечении легалоном в течение 7 дней количество двухъядерных гепатоцитов оставалось таким же, как при модели синдрома Рейе, затем к 14-му дню повышалось во всех отделах долек, оставаясь несколько ниже нормы, к 30-му дню терапии нормализовалось в интралобулярной зоне и превышало показатель контроля на 7% в области пограничной пластинки ($p < 0,05$) (рис. 3).

Применение лохеина, максара и легалона в течение 7-30 дней на фоне экспериментального синдрома Рейе нормализовало содержание и расположение гликогена в гепатоцитах крыс.

Гепатопротективная терапия экспериментального синдрома Рейе препаратами растительного происхождения нормализует в крови активность ферментов – индикаторов цитолиза и холестаза (γ -глутамилтранспептидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, кислой и щелочной фосфатазы), снижает концентрацию билирубина и свободных фенолов [Венгеровский А. И., 1996; Венгеровский А. И., 1997; Арбузов А. Г., 2001].

Активность сукцинатдегидрогеназы, $NADH_2$ - и $NADPH_2$ -тетразолийредуктаз при терапии лохеином в течение 7-30 дней возрастала в 1,1-1,8 раза, активность β -оксибутиратдегидрогеназы и кислой фосфатазы к 30-му дню нормализовалась ($p < 0,05$). При использовании максара на протяжении 30 дней активность $NADH_2$ -, $NADPH_2$ -тетразолийредуктаз, β -оксибутиратдегидрогеназы и кислой фосфатазы полностью нормализовалась, активность сукцинатдегидрогеназы повышалась в 1,8 раза ($p < 0,05$). При терапии легалоном в течение 7-30 дней активность ферментов восстанавливалась менее значительно, чем при использовании лохеина и максара: через 30 дней активность сукцинатдегидрогеназы, $NADH_2$ -, $NADPH_2$ -тетразолийредуктаз и β -оксибутиратдегидрогеназы повышалась в 1,4-1,6 раза, активность кислой фосфатазы уменьшалась в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Гепатопротекторы лохеин, максар и легалон, введенные в течение 7, 14 и 30 дней на фоне экспериментального синдрома Рейе, вызванного у крыс 4-пентеновой кислотой, проявили высокую терапевтическую активность. При использовании гепатопротективных средств в течение 30 дней отмечался наиболее выраженный терапевтический эффект.

Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы при введении в течение 7, 14 и 30 дней на морфофункциональное состояние печени крыс с экспериментальным синдромом Рейе

На фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой препараты фосфолипидов, стабилизируя мембраны гепатоцитов, уменьшают в крови активность цитолитических ферментов, уровень билирубина и продуктов эндогенной интоксикации, ликвидируют гипогликемию и гипопропротеинемию [Венгеровский А. И. и соавт., 1993; Арбузов А. Г., 2001; Венгеровский А. И., 2002].

В печени животных, получавших лечение гепатопротекторами фосфолипидной природы в течение 7-30 дней на фоне модели синдрома Рейе, сохранялись умеренная перицентральныйная дисконкомплексация печеночных пластинок,

