

ХАЛЬЗОВА
Мария Сергеевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ ПРИ
ДЕЙСТВИИ ВЕЩЕСТВ С ЦИТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЛБК-527 И
ЛХТ-8-16 НА ФОНЕ ОСТРОГО АЛКОГОЛЬНОГО
ПОВРЕЖДЕНИЯ**
(экспериментальное исследование)

14.03.02 – патологическая анатомия

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» Минобрнауки России

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

доктор медицинских наук, доцент

КОГАН Евгения Алтаровна

БЛИНОВА Екатерина Валериевна

Официальные оппоненты:

Воронина Татьяна Александровна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», лаборатория психофармакологии, заведующая лабораторией;

Рогов Константин Аркадьевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Институт морфологии человека», центральная патологоанатомическая лаборатория, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.040.01 в ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Салтыков Борис Борисович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность избранной темы

Алкогольная болезнь печени (АБП), наряду с вирусными гепатитами, относится к числу наиболее актуальных проблем современной гепатологии (Королева М.В., 2015). Ежегодно от заболеваний печени, обусловленных алкоголем, в развитых странах Запада умирает около 2 млн. человек (Лопаткина Т.Н., 2015). В США 40% летальных исходов при циррозе печени обусловлены алкогольной этиологией заболевания (Kafrouni M.I. et al., 2009).

Патогенез алкогольного поражения печени многофакторный и включает в себя токсическое действие этанола и продуктов его метаболизма, цитокин-индуцированное повреждение гепатоцитов, обусловленное активацией клеток Купфера кишечными эндотоксинами, аутоиммунное повреждение вследствие формирования неоантигенов, включающих продукты метаболизма этанола, и развивающееся при злоупотреблении алкоголем нарушение питания (Еремина Е.Ю., 2014).

Избыточное употребление алкоголя вызывает целый спектр патологических процессов в печени, среди которых алкогольный стеатоз наблюдается практически у всех лиц, потребляющих в сутки 40 граммов и более чистого этилового алкоголя. Помимо стеатогепатоза алкогольная болезнь печени включает континуум частично переходящих один в другой патологических процессов с различной степенью воспаления и прогрессирующего фиброза у 10-35% алкоголиков и цирроза печени у 10-15% злоупотребляющих спиртным (Massey V.L., Arteel G.E., 2012).

Большую озабоченность вызывает рост заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой лиц с АБП, у которых цирроз трансформируется в рак печени в 1-2% ежегодно (Best J. et al., 2013). Особенности АБП является то, что стеатоз и алкогольный гепатит, в меньшей степени фиброз печени до стадии цирротической трансформации, являются обратимыми состояниями, достигаемыми стойким отказом от спиртного и проведением гепатопротекторной лекарственной терапии, тогда как фулминантный алкогольный стеатогепатит, декомпенсированный цирроз и рак печени имеют крайне неблагоприятный прогноз.

Клеточные и молекулярные механизмы алкогольного поражения печени до настоящего времени остаются не до конца изученными, однако накопленный опыт позволяет утверждать, что заболевание формируется в результате взаимодействия комплекса поведенческих и генетических факторов с факторами окружающей среды. Гистологические маркеры АБП – стеатоз, воспаление и фиброз – есть итог последовательности патофизиологических событий при продолжающемся патогенном воздействии алкоголя на организм. Ключевым компонентом эволюции клинических патологических форм АБП является прямое цитотоксическое действие основного метаболита, образующегося в процессе деградации алкоголя, – ацетальдегида (Yao H. et al., 2017).

Современный арсенал лекарственных средств, обладающих протективным воздействием на печень при ее повреждении различной этиологии, довольно широк и включает как лекарственные формы растительного происхождения, так и синтетические лекарственные средства. Однако, ряд ограничений, свойственных одним препаратам, недостаточно высокая эффективность других, - делает проблему поиска потенциально эффективных новых фармакологических веществ, воздействующих на молекулярные и клеточные мишени, чрезвычайно актуальной.

Степень разработанности проблемы

Гистологическая картина острого алкогольного поражения печени характеризуется различной степенью выраженности стеатоза, воспалительным инфильтратом, состоящим из полиморфноядерных лейкоцитов, жировой дистрофией централобулярных гепатоцитов, появлением телец Мэллори и фиброза (Cesaratto C., 2004). Ключевая патогенетическая ось проходит по направлению кишечник – печень. Установлено, что употребление алкоголя ведет к прямому цитотоксическому действию продуктов обмена этанола на гепатоцит, а также эндотоксин-опосредованной активации CD14 клеток Купфера, с последующей индукцией MyD88-независимого сигнального пути при участии TLR4, продукцией провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) с последующим повреждением ткани печени (Cesaratto C. et al., 2004; Gavala A. et al., 2015; Yao H., 2017). В процесс активации воспаления в печени, рекрутинга мезенхимальных клеток и фиброгенеза вовлекаются системы провоспалительных цитокинов и хемокинов, важнейшую роль среди которых играют ИЛ-1, ИЛ-8, ИЛ-17, хемокины (ХК)-1, -4, -5 и ХК-6 (Cesaratto C., 2004; Gavala A. et al., 2015).

Среди широкого спектра молекул, обладающих цитопротекторной активностью, особое внимание уделяется соединениям 2-аминоэтансульфоновой и липоевой кислот, а также производным карбоновых и аминокислот, таким как деанола ацеглумат (Блинов Д.С. и соавт., 2012; Блинова Е.В. и соавт., 2016). В ранее проведенных исследованиях у упомянутых соединений описаны стресс-протекторное, антиишемическое, противовоспалительное, церебропротекторное действие. Доказанные механизмы развития отмеченных эффектов, среди которых антирадикальная активность, делают их перспективными с точки зрения возможного гепатотропного действия.

Цель работы

Изучить гепатопротекторное действие соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты и фармацевтической композиции альфа-липоевой кислоты и деанола ацеглумата при остром алкогольном повреждении органа на основе комплексного исследования макро- и микроструктуры печени, активности свободнорадикальных и биохимических процессов сыворотки крови, уровня про- и противовоспалительных цитокинов и экспрессии регуляторов апоптоза и клеточной пролиферации в ткани печени.

Задачи исследования

1. Исследовать влияние курсового внутрижелудочного введения соединения ЛБК-527 на макро- и микроструктуру печени крыс, а также экспрессию регуляторов апоптоза (Вс1-2, каспаза-3) и пролиферацию (Ki-67, PCNA) на фоне токсического воздействия этанола, оценить характер и тяжесть патологических изменений органа в зависимости от дозы фармакологического средства.

2. Изучить активность тканевых и системных свободнорадикальных процессов, антиокислительного потенциала паренхимы печени крыс, тканевого содержания ключевых цитокинов, а также некоторых биохимических показателей, отражающих функциональное состояние органа, на фоне формирующегося острого алкогольного повреждения и профилактического введения магнийсодержащего протектора ЛБК-527.

3. Изучить макро- и микроскопические изменения печени животных на фоне острого воздействия токсических доз этилового спирта и профилактического курсового введения фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 в различных дозах и ее влияние на апоптотическую готовность клетки (Вс1-2, каспаза-3) и процессы регенерации (Ki-67, PCNA).

4. Изучить влияние курсового введения фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 на тканевые процессы перекисного окисления липидов, функциональное состояние органа, а также тканевое содержание ФНО-альфа, ИЛ-10 и фактора роста гепатоцитов у животных с острым алкогольным повреждением.

5. Сравнить влияние курсового введения фармацевтической композиции ЛХТ-8-16, вещества ЛБК-527, и гепатопротекторного препарата S-аденозин-L-метионина на макро- и микроструктуру печени, выраженность апоптоза и пролиферационной активности гепатоцитов, тканевые и системные свободнорадикальные процессы, антиокислительный потенциал паренхимы печени крыс, тканевое содержания ключевых цитокинов, а также некоторые биохимические показатели на фоне токсического воздействия этанола на печень.

Научная новизна

Алкоголь-индуцированная активация свободнорадикальных процессов в печени на фоне подавления антиоксидантного потенциала, повышение тканевой концентрации ФНО-альфа и ФРГ наряду со снижением уровня ИЛ-10 обуславливают формирование прямой цитотоксической реакции, цитолитического и холестатического синдромов, нарушения пигментной функции органа. Повышение экспрессии каспазы-3 и снижение количества Вс1-позитивно окрашенных гепатоцитов на фоне отсутствия клеток, экспрессирующих ядерные факторы Ki-67 и PCNA, свидетельствует об активации на фоне острой алкогольной нагрузки животных апоптоза гепатоцитов и подавления процессов клеточной регенерации. Все вышеописанные процессы могут рассматриваться как патологические мишени для лекарственных средств с цитопро-

текторной активностью.

Впервые показано, что внутрижелудочное курсовое введение магнийсодержащего соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛБК-527 и фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 в дозах, пропорциональных 5 и 2,5% от показателя ЛД₅₀, определенного при данном пути введения, ведет к сохранению макроструктуры органа, долькового строения и балочной структуры паренхимы печени, профилактике гибели печеночных клеток (отсутствие некроза или минимальный некроз по шкале Кноделя), снижению интенсивности дистрофии гепатоцитов преимущественно центра дольки и ослаблению активности воспаления. Гепатопротекторное действие вещества ЛБК-527 и фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 на фоне формирования экспериментального острого алкогольного поражения печени проявляется в профилактике алкоголь-опосредованного цитолиза и холестаза и обусловлено подавлением свободнорадикальной активности паренхимы органа с пропорциональной активацией антиокислительного потенциала ткани. Установлено, что соединение ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут в большей степени, чем ЛХТ-8-16, снижает тканевую концентрацию ФНО-альфа, восстанавливает до уровня интактных животных содержание противовоспалительного ИЛ-10, повышает экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2 на фоне гипокспрессии каспазы-3 и активирует пролиферативный потенциал гепатоцитов (по уровню Ki-67 и PCNA) главным образом в области периферии печеночной дольки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Комплексное изучение гистологических проявлений острого повреждающего действия этилового спирта на печень, углубленное использование иммуногистохимических маркеров программируемой гибели клеток и их пролиферации, наряду с исследованием процессов свободнорадикальной липопероксидации и антиокислительного потенциала, концентрации регуляторных молекул в паренхиме органа и его функционального состояния позволяют расширить современные представления о ключевых элементах развития патологического процесса, структурной перестройки органа, определить важнейшие биологические мишени для возможного профилактического и лечебного воздействия.

Полученные результаты о молекулярно-клеточных механизмах протекторного действия магнийсодержащего соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты, а также фармацевтической композиции на его основе, являются основанием для проведения углубленного доклинического исследования фармакокинетики и фармакодинамики веществ, их безопасности при системном применении, разработки оптимальной лекарственной формы для приема внутрь в аспекте создания высокоэффективного отечественного гепатопротекторного лекарственного средства.

Методология и методы исследования

В качестве методологической основы исследования нами были взяты два фундаменталь-

ных источника – статья Dolganiuc and Szabo «In vivo and in vitro models of acute alcohol exposure» (2009) и «Методические рекомендации по изучению гепатопротективной активности лекарственных средств» А.И. Венгеровского и соавт. (2012). Модель острого алкогольного повреждения воспроизводили ежесуточным внутрижелудочным введением 40% раствора этилового спирта крысам в пересчете на 96% этанол в дозе 8 мл/кг веса животного в течение 7 суток.

Для изучения макроструктурных изменений печени осуществляли внешний осмотр органа, его взвешивание. Проводили гистологическое изучение парафиновых срезов печени, окрашенных гематоксилин-эозином, а также морфометрический анализ.

Для исследования процессов программируемой гибели гепатоцитов, состояния клеточной пролиферации использовали иммуногистохимический метод определения экспрессии Bcl-2, каспазы-3, PCNA и Ki-67.

Для исследования состояния ПОЛ в крови и ткани использовали методы определения ТБК-зависимых продуктов ПОЛ, активности каталазы, тканевого фермента-антиоксиданта СОД, с помощью метода индуцированной хемилюминисценции определяли общий антиоксидантный потенциал паренхимы печени. Уровень гиперферментемии, холестаза, концентрацию билирубина определяли с помощью автоматического биохимического анализатора с использованием стандартных биохимических методов. Тканевое содержание ФНО-альфа, ИЛ-10 и фактора роста гепатоцитов в печени изучали при помощи количественного ИФА.

Связь диссертации с основными научными темами университета

Диссертационное исследование выполнялось в рамках Программы развития ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» по приоритетному направлению 1 «Технологии и новые материалы».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Магниева соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты при внутрижелудочном введении в дозах, составляющих 5 и 2,5% от показателя ЛД₅₀, снижает формирование макро- и микроскопических, иммуногистохимических признаков острого поражения печени у крыс. Одновременно с этим наблюдается умеренный цитолитический синдром без признаков холестаза на фоне подавления системной и тканевой активности гидроперекисных процессов и повышения антирадикального потенциала печеночной ткани. В высшей терапевтической дозе 100 мг/кг в сутки вещество ЛБК-527 снижает продукцию ФНО-альфа, активирует синтез противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и фактора роста гепатоцитов.

2. Фармацевтическая композиция ЛХТ-8-16 обладает гепатопротекторными свойствами лишь при введении в высшей терапевтической дозе – 120 мг/кг, что подтверждают макро-, микроморфологические и иммуногистохимические изменения в ткани печени. Снижение гиперферментемии крови сопровождается сохранением холестатического синдрома и высокой интенсивностью тканевых процессов ПОЛ в печени, не компенсируемых ростом активности

ферментов-антиоксидантов. При этом умеренно снижается тканевая концентрации ФНО-альфа, и отмечается низкая активность композиции по стимуляции клеточной пролиферации.

3. При сравнительном анализе морфофункциональных проявлений гепатопротекторного действия исследуемых соединений с препаратом сравнения S-аденозил-L-метионина 1,4-бутандисульфонатом установлено, что ЛХТ-8-16 уступает препарату сравнения по своей активности, тогда как вещество ЛБК-527 сопоставимо с ним по влиянию на макро- и микроструктуру печени, не уступает по противовоспалительной активности и способности снижать биохимическую активность поражения печени, превосходит по антирадикальной и антиапоптотической активности и стимуляции пролиферации при введении в высшей терапевтической дозе, и может рассматриваться как альтернатива препарату сравнения в качестве средства патогенетической терапии острого алкогольного гепатита.

Внедрение результатов в практику

Научные результаты, представляющие высокую научную и практическую ценность, внедрены в образовательный и научно-исследовательский процесс учебных и научных подразделений Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва: включены в программу лекционного курса по дисциплине «Патологическая анатомия» для студентов, обучающихся по специальностям «Лечебное дело», «Педиатрия» и «Фармация»; используются при проведении лекционных и семинарских занятий с ординаторами и аспирантами, проходящими обучение на кафедре цитологии, гистологии и эмбриологии с курсом молекулярной биологии клетки, нормальной и патологической анатомии с курсом судебной медицины по профилям направления подготовки «Фундаментальная медицина» и «Клиническая медицина».

Результаты диссертационного исследования внедрены в работу научного семинара лабораторий лекарственной токсикологии и специфической активности Центра перспективных исследований инновационных лекарственных средств университета.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность описанных в диссертационном исследовании результатов, сделанных выводов определяется соответствием проведенной работы биоэтическим требованиям при работе с лабораторными животными, корректно проведенным обоснованием объема опытных и контрольных групп, применением традиционных, релевантных гистологических, фармакологических, биохимических, иммунологических и иммуногистохимических методов исследования с использованием современного научного оборудования исследовательского класса, прошедшего плановую поверку, грамотно осуществленным сбором, учетом, группировкой и сводкой данных, применением параметрических и непараметрических критериев, апробированных шкал оценки степени структурных изменений с доказанными чувствительностью и специфичностью.

Апробация результатов диссертационной работы проводилась на расширенном совместном заседании кафедр нормальной и патологической анатомии с курсом судебной медицины, фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, цитологии, гистологии, клеточной биологии с курсом молекулярной биологии клетки, факультетской хирургии, лабораторий Центра перспективных исследований инновационных лекарственных средств ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва», протокол №7 от 03.09.2018 г. Результаты диссертации заслушивались на совместном заседании кафедр патологической анатомии им. академика А.И. Струкова и оперативной хирургии и топографической анатомии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

Результаты исследований докладывались на XIII конгрессе международной ассоциации морфологов (Тюмень, 2016), XXIII и XXV Российских национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 2016, 2018), XIX Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016); V-VII Всероссийских студенческих научных форумах с участием молодых исследователей «Актуальные проблемы медицинских наук» (Саранск, 2016-2018); XVII Российском национальном конгрессе гастроэнтерологов (Санкт-Петербург, 2017).

Личный вклад автора

М.С. Хальзова сформулировала концепцию настоящего исследования, разработала дизайн и детальный план его проведения, лично осуществляла анализ отечественной и зарубежной научной периодики. Лично автором выполнены все эксперименты по воспроизведению острого алкогольного повреждения печени, введению лекарственных веществ. Автор принимала непосредственное участие в приготовлении гистологических препаратов, их изучении, проведении морфометрического анализа. Автор самостоятельно проводила биохимические исследования крови животных, а также иммуноферментный анализ гомогенатов печени. При деятельном участии автора проведено иммуногистохимическое исследование. Лично автором велись все записи исследования, сбор, группировка и статистическая сводка полученных результатов, и их математическая обработка. Автор принимала непосредственное участие в подготовке публикаций по теме диссертации. Ею написаны рукописи диссертации и автореферата.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 14.03.02 – Патологическая анатомия, области исследований «Исследование патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии», а также паспорту научной специальности 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология, области исследований «Поиск новых биологически активных фармакологических веществ среди природных и впервые синтезиро-

ванных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях патологических состояний.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, из них 5 оригинальных статей – в центральных рецензируемых изданиях и журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, из которых 2 статьи в изданиях, индексируемых международной системой цитирования Scopus; а также 1 патент на изобретение Российской Федерации.

Объём и структура работы

Диссертация изложена в традиционном стиле, включает введение, главу с описанием материалов и методов исследования, трех глав с изложением полученных результатов, главы «Заключение», в которой подведены итоги выполнения работы, очерчены перспективы дальнейшей разработки темы исследования, даны практические рекомендации, а также выводы.

Диссертация изложена на 149 страницах компьютерного текста, иллюстрирована двадцатью пятью рисунками и девятью таблицами. Библиографический список содержит 222 работ, из которых 18 – отечественных и 204 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Лабораторные животные и формирование экспериментальных групп. Исследование выполнено на 160 белых нелинейных крысах самцах (80 особей) и самках (80 особей) исходным весом 180-220 г, полученных в филиалах «Андреевка» и «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, в соответствии с требованиями приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными. Протоколы лабораторных экспериментов прошли этическую экспертизу на заседании Локального этического комитета Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (13 ноября 2017 года, протокол №56). Каждая группа включала по 20 крыс: по 10 самцов и 10 самок. Количество животных определяли в связи с большим объемом лабораторных и морфологических исследований и необходимостью получения достаточного количества биологического материала. При заборе материала в каждой экспериментальной группе животных случайным образом разделяли на две подгруппы по 10 особей в каждой (по 5 самцов и 5 самок). У крыс первой подгруппы забирали печень на приготовление блоков для микроскопического исследования и ИГХ, у крыс второй подгруппы извлеченную печень использовали для окрашивания суданом-III и проведения ИФА, а также определения активности ПОЛ. Кровь у животных первой подгруппы использовалась для биохимического исследования, в второй – для изучения системного ПОЛ.

Метод моделирования острого алкогольного повреждения печени. Для воспроизведения острого алкогольного повреждения печени использовали метод, описанный Dolganiuc and Szabo (2009) и А.И. Венгеровским и соавт. (2012). Половозрелой особи белой нелинейной крысы с помощью зонда G24, введенного на глубину 3,5-4,0 см через ротовую полость, внутрижелудочно вводили 40% водный раствор спирта этилового ректифицированного, приготовленный *ex tempore* и охлажденный до комнатной температуры, в дозе 8 мл 96% спирта на 1 кг веса тела. Общий объем вводимого раствора доводили дважды дистиллированной водой до 3 мл. Процедуру повторяли в течение 7 суток в одно и то же время (между 11 и 12 часами утра).

Лекарственные вещества, диагностические системы, антитела. В работе изучили морфофункциональные изменения печени под действием двух оригинальных лекарственных веществ в виде субстанций, наработанных в отделе химии и технологии синтетических лекарственных средