УДК 577.112.382.3:541.452:612.12:611.36.018.1:616.36-002

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И КОЛИЧЕСТВО ГЕПАТОЦИТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ ПРИ ДЕЙСТВИИ АЛАНИНАМИДА БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

[1]Толстикова Т.Г., [1]Жукова Н.А., [2]Семенов Д.Е., [1]Бессергенева Е.П., [1]Сорокина И.В., [1]Баев Д.С., [2]Глухов Б.М.

[1]ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН, Новосибирск;

[2]ФГБУ «Научно-исследовательский институт региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН, Новосибирск, e-mail: pathol@soramn.ru

Изучено влияние аланинамида бетулоновой кислоты на биохимические показатели крови, численность гепатоцитов и морфологию печени крыс при хроническом токсическом поражении четыреххлористым углеродом в сочетании с этанолом. Через 8 нед. токсического воздействия у животных в крови повысилась активность ферментов АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ соответственно на 94, 141, 83 и 134%. Концентрация ядер гепатоцитов и их абсолютное число уменьшились на 70%, двухъядерные гепатоциты составили 0,87% популяции. К 6-й неделе происходило развитие фиброза с пролиферацией желчных капилляров с прогрессированием к 8-й неделе в цирроз. При введении животным аланинамида бетулоновой кислоты через 8 нед. уровень прямого билирубина, активности ЩФ, ЛДГ и АЛТ существенно не отличались от контроля; популяция двухъядерных гепатоцитов возрастала до 7,1%, признаки фиброза, цирроза и перестройки печеночных балок не выявлялись. Аланинамид бетулоновой кислоты при энтеральном применении купирует признаки холестаза и цитолиза, увеличивает регенераторный потенциал, полностью предотвращает развитие фиброза и цирроза печени.

Ключевые слова: хронический гепатит, фиброз печени, аланинамид бетулоновой кислоты, биохимические показатели крови, щелочная диссоциация клеток печени

BIOCHEMICAL BLOOD INDICES AND THE NUMBER OF HEPATOCYTES IN RAT LIVER UNDER TOXIC HEPATITIS AND ACTION OF BETULONIC ACID ALANINAMID

[1]Tolstikova T.G., [1]Zhukova N.A., [2]Semenov D.E., [1]Bessergeneva E.P., [1]Sorokina I.V., [1]Baev D.S., [2]Glukhov B.M.

[1]N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk;

[2]Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS, Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru

The effect of alaninamide of betulonic acid (ABA) on biochemical parameters of blood, population dynamics and morphology of the hepatocytes of the liver of rats with chronic toxic injury by carbon tetrachloride in combination with ethanol. Liver fibrosis in animals was modeled by intragastric administration of carbon tetrachloride and 5% ethanol for 6 weeks. We determined the activity of ALT, AST, alkaline phosphatase, LDH, total protein, direct bilirubin and glucose. As a result of toxic effects in animals has increased the activity of enzymes ALT, AST, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase by 94, 141, 83 and 134%. The concentration of the nuclei of hepatocytes and their absolute number decreased by 70%, binuclear hepatocytes were 0,87% of the population. By 6 week marks the development of fibrosis with proliferation of bile capillaries with progression to cirrhosis in 8 weeks. When administered to animals ABA, observed after 8 weeks of recovery to normal levels of direct bilirubin, alkaline phosphatase activity, LDH and ALT, double nuclear hepatocyte population grew to 7,1%. Light microscopy signs of fibrosis, cirrhosis and liver reconstruction beams are not revealed. Betulonic acid alaninamide in enteral administration relieves symptoms of cholestasis and cytolysis, increases regenerative capacity, completely prevents the development of fibrosis and cirrhosis.

Keywords: chronic hepatitis, liver fibrosis, betulonic acid alaninamid, biochemical blood indices, alkaline liver dissocation

Проблема лечения гепатитов различной этиологии является чрезвычайно актуальной. Несмотря на большой арсенал гепатопротекторов, клиницистам не всегда удается добиться стабилизации течения гепатита, повышения регенераторной активности и предотвращения развития фиброза и цирроза печени [8]. В связи с этим продолжаются поиски новых лекарственных агентов, в том числе и растительного происхождения, обладающих широким спектром фармакологической активности и экономической доступностью. Объектом нашего внимания длительное время является производное бетулоновой кислоты – ее аланинамид (АБК). Ранее нами было показано, что этот агент обладает антиоксидантным, противоопухолевым, гемато-, кардио-, нефро- и гепатопротекторным действием в условиях цитостатического воздействия [1–6, 9]. Кроме того, на модели острого токсического гепатита было показано, что введение жи-

вотным АБК способствует нормализации биохимических показателей крови [10, 11]. Поэтому для дальнейшего расширения фармакологического спектра действия данного агента проведены исследования его влияния на процессы фиброгенеза и формирования цирроза печени в длительном эксперименте.

Цель работы – изучение влияния АБК на биохимические показатели крови, популяционную динамику гепатоцитов и морфологию печени крыс при хроническом токсическом поражении четыреххлористым углеродом в сочетании с этанолом.

Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 45 белых лабораторных крысах-самках массой 178 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск), содержавшихся в стандартных условиях на обычном пищевом и водном рационе. Манипуляции с животными проводились согласно Женевской Конвенции 1986 г.

Токсические повреждения печени моделировали путем внутрижелудочного введения четыреххлористого углерода (CCl_4) в дозе 0,1 мл/кг в растворе растительного масла (0,3 мл/100 г) трижды в неделю, в сочетании с 5%-м раствором этанола в качестве питья в свободном доступе на протяжении 6 нед. Все животные были разделены на 3 группы по 15 особей в каждой. Животные I группы получали только CCl_4 и этанол; крысы II группы – те же токсические агенты и АБК в дозе 50 мг/кг в водно-твиновом растворе, который вводили ежедневно внутрижелудочно со 2-й по 6-ю неделю эксперимента включительно (две последующие недели были восстановительным периодом); III группа – интактные животные. Из опыта крыс выводили декапитацией через 3, 6 и 8 нед. В сыворотке крови определяли активность АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ, уровень общего белка, прямого билирубина и глюкозы.

Для оценки популяции гепатоцитов была проведена щелочная диссоциация печени [3]. Клеточную суспензию окрашивали 30 мин 1%-м раствором орсеина на 70%-й уксусной кислоте, разводили дистиллированной водой до концентрации 5 мг/мл. Подсчет ядер гепатоцитов из одного образца ткани проводили в 6 последовательно заполняемых суспензией камерах Горяева. Рассчитывали число ядер гепатоцитов в 1 мг ткани (n), абсолютное число гепатоцитов (M), индекс двуядерных гепатоцитов ($M_2/M \cdot 100$).

Для гистологического исследования образцы печени заключали в парафин по общепринятой методике, изготавливали парафиновые срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином на гистологическом комплексе «MICROM» (Карл Цейс) и по методу Маллори. Исследование проводили с помощью микроскопа Axioskop 40.

Количественные данные обрабатывали методами параметрической статистики с использованием пакета программ «Microsoft Excel». Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Через 3 нед. воздействия CCl_4 и этанола у животных I группы повысилась активность ферментов АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ соответственно на 94, 141, 83 и 134% по сравнению с интактным контролем (III группа) (табл. 1). Через 6 нед. эксперимента значительно возросли уровни ферментов АСТ, ЩФ по сравнению с 3-й неделей (соответственно на 27 и 89%), а с аналогичными показателями интактного контроля – до 200%. Активность ферментов АЛТ и ЛДГ через 6 нед. эксперимента оставалась на прежнем уровне. В течение восстановительного периода у животных I группы уровни АЛТ и ЛДГ оставались значительно повышенными по сравнению с аналогичными показателями интактного контроля (см. табл. 1). С помощью метода щелочной диссоциации у животных I группы выявлено уменьшение на 70% концентрации ядер гепатоцитов и их абсолютной численности. Двуядерные гепатоциты составили 0,87% от всей популяции клеток паренхимы (табл. 2), что свидетельствовало о низком уровне регенерации (в интактном контроле доля двуядерных гепатоцитов равнялась 14,5%) (см. табл. 2). Через 6 нед. концентрация ядер гепатоцитов, их абсолютное число и популяция двухдерных гепатоцитов оставались без существенной динамики. В течение восстановительного периода происходило увеличение концентрации ядер, абсолютного числа гепатоцитов и популяции двуядерных клеток (см. табл. 2), что, возможно, связано с включением естественных механизмов регенерации.

При светооптическом исследовании печени у животных I группы через 3 нед. эксперимента определялись следующие типы поражения гепатоцитов: диффузная мелко- и крупновезикулярная липидная инфильтрация, гидропическая дистрофия, являющиеся маркерами токсического и алкогольного воздействия [7]. Крупные капли липидов оттесняли на периферию ядра клеток, которые принимают перстневидную форму. В части гепатоцитов отмечалось слияние капель жира, что сопровождалось некрозом клеток и формированием внеклеточных жировых кист. Мелкоочаговые некрозы гепатоцитов локализовались в перипортальных и центролобулярных зонах, по их периферии регистрировалась лимфоцитарная инфильтрация; фиброз развивался по периферии печеночных балок. Синусоиды были заполнены фибрином и некротизированными гепатоцитами. Перипортально отмечалось большое количество сидерофагов. К 6-й неделе эксперимента у всех животных наблюдалось развитие портопортального и портоцентрального фиброза с пролиферацией желчных капилляров и прогрессированием к 8-й неделе в цирроз смешанного типа (крупно- и мелкоузловой).

На основании этого можно сделать вывод о развитии у всех животных тяжелого токсического поражения печени с исходом в цирроз смешанного типа.

При введении животным АБК (II группа) выявлена положительная динамика изменений активности ферментов. Через 3 нед. эксперимента уровни АЛТ и АСТ были снижены на 42% по сравнению с I группой. Уровни ЩФ и ЛДГ были существенно ниже, чем в I группе, но превышали эти значения соответственно на 11 и 103% по сравнению с интактным контролем (см. табл. 1). Через 6 нед. отмечалось дальнейшее снижение уровней ферментов АСТ, АЛТ, ЩФ по сравнению с I группой, лишь значения ЛДГ оставались повышенными (см. табл. 1). У животных, получавших АБК, через 8 нед. наблюдалось восстановление до нормы уровня прямого билирубина, активности ЩФ, ЛДГ и АЛТ (см. табл. 1). Концентрация ядер гепатоцитов и их абсолютное число существенно увеличились лишь через 6 нед. (соответственно на 7 и 54%) (см. табл. 2). Доля двуядерных гепатоцитов через 3 и 6 нед. эксперимента достоверно не отличалась от таковой в I группе (см. табл. 2). Через 8 нед. отмечен рост популяции двуядерных гепатоцитов в данной группе до 7,1%, тогда как в I группе (воздействие CCl_4 и этанола) этот показатель составил всего 1,8% (см. табл. 2). Увеличение концентрации ядер и абсолютного числа гепатоцитов на фоне применения АБК свидетельствовало о стимуляции регенераторной способности печени.

Таблица 1

Влияние аланинамида бетулоновой кислоты на биохимические показатели крови крыс на фоне токсического гепатита (M±m)

Экспериментальная группа	Срок эксперимента (нед)	Общий белок, г/л	Билирубин прямой, мкмоль/л	Глюкоза, моль/л	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	ЩФ, Ед/л	ЛДГ, Ед/л
I группа – введение CCl_4	3	87,5±12,2*	21,3±10,9	5,6±0,3	216,6±41,3**	400,4±151,3*	719,8±232,7*	1460,3±184**
	6	97,02±5,9**	13,97±6,0	5,0 ±0,9*	202,35±41,0**	508,3±85,2**	1356,0±465,2**	1336,5±101,6**
	8	98,32±8,1**	2,75±1,2**	6,9 ±0,3*	221,97±22,6**	296,9±29,9**	940,2±105,3**	1845,3±259,7**
II группа – введение аланинамида бетулоновой кислоты	3	82,0±8,4	11,6±2,4	6,0±0,3	128,3±11,7##	233,8±27,4	435,0±49,3#	1266,1±57,4
	6	85,5±7,4#	20,7±1,5#	8,5±0,5##	78,9±5,5##	164,9±8,4##	317,6±26,7##	1414,0±68,4
	8	103,6±7,9	5,8±1,8##	5,2±0,4##	107,7±15,4##	217,7±20,7##	285,5±32,2##	583,3±113,3##
III группа – интактный контроль	8	64,8±2,2	8,9±3,04	6,2±0,4	111,4±11,7	165,9±27,2	393,2±83,0	623,5±230,9

Примечание.
*; ** – $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ – при сравнении с интактным контролем;
#; ## – $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ – при сравнении с введением CCl_4.

Таблица 2

Влияние аланинамида бетулоновой кислоты на популяционную динамику гепатоцитов при токсическом гепатите (M±m)

Экспериментальная группа	Срок эксперимента (нед)	Число ядер гепатоцитов в 1 мг ткани ($\cdot 10^3$)	Абсолютное число ядер гепатоцитов ($\cdot 10^6$)	Абсолютное число гепатоцитов ($\cdot 10^6$)	Абсолютное число одноядерных гепатоцитов ($\cdot 10^6$)	Абсолютное число двуядерных гепатоцитов ($\cdot 10^6$)
I группа – введение CCl_4	3	35,1±0,7**	398,4±32,1**	394,9±33,5**	391,5±34,8	3,4±1,5
	6	64,7±3,6**	486,2±94,3**	466,1±89,8**	445,9±85,6	20,1±6,9
	8	44,8±7,6**	595,1±116,9**	584,0±115,9**	573±115,0	11,0±3,7
II группа – введение аланинамида бетулоновой кислоты	3	43,04±3,4##	404,7±38,1	400,4±38,89	396,0±39,7	4,3±1,8
	6	66,6±4,9	742,2±81,7##	719,1±77,4##	696,0±73,8	23,1±8,1
	8	81,34±6,4##	745,2±54,5#	695,5±49,2	645,7±44,7	49,8±8,0
III группа –интактный контроль	8	115,7±4,70	1252,8±49,3	1093,9±45,7	935,0±42,7	158,9±6,00

Примечание.
*; ** – $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ – при сравнении с интактным контролем;
#; ## – $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ – при сравнении с введением CCl_4.

При световой микроскопии у животных на фоне введения АБК отмечалась положительная динамика морфологических изменений печени на всех этапах эксперимента (3, 6, 8 нед.). В гепатоцитах выявлялась очаговая гидропическая, клеточно-инволютивная дистрофия и лишь у отдельных животных – очаговая мелковезикулярная липидная инфильтрация. На 3-й неделе эксперимента фиброзная ткань локализовалась преимущественно перипортально и в виде тонких портопортальных тяжей. В просвете синусоидов выявлялись скопления купферовских клеток. Через 6 и 8 нед. эксперимента признаки фиброза, цирроза и перестройки печеночных балок не выявлены.

Заключение

При длительном энтеральном применении АБК купирует признаки как холестаза, так и цитолиза, увеличивает регенераторный потенциал гепатоцитов, полностью предотвращает развитие фиброза и цирроза печени при токсическом воздействии CCl_4 и этанола. Полученные результаты расширяют спектр фармакологической активности агента и позволяют рекомендовать АБК для дальнейшего исследования в качестве высокоактивного гепатопротектора.

Список литературы

1. Эффективность бетулоновой кислоты и ее аланинамидных производных при восстановлении паренхимы печени крыс в постцитостатический период / О.Р. Грек, С.В. Позднякова, А.П. Надеев, В.С. Пронин, Н.А. Жукова, И.В. Сорокина, Е.Б. Волкова, Т.Г. Толстикова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68, № 6. – С. 49–51.

2. Влияние бетулоновой кислоты и ее производного [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислоты на структуру печени мышей с лимфосаркомой RLS / Н.А. Жукова, Д.Е. Семенов, И.В. Сорокина, Т.Г. Толстикова, С.В. Позднякова, Грек О.Р. // Бюл. экспер. биол. – 2005. – Т. 140, № 9. – С. 348–350.

3. Влияние производных бетулина на структуру почки при лимфоме RLS / Н.А. Жукова, Д.Е. Семенов, И.В. Сорокина, Т.Г. Толстикова, С.В. Позднякова, О.Р. Грек // Сиб. науч. вестн. – 2006. – Вып. XI. – С. 49–51.

4. Морфологические изменения печени животных с перевитой карциномой легких Lewis при коррекции бетулоновой кислотой и её производными / Н.А. Жукова, И.В. Сорокина, Т.Г. Толстикова, Д.Е. Семенов // Бюл. Сибирского отд. РАМН. – 2008. – № 6. – С. 113–118.

5. Влияние бетулоновой кислоты и ее производных на морфологию почек животных с перевитой карциномой легких Льюис на фоне полихимиотерапии и без ее воздействия / Н.А. Жукова, И.В. Сорокина, Т.Г. Толстикова, М.П. Долгих, Д.Е. Семенов // Химия в интересах устойчивого развития. – 2010. – Т. 18, № 4. – С. 483–488.

6. Структура печени мышей с перевитой карциномой легких Льюис при полихиомиотерапии и коррекции бетулоновой кислотой и ее производными / Н.А. Жукова, И.В. Сорокина, Т.Г. Толстикова, Е.Л. Лушникова, Л.М. Непомнящих, Д.Е. Семенов // Бюл. экспер. биол. – 2010. – Т. 150, № 7. – С. 108–112.

7. Непомнящих Д.Л., Айдагулова С.В., Непомнящих Г.И. Биопсия печени: патоморфогенез хронического гепатита и цирроза. – М.: Изд-во РАМН, 2006. – 367 с.

8. Оковитый С.В. Клиническая фармакология гепатопротекторов // Фарминдекс Практик. Гепатология. – 2002. – Вып. 3. – С. 34–42.

9. Изучение влияния бетулоновой кислоты и ее амидных производных на рост и метастазирование перевиваемых опухолей у мышей / И.В. Сорокина, Н.А. Жукова, Т.Г. Толстикова, С.В. Позднякова, О.Р. Грек, Н.А. Попова, В.И. Каледин, В.П. Николин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. – № 1. – С. 29–31.

10. Терпеноиды ряда лупана как перспективные для медицины биологически активные агенты. Часть 1. Нативные производные лупана / Т.Г. Толстикова, И.В. Сорокина, Г.А. Толстиков, А.Г. Толстиков, О.Б. Флехтер // Биоорганическая химия. – 2006. – Т. 32, № 1. – С. 42–55.

11. Терпеноиды ряда лупана как перспективные для медицины биологически активные агенты. Часть 2. Полусинтетические производные лупана / Т.Г. Толстикова, И.В. Сорокина, Г.А. Толстиков, А.Г. Толстиков, О.Б. Флехтер // Биоорганическая химия. – 2006. – № 3. – С. 291–307.

References

1. Grek O.R., Pozdnyakova S.V., Nadeev A.P., Pronin V.S., Zhukova N.A., Sorokina I.V., Volkova E.B., Tolstikova T.G. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2005. no. 6. pp. 49–51.

2. Zhukova N.A., Semenov D.E., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Pozdnyakova S.V., Grek O.R. *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*. 2005. no. 9. pp. 348–350.

3. Zhukova N.A., Semenov D.E., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Pozdnyakova S.V., Grek O.R. *Sibirskii nauchny vestnik*. 2006. Issue XI. pp. 49–51.

4. Zhukova N.A., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Semenov D.E. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya RAMS*. 2008. no. 6. pp. 113–118.

5. Zhukova N.A., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Dolgikh M.P., Semenov D.E. *Khimia v interesakh ustoichivogo razvitiya*. 2010. no. 4. P. 483–488.

6. Zhukova N.A., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M., Semenov D.E. *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*. 2010. no. 7. pp. 108–112.

7. Nepomnyashchikh D.L., Aidagulova S.V., Nepomnyashchikh G.I. *Biopsiya pecheni: patomorfogenez khronicheskogo gepatita i tsirroza* [Liver biopsy: Pathomorphogenesis of chronic hepatitis and cirrhosis]. Moscow: Publishing House RAMS, 2006. 367 p.

8. Okovity S.V. *Farmindeks Praktik. Gepatologiya*. 2002. Issue 3. pp. 34–42.

9. Sorokina I.V., Zhukova N.A., Tolstikova T.G., Pozdnyakova S.V., Grek O.R., Popova N.A., Kaledin V.I., Nikolin V.P. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii*. 2006. no 1. pp. 29–31.

10. Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Tolstikov G.A., Tolstikov A.G., Flekhter O.B. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2006. no 1. pp. 42–55.

11. Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Tolstikov G.A., Tolstikov A.G., Flekhter O.B. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2006. no. 3. pp. 291–307.

Рецензенты:

Поляков Л.М., д.м.н., профессор, зав. лабораторией медицинской биотехнологии и зам. директора по научной работе Научно-исследовательского института биохимии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск;

Любарский М.С., д.м.н., зав. отделом клинической морфологии и заместитель директора по научной работе Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 30.03.2012.