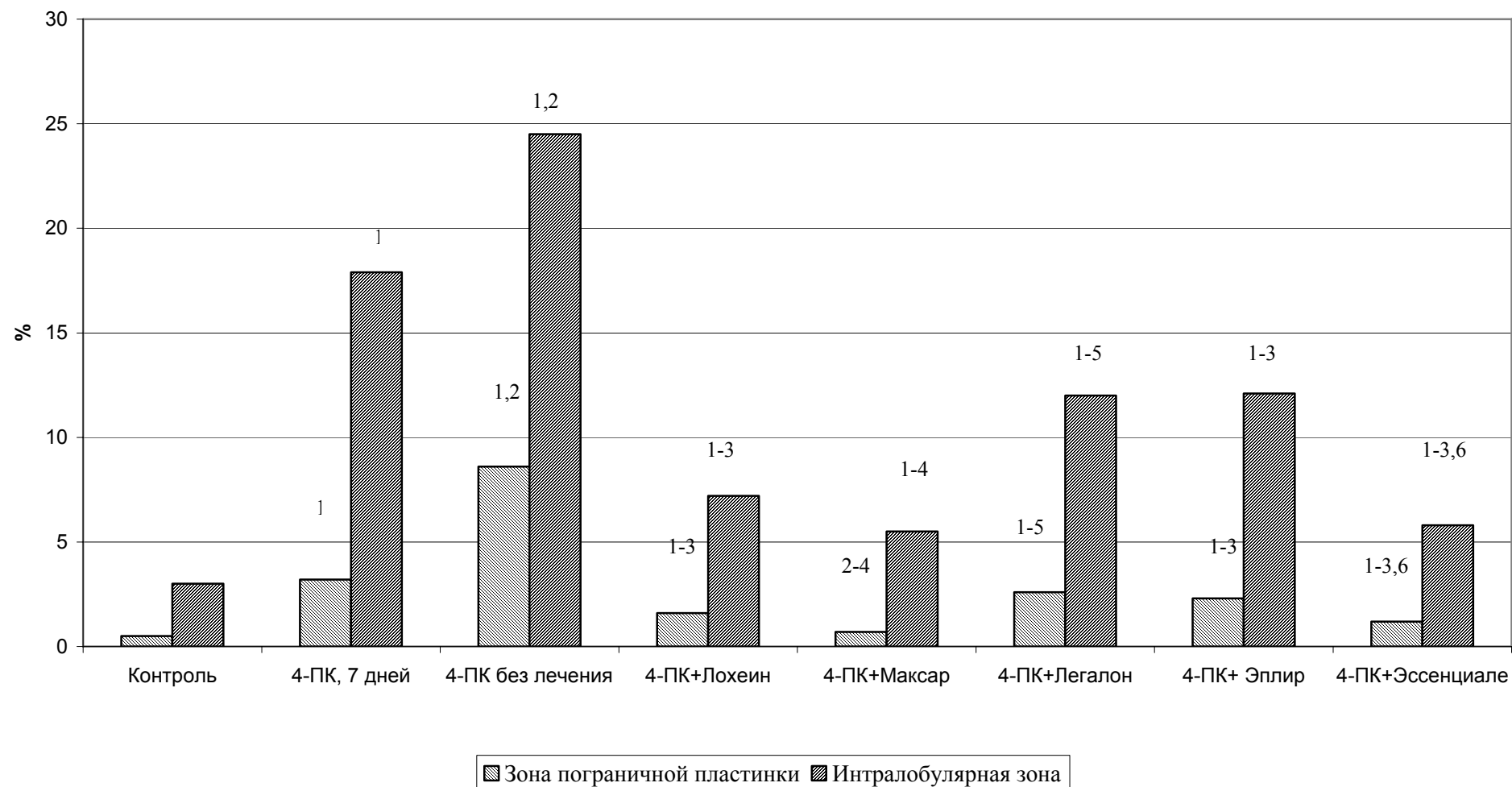


Рис. 2. Количество фокальных некрозов на 1000 клеток в печени крыс при моделировании синдрома Рейе и коррекции его лохеином, максаром, легалоном, эплиром и эссенциале в течение 30 дней

циркуляторные нарушения и перипортальная инфильтрация. Однако гистоархитектоника и состояние сосудов печени было значительно лучше, чем у крыс, исследованных после окончания введения 4-пентеновой кислоты.

Эплир и эссенциале стимулируют β -окисление длинноцепочечных и среднецепочечных жирных кислот в митохондриях гепатоцитов, уменьшают гиперлипидемию, восстанавливают синтез мочевины и кетоновых тел [Арбузов А. Г., 2001].

Применение эплира и эссенциале на протяжении 7-30 дней снижало содержание липидов в гепатоцитах на 13-62% по сравнению с содержанием липидов, определенным сразу после окончания инъекций 4-пентеновой кислоты ($p < 0,05$) (рис. 1).

При введении эплира в течение 7 дней количество фокальных некрозов в зоне пограничной пластинки оставалось таким же, как при экспериментальном синдроме Рейе, несколько повышалось (на 11%) в интралобулярной зоне. Через 14-30 дней лечения эплиром количество фокальных некрозов уменьшалось на 9-28% в области пограничной пластинки и на 11-32% в интралобулярной зоне по сравнению с данными показателями у крыс после 7 инъекций 4-пентеновой кислоты ($p < 0,05$). При использовании эссенциале в течение 7-30 дней количество фокальных некрозов снижалось на 13-63% в зоне пограничной пластинки и на 14-68% в интралобулярной зоне ($p < 0,05$) (рис. 2).

Количество двухъядерных гепатоцитов на 7-й день лечения эплиром и эссенциале в зоне пограничной пластинки было на 5% и 32% соответственно выше, чем у животных после окончания введения 4-пентеновой кислоты, в интралобулярной зоне повышалось на 8% и 31% соответственно ($p < 0,05$). Через 14 дней терапии эплиром количество двухъядерных гепатоцитов в зоне пограничной пластинки превышало норму на 14%, к 30-му дню нормализовалось. При использовании эссенциале на протяжении 14-30 дней оно было выше нормы на 49-38% ($p < 0,05$). В интралобулярной зоне к 14 дню лечения эплиром и эссенциале количество двухъядерных гепатоцитов повышалось на 76% и 115% соответственно, не достигая показателя контроля, на 30 день терапии эплиром увеличивалось на 107%, при использовании эссенциале нормализовалось ($p < 0,05$) (рис. 3).

Лечение эплиром на протяжении 7 дней не влияло на нарушенные при модели синдрома Рейе расположение гликогена в гепатоцитах и его локализацию в печеночных дольках. Только к 30 дню лечения расположение полисахарида в клетках нормализовалась, однако значительное количество гепатоцитов не содержало гликоген. При терапии эссенциале уже к 7 дню гликоген находился в клетках в виде мелкой зернистости по всей цитоплазме, а к 30 дню лечения и содержание гликогена в клетках печени визуально не отличались от нормы.

Активность сукцинатдегидрогеназы, NADH₂- и NADPH₂-тетразолийредуктаз в клетках печени крыс при терапии эплиром в течение 7-30 дней на 12-56% превышала активность у животных после окончания введения 4-пентеновой кислоты ($p < 0,05$). Активность β -оксибутиратдегидрогеназы при введении эплира на протяжении 7 дней снижалась на 5%, затем к 14-30 дням увеличивалась на 8-31% по сравнению с активностью у крыс после 7 инъекций

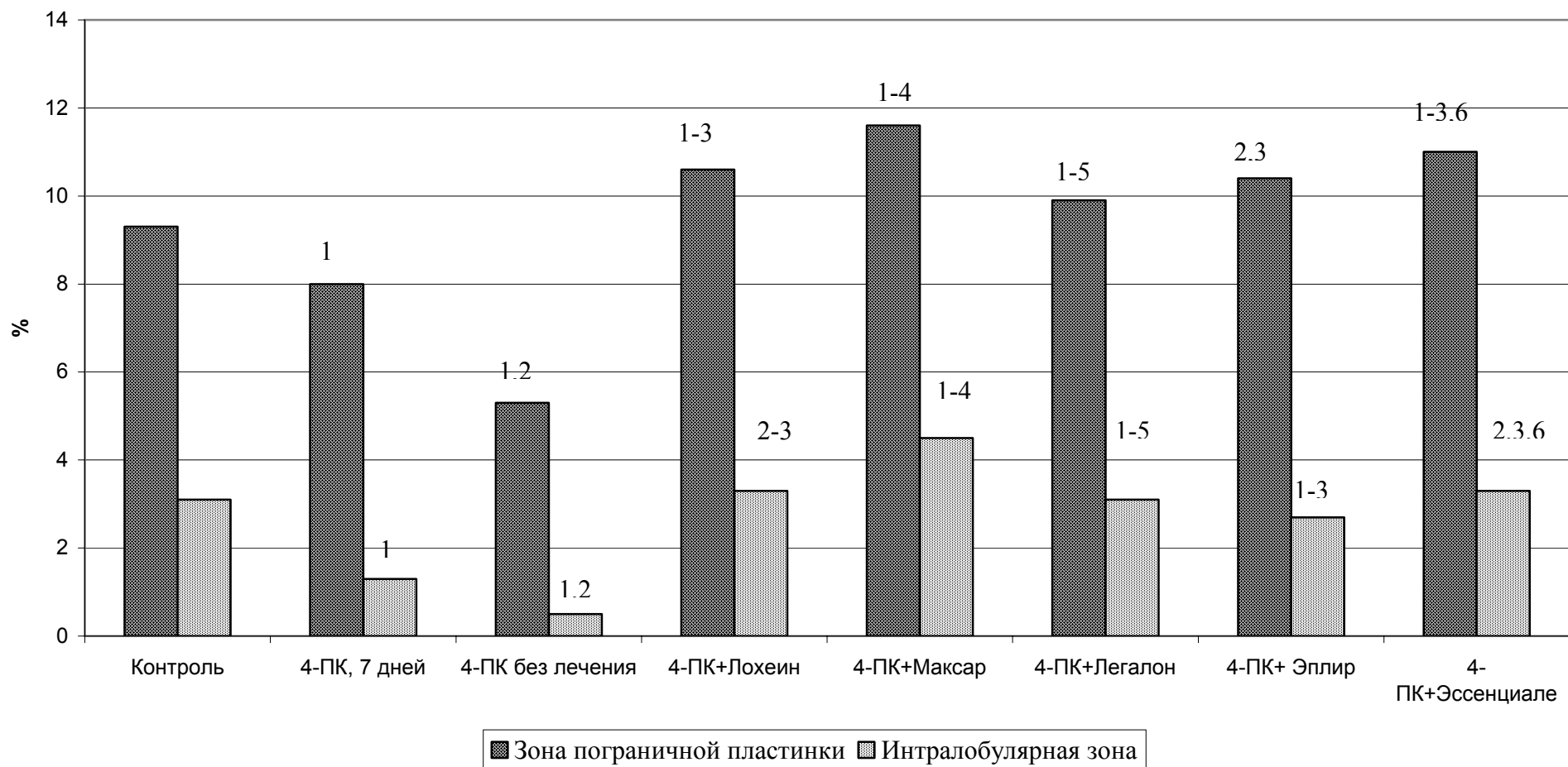


Рис. 3. Количество двухъядерных гепатоцитов на 1000 клеток в печени крыс при моделировании синдрома Рейе и коррекции его лохеином, максаром, легалоном, эплиром и эссенциале в течение 30 дней

4-пентеновой кислоты ($p < 0,05$). Эссенциале на протяжении 7-14 дней повышал активность сукцинатдегидрогеназы, NADH_2 -, NADPH_2 -тетразолийредуктаз и β -оксибутиратдегидрогеназы на 19-106%, к 30 дню лечения нормализовал активность NADH_2 -, NADPH_2 -тетразолийредуктаз и β -оксибутиратдегидрогеназы, увеличивал активность сукцинатдегидрогеназы на 71% ($p < 0,05$). Активность кислой фосфатазы при терапии эплиром и эссенциале в течение 7 дней повышалась на 13% и 4%, затем к 14 дню уменьшалась на 2% и 15% соответственно по сравнению с активностью в группе после окончания инъекций 4-пентеновой кислоты ($p < 0,05$). При использовании эссенциале в течение 30 дней активность данного фермента нормализовалась, при терапии эплиром – уменьшалась на 23% ($p < 0,05$).

Гепатопротекторы, содержащие фосфолипиды, потенцируют функции эндогенных липидорастворимых антиоксидантов и глутатионзависимой антиперекисной системы гепатоцитов, чем обусловлен их мембраностабилизирующий эффект. Гепатопротекторы восстанавливают нормальный спектр фосфолипидов в мембранах гепатоцитов. Фосфолипиды как структурные антиоксиданты ограничивают доступ свободных радикалов внутрь мембран к полиеновым жирным кислотам [Венгеровский А. И., 1991; Буко В. У. и соавт., 1994].

Эплир обогащает микросомы и митохондрии фосфатидилэтаноламином. Каротиноиды, входящие в состав эплира, являются акцепторами алкоксильных, алкильных и перекисных радикалов. Тиолы эплира стимулируют синтез глутатиона в гепатоцитах и оказывают собственное антиоксидантное действие [Венгеровский А. И., 1991].

Таким образом, гепатопротекторы лохеин, максар, легалон, эплир и эссенциале, введенные животным в течение 7, 14 и 30 дней на фоне экспериментального синдрома Рейе, защищают паренхиму печени от токсического воздействия 4-пентеновой кислоты, повышают резистентность клеток к деструктивному воздействию токсина вследствие мембраностабилизирующего влияния и нормализации реакций метаболизма. Препараты предотвращают гибель животных, вызывают регресс структурных и метаболических нарушений, вызванных в печени крыс 4-пентеновой кислотой.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о возможности включения лохеина, максара, легалона, эплира и эссенциале в комплексную терапию синдрома Рейе.

ВЫВОДЫ

1. При внутрибрюшинном введении крысам 4-пентеновой кислоты или инъекции ацетилсалициловой кислоты через 1 ч после введения пирогенала в печени развиваются морфофункциональные нарушения, аналогичные патогистологическим проявлениям синдрома Рейе.

2. Наиболее адекватной моделью синдрома Рейе является интоксикация 4-пентеновой кислотой, введенной внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней.

3. Применение гепатопротекторов лохеина, максара, легалона, эплира и эссенциале на фоне экспериментального синдрома Рейе в течение 7, 14 и 30 дней оказывает положительное влияние на морфофункциональное состояние печени – нормализует ее гистоархитектонику, уменьшает жировую дистрофию гепатоцитов, количество фокальных некрозов, активность кислой фосфатазы, увеличивает содержание гликогена, активность сукцинатдегидрогеназы, NADH₂-, NADPH₂-тетразолийредуктаз, β-оксибутиратдегидрогеназы и щелочной фосфатазы, усиливает регенераторные процессы.

4. Максар и эссенциале при экспериментальном синдроме Рейе достоверно эффективнее, чем другие гепатопротекторы, уменьшают структурные и метаболические нарушения в печени животных.

5. Эффективность гепатопротективной терапии при экспериментальном синдроме Рейе зависит от ее продолжительности – наиболее значительные положительные эффекты по отношению к структуре гепатоцитов, активности их внутриклеточных ферментов, состоянию циркуляторного русла печени крыс наблюдаются при введении препаратов в течение 30 дней.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ

1. Морфофункциональное состояние печени крыс при экспериментальном синдроме Рейе и на фоне лечения гепатопротекторами // Межрегион. науч. конф. Сибири и Дальнего Востока, посвящ. 150-летию со дня рождения акад. И. П. Павлова. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1999. – С. 166-167 (соавт.: М.Б. Червякова).
2. Структурно-метаболические нарушения в печени и головном мозге при экспериментальном синдроме Рейе // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. – 2002. – № 14-15. – С. 80-82 (соавт.: Ю.Ю. Мельник, И.В. Суходоло, А.И. Венгеровский).
3. Влияние гепатопротекторов растительного происхождения на морфофункциональное состояние печени крыс при моделировании синдрома Рейе // Науки о человеке: Сб. статей: по матер. 4-го конгр. молодых ученых и специалистов, Томск, 15-16 мая 2003 года. – Томск, 2003. – С. 185 (соавт.: Ю.Ю. Мельник).
4. Влияние гепатопротекторов, содержащих полифенолы, на функциональную морфологию печени при экспериментальном синдроме Рейе // Бюл. Сиб. медицины. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 41-45.
5. Морфофункциональное состояние печени крыс при лечении экспериментального синдрома Рейе гепатопротекторами растительного происхождения // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2004. – Т. 14, Прил. 22. – С. 103 (соавт.: Ю.Ю. Мельник).
6. Морфофункциональные показатели гепатоцитов крыс при лечении экспериментального синдрома Рейе гепатопротекторами фосфолипидной природы // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. – 2004. – № 1. – С. 97 (соавт.: Ю.Ю. Мельник).