

Влияние гепатопротекторов, содержащих полифенолы, на функциональную морфологию печени при экспериментальном синдроме Рейе

Шамардина Л.А.

Effect of polyphenol-containing hepatoprotectors on functional liver morphology during experimental Reye's syndrome

Shamardina L.A.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Шамардина Л.А.

При экспериментальном синдроме Рейе, вызванном у крыс 4-пентеновой кислотой, в печени развиваются нарушения гистоархитектоники, циркуляторные расстройства, микровезикулярный стеатоз, некрозы в центральной части долек, снижается число двухъядерных клеток, нарушается активность митохондриальных, лизосомальных и цитоплазматических ферментов гепатоцитов. Гепатопротекторы полифенольной природы — лохеин, максар и легалон, примененные для терапии экспериментального синдрома Рейе, восстанавливают нормальное гистологическое строение печени, уменьшают микровезикулярный стеатоз, количество некротизированных клеток паренхимы, стимулируют регенерацию, повышают активность внутриклеточных ферментов гепатоцитов. Наибольшим терапевтическим действием обладают лохеин и максар.

Ключевые слова: печень, экспериментальный синдром Рейе, 4-пентеновая кислота, лохеин, максар, легалон.

During experimental Reye's syndrome caused in rats by 4-pentenoic acid, histoarchitectonics disturbances, circulatory disturbances, microvesicular steatosis, necrosis in central lobule part have been developed, number of 2-nucleus cells has been decreased, activity of mitochondrial, lysosomal and cytoplasmic hepatocyte enzymes has been disturbed. Hepatoprotectors of polyphenol nature — lochein, maksar and legalon — used for experimental Reye's syndrome therapy, have regenerated a normal liver histologic structure, decreased the microvesicular steatosis and the quantity of necrotizing parenchyma cells, stimulated the regeneration and increased the activity of intracellular hepatocyte enzymes. Lochein and maksar possess the most therapeutic activity.

Key words: liver, experimental Reye's syndrome, 4-pentenoic acid, lochein, maksar, legalon.

УДК 616.36:615.24

Введение

Синдром Рейе (СР) представляет собой острую токсическую энцефалопатию в сочетании с жировой дистрофией печени и других внутренних органов. Возникновение СР связано с приемом салицилатов на фоне вирусных инфекций верхних дыхательных путей, ветряной оспы, диареи вирусной этиологии [1, 10]. Салицилаты и вирусные антигены повреждают митохондрии, что нарушает митохондриальное β -окисление средне-

цепочечных и длинноцепочечных жирных кислот и синтез мочевины. Дефекты метаболизма частично обусловлены уменьшением количества свободного карнитина [11].

В настоящей статье рассмотрено терапевтическое действие гепатопротекторов растительного происхождения — максара, лохеина и легалона — на морфофункциональное состояние печени при экспериментальном СР, вызванном у крыс введением 4-пентеновой (аллилуксусной) кислоты. Этот токсический агент, стимулируя ацилирование кар-

нитина и его экскрецию с мочой, нарушает β -окисление жирных кислот, повышает в крови концентрацию аммиака, мочевины, вызывает набухание митохондрий печени [12, 13].

Лохеин представляет собой жидкий водно-спиртовой экстракт травы культивируемой солянки холмовой. Он содержит алкалоиды изохинолиновой структуры (0,2%), белки (1%), флавоноиды (2%), стерины (β -ситостерин, стигмастерин, 5%), бетаин (7%), неорганические соли калия, магния и цинка (10%) [6]. Максар является полифенольной фракцией ядровой древесины маакии амурской (изофлавоноиды, гидроксильированные стильбены) [2]. Препарат семян расторопши пятнистой — легалон (силимарин) — включает в качестве действующих веществ флаволигнаны [9].

Материал и методы

Эксперименты проводили в осенне-зимние сезоны на 160 беспородных белых крысах-самцах массой 180—220 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. Животные ежедневно в течение 7 дней получали внутрибрюшинные инъекции 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг. С 8-го дня эксперимента им вводили в желудок лохеин (160 мг/кг экстрактивных веществ) в виде деалкоголизированного жидкого экстракта, максар (100 мг/кг) и легалон (200 мг/кг) в виде суспензии на 1%-й крахмальной слизи. Дозы препаратов являются терапевтически эффективными. Контрольные животные ($n = 50$) в те же сроки получали растворители гепатопротекторов. Гистологическое и гистохимическое исследования проводили через 1, 7, 14 и 30 дней после окончания введения 4-пентеновой кислоты и через 7, 14 и 30 дней после начала лечения гепатопротекторами, в аналогичные сроки исследовали контрольный материал. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом через 12 ч после последнего введения гепатопротекторов или их растворителей.

Для оценки патоморфологических изменений в печени проводили общее гистологическое исследование, определяли количество фокальных некрозов и двухъядерных гепатоцитов, гистохимически выявляли

содержание липидов, гликогена, активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), NADH_2 -тетразолийредуктазы (NADH_2 -тр), NADPH_2 -тетразолийредуктазы (NADPH_2 -тр), β -оксибутиратдегидрогеназы (β -ОБДГ), кислой фосфатазы (КФ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) [6].

Результаты обрабатывали статистически с помощью параметрического t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При введении 4-пентеновой кислоты в течение 7 дней (экспериментальный СР) в печени наблюдались выраженная дискомплексация печеночных пластинок, циркуляторные расстройства в системе синусоидов, микровезикулярное ожирение, фокальные и зональные некрозы гепатоцитов преимущественно в центральной части дольки.

Содержание липидов повышалось в 3 раза по сравнению с уровнем, характерным для intactных животных (таблица). Количество фокальных некрозов увеличивалось до 19,6% (в норме — 3,1%), число двухъядерных гепатоцитов снижалось до 7,7% (в норме — 12,7%) (рис. 1, 2). Гликоген в периферических отделах долек выявлялся в виде единичных мелких гранул, в промежуточных и перипортальных отделах — в виде крупных, ярко окрашенных «чернильных пятен». Активность СДГ снижалась на 27%, NADPH_2 -тр — на 33%, β -ОБДГ — на 25%, активность NADH_2 -тр повышалась на 26%, активность КФ — на 75% (см. таблицу). Активность ЩФ выявлялась только в эндотелии сосудов и клетках Купфера, не определялась в желчных капиллярах (в желчных капиллярах печени intactных крыс регистрировалась высокая активность этого фермента).

У крыс, оставленных без лечения в течение 7, 14 и 30 дней после завершения инъекций 4-пентеновой кислоты, прогрессировали морфофункциональные нарушения в печени. Дискомплексация печеночных пластинок усиливалась, междольковые сосуды становились полнокровными, отмечалась выраженная дистрофия гепатоцитов в области центральных вен и в центральной части долек. Микровезикулярное ожи-

рение гепатоцитов продолжало нарастать, содержание липидов в 2,1—3,9 раза превышало их количество в норме (см. таблицу). Количество фокальных некрозов достигало 27,8—30,2% на фоне снижения до 6,9—8,2% числа двухъядерных гепатоцитов (рис. 1, 2). Гликоген выявлялся только в перипортальной зоне в виде мелкой зернистости или единичных гранул. Активность СДГ оставалась сниженной на 20—25%, NADPH_2 -тр — на 21—56%, β -ОБДГ — на 10—22% по сравнению с активностью ферментов у интактных крыс. Активность NADH_2 -тр снижалась на 29—46%, активность КФ оставалась повышенной в 3—5 раз (см. таблицу). Активность ЩФ выявлялась только в клетках Купфера.

При введении лохеина восстанавливалась типичная для интактных животных гистоархитектоника печеночных долек, нормализовалось кровообращение в синусоидах. На периферии долек сохранялись умеренно выраженные дистрофические изменения гепатоцитов, микроциркулярный стеатоз уменьшался.

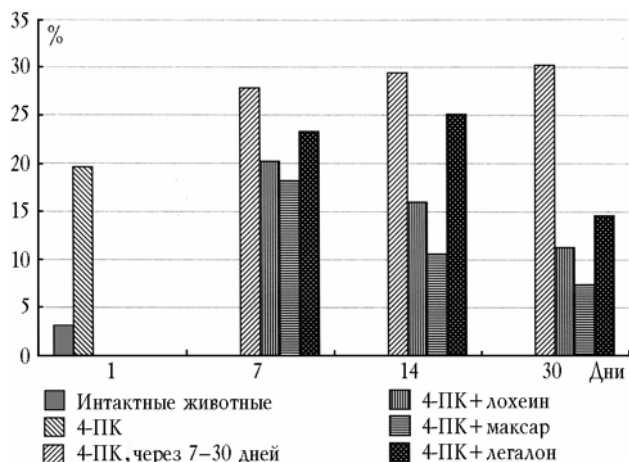


Рис. 1. Влияние лохеина, максара и легалона на количество фокальных некрозов в печени крыс при экспериментальном синдроме Рейе

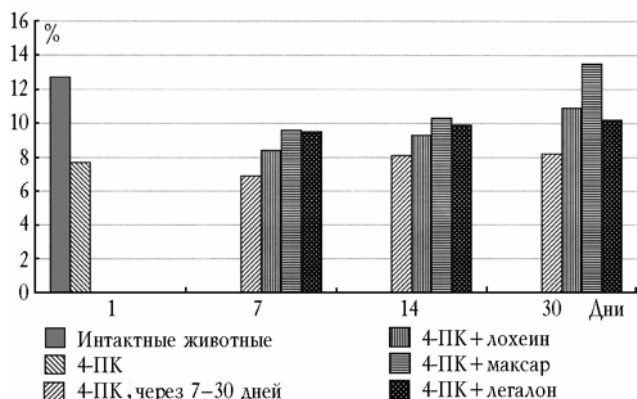


Рис. 2. Влияние лохеина, максара и легалона на количество двухъядерных гепатоцитов в печени крыс при экспериментальном синдроме Рейе

На 7, 14 и 30-й дни лечения лохеином содержание липидов соответственно оставалось на 146; 65 и 31% выше, чем у интактных животных (см. таблицу), количество фокальных некрозов снижалось до 20,2; 16,0 и 11,3% соответственно, количество двухъядерных гепатоцитов повышалось до 8,4; 9,3 и 10,9% соответственно (см. рис. 1, 2). Гликоген выявлялся в виде мелкой зернистости на периферии долек и в виде крупных гранул в центральной их части.

Активность СДГ возрастала на 7-й и 14-й дни лечения на 10 и 41% соответственно, к 30-му дню становилась такой же, как в норме. На 7, 14 и 30-й дни терапии лохеином активность NADH_2 -тр оставалась повышенной на 31; 68 и 18%, КФ — на

90; 125 и 11% соответственно. Активность NADPH_2 -тр повышалась на 14-й день на 48% и нормализовалась к 30-му дню введения гепатопротектора. Активность β -ОБДГ через неделю терапии была снижена на 15%, к 14-му дню повышалась до нормы. Активность КФ на 7, 14 и 30-й дни лечения оставалась увеличенной на 90; 125 и 11% соответственно (см. таблицу).

Максар также восстанавливал гистоархитектонику печеночных долек и кровообращение в синусоидах близко к норме. В промежуточной зоне долек наблюдались дистрофические изменения гепатоцитов. Микровезикулярное ожирение печеночных клеток уменьшалось, однако содержание липидов к 7, 14 и 30-му дням терапии оставалось повышенным на 131, 73 и 23% соответственно по сравнению с их количеством у интактных животных (см. таблицу). Количество фокальных некрозов снижалось до 18,2; 10,6 и 7,4%, число двухъядерных гепатоцитов возрастало до 9,6; 10,3 и 13,5% на 7, 14 и 30-й дни лечения соответственно (см. рис. 1, 2). В гепатоцитах, локализованных в области центральных вен, определялись крупные, интенсивно окрашенные гранулы гликогена. Гепатоциты перипортальной зоны содержали гликоген в виде мелкой зернистости.

На 7—14-й дни введения максара активность СДГ увеличивалась на 5—42%, NADH_2 -тр — на 10—25%, NADPH_2 -тр — на 11—17%, β -ОБДГ — на 5—10%. К 30-му дню активность этих ферментов нормализовалась. Активность КФ к 7, 14 и 30-му дням терапии оставалась повышенной на 77, 112 и 21% соответственно (см. таблицу).

Легалон в меньшей степени, чем лохеин и максар, восстанавливал гистологическое строение печеночных долек и уменьшал циркуляторные расстройства. К 30-му дню терапии легалоном сохранялись умеренная дискомплексация печеночных пластинок и дистрофические изменения гепатоцитов в центральной части долек. Содержание липидов на 7, 14 и 30-й дни введения гепатопротектора оставалось повышенным на 177, 142 и 77% соответственно по сравнению с их уровнем у интактных животных (см. таблицу). Количество фокальных некрозов возрастало до 23,3

и 25,1% на 7-й и 14-й дни и снижалось до 14,6% к 30-му дню, число двухъядерных гепатоцитов в те же сроки лечения возрастало до 9,5; 9,9 и 10,2% (см. рис. 1, 2). Содержание гликогена увеличивалось в гепатоцитах центральной части долек. Гликоген не выявлялся в клетках периферической зоны.

Активность СДГ к 14-му дню лечения легалом уменьшалась на 13%, к 30-му дню повышалась на 19% по сравнению с активностью у интактных животных. Активность NADH_2 -тр на 7—14-й дни уменьшалась на 3—5% и нормализовалась к 30-му дню. Активность NADPH_2 -тр на 7-й день лечения легаломом снижалась на 25%, к 14-му дню восстанавливалась до нормы. Активность β -ОБДГ спустя неделю после введения легалона была на 9% ниже, чем у интактных крыс, к 14-му дню — повышалась на 8%, к 30-му дню — нормализовалась. Активность КФ на 7, 14 и 30-й дни терапии была повышена на 125, 116 и 31% соответственно (см. таблицу).

Таким образом, гепатопротективные средства растительного происхождения, содержащие полифенолы, улучшают морфофункциональное состояние печени при экспериментальном СР, вызванном 4-пентеновой кислотой. В проведенных ранее исследованиях было установлено, что эти гепатопротекторы при экспериментальном СР ослабляют гиперферментемию, снижают в крови содержание общего и непрямого билирубина, общих липидов, триглицеридов, малонового диальдегида, аммиака и фенолов, повышают уровень мочевины, белка, глюкозы и кетоновых тел [3, 4]. Препараты, оказывая прямое влияние на митохондрии, препятствуют вызываемому 4-пентеновой кислотой разобщению окислительного фосфорилирования, активируют энергопродукцию, повышают уровень восстановленных пиридиннуклеотидов [5]. Основное значение в механизме действия гепатопротекторов имеет их антиоксидантный эффект — способность полифенолов инактивировать свободные радикалы в процессе обратимого окисления фенольных форм в хиноны [7].

Заключение

Гепатопротекторы лохеин и максар в большей степени, чем легалон, уменьшают микроцикулярный стеатоз, количество некротизированных клеток паренхимы, стимулируют регенерацию печени, повышают активность митохондриальных, лизосомальных и цитоплазматических ферментов гепатоцитов при экспериментальном СР. Результаты проведенных нами исследований позволяют рекомендовать гепатопротекторы полифенольной природы для клинического изучения в качестве средств комплексной терапии СР и других заболеваний печени, сопровождающихся нарушением β -окисления жирных кислот.

Литература

1. Венгеровский А.И., Батурина Н.О., Саратиков А.С. Синдром Рейе — тяжелое осложнение терапии салицилатами // Экспер. и клин. фармакол. 2000. Т. 63. < 2. С. 76—80.
2. Венгеровский А.И., Седых И.М., Саратиков А.С. Влияние полифенолов маакии амурской на анти-токсическую функцию печени // Экспер. и клин. фармакол. 1993. Т. 56. < 5. С. 47—49.
3. Венгеровский А.И., Суходоло И.В., Чучалин В.С. и др. Эффективность легалона и лохеина при экспериментальном синдроме Рейе // Хим.-фарм. журн. 2000. Т. 34. < 4. С. 6—8.
4. Венгеровский А.И., Суходоло И.В., Чучалин В.С. и др. Гепатопротекторы оказывают лечебное действие при экспериментальном синдроме Рейе // Экспер. и клин. фармакол. 2000. Т. 63. < 5. С. 68—71.
5. Венгеровский А.И., Хазанов В.А., Тимофеев М.С. и др. Влияние гепатопротекторов и регулятора энергетического обмена на функциональное состояние митохондрий печени при экспериментальном синдроме Рейе // Бюлл. экспер. биологии и медицины. 2003. Прил. 1. С. 89—91.
6. Лойда З., Госсрай Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. М.: Мир, 1982. 272 с.
7. Саратиков А.С., Венгеровский А.И. Новые гепатопротекторы природного происхождения // Экспер. и клин. фармакол. 1995. Т. 58. < 1. С. 8—11.
8. Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Чучалин В.С. Экстракт солянки холмовой (лохеин) — эффективная защита печени. Томск: STT, 2000. 114 с.
9. Скаун Н.П., Шманыко В.В., Охримович Л.М. Клиническая фармакология гепатопротекторов. Тернополь: Збруч, 1995. 158 с.
10. Claas E., Osterhaus A., van Beek R. et al. Human influenza H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus // Lancet. 1998. V. 351. < 9101. P. 472—477.
11. Lemasters J., Nieminen A., Quian T. et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy

Шамардина Л.А. Влияние гепатопротекторов, содержащих полифенолы, на функциональную морфологию печени...

- // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 12. к 1. P. 177—196.
12. *Sakaida N., Sensaki N., Shikata N. et al.* Microvesicular fatty liver in rats with resembling Reye's syndrom induced by 4-pentenoic acid // Acta Pathol. Jpn. 1990. V. 36. к 2. P. 635—642.
13. *Sugimoto T., Woo M., Nishida M. et al.* The effect of L-carnitine supplementation in 4-pentenoic acid treated rats // Brain Dev. 1990. V. 12. к 4. P. 417—422.

Поступила в редакцию 15.11.2003 г.

**Влияние лохеина, максара и легалона на активность ферментов и содержание липидов в гепатоцитах при экспериментальном синдроме Рейе
(усл. ед. оптической плотности, $M \pm m$)**

Показатели	Интактные животные	4-ПК, 7 дней	4-ПК, через 7 дней без лечения	4-ПК, через 14 дней без лечения	4-ПК, через 30 дней без лечения	4-ПК + лохеин, 7 дней	4-ПК + лохеин, 14 дней	4-ПК + лохеин, 30 дней	4-ПК + максар, 7 дней	4-ПК + максар, 14 дней	4-ПК + максар, 30 дней	4-ПК + легалон, 7 дней	4-ПК + легалон, 14 дней	4-ПК + легалон, 30 дней
СДГ	0,187 ± 0,002	0,137 ± 0,002 ¹	0,149 ± 0,002 ²	0,168 ± 0,002 ²	0,140 ± 0,003 ²	0,206 ± 0,005 ^{2,3}	0,263 ± 0,002 ^{2,4}	0,190 ± 0,002 ^{2,5}	0,197 ± 0,002 ^{2,3,6}	0,265 ± 0,003 ^{2,4}	0,192 ± 0,002 ^{2,5}	0,170 ± 0,003 ^{2,3,6,9}	0,163 ± 0,002 ^{2,4,7,10}	0,222 ± 0,002 ^{2,5,8,11}
NADH ₂ -тр	0,203 ± 0,002	0,256 ± 0,004 ¹	0,090 ± 0,003 ²	0,135 ± 0,002 ²	0,160 ± 0,002 ²	0,266 ± 0,003 ^{2,3}	0,342 ± 0,003 ^{2,4}	0,239 ± 0,003 ^{2,5}	0,224 ± 0,002 ^{2,3,6}	0,254 ± 0,003 ^{4,7}	0,204 ± 0,002 ^{2,5,8}	0,192 ± 0,003 ^{2,3,6,9}	0,196 ± 0,002 ^{2,4,7,10}	0,200 ± 0,003 ^{2,5,8,11}
NADPH ₂ -тр	0,063 ± 0,002	0,042 ± 0,003 ¹	0,034 ± 0,003 ²	0,042 ± 0,004	0,045 ± 0,002 ²	0,065 ± 0,003 ^{2,3}	0,093 ± 0,003 ^{2,4}	0,067 ± 0,002 ^{2,5}	0,070 ± 0,002 ^{2,3,6}	0,074 ± 0,003 ^{2,4,7}	0,061 ± 0,003 ^{2,5,8}	0,047 ± 0,002 ^{2,3,6,9}	0,061 ± 0,002 ^{2,4,7,10}	0,068 ± 0,002 ^{2,5,11}
β-ОБДГ	0,265 ± 0,003	0,199 ± 0,003 ¹	0,206 ± 0,002 ²	0,238 ± 0,002 ²	0,215 ± 0,003 ²	0,225 ± 0,002 ^{2,3}	0,271 ± 0,002 ^{2,4}	0,268 ± 0,002 ^{2,5}	0,277 ± 0,002 ^{2,3,6}	0,291 ± 0,002 ^{2,4,7}	0,267 ± 0,002 ^{2,5}	0,240 ± 0,002 ^{2,3,6,9}	0,286 ± 0,002 ^{2,4,7,10}	0,266 ± 0,002 ^{2,5}
КФ	0,091 ± 0,002	0,159 ± 0,002 ¹	0,186 ± 0,003 ²	0,229 ± 0,002 ²	0,188 ± 0,003 ²	0,173 ± 0,003 ^{2,3}	0,205 ± 0,003 ^{2,4}	0,101 ± 0,002 ^{2,5}	0,161 ± 0,002 ^{2,3,6}	0,193 ± 0,002 ^{2,4,7}	0,110 ± 0,003 ^{2,5,8}	0,205 ± 0,002 ^{2,3,6,9}	0,197 ± 0,002 ^{2,4,7,10}	0,119 ± 0,003 ^{2,5,8,11}
Липиды	0,052 ± 0,003	0,157 ± 0,002 ¹	0,160 ± 0,002 ²	0,256 ± 0,002 ²	0,169 ± 0,002 ²	0,128 ± 0,002 ^{2,3}	0,086 ± 0,002 ^{2,4}	0,068 ± 0,002 ^{2,5}	0,120 ± 0,003 ^{2,3,6}	0,090 ± 0,003 ^{2,4,7}	0,064 ± 0,002 ^{2,5,8}	0,144 ± 0,002 ^{2,3,6,9}	0,126 ± 0,005 ^{2,4,7,10}	0,092 ± 0,003 ^{2,5,8,11}

Примечание. 4-ПК — 4-пентеновая кислота; СДГ — сукцинатдегидрогеназа; NADH₂-тр — NADH₂-тетразолийредуктаза; NADPH₂-тр — NADPH₂-тетразолийредуктаза;

β-ОБДГ — β-оксибутиратдегидрогеназа; КФ — кислая фосфатаза.

$P < 0,05$: ¹ — по сравнению с интактными животными, ² — по сравнению с 4-ПК через 7 дней введения, ³ — по сравнению с 4-ПК через 7 дней после окончания введения,

⁴ — по сравнению с 4-ПК через 14 дней после окончания введения, ⁵ — по сравнению с 4-ПК через 30 дней после окончания введения, ⁶ — по сравнению с лохеином (7 дней), ⁷ — по сравнению с лохеином (14 дней), ⁸ — по сравнению с лохеином (30 дней), ⁹ — по сравнению с максаром (7 дней), ¹⁰ — по сравнению с максаром (14 дней), ¹¹ — по сравнению с максаром (30 дней). Приведены средние данные 10 определений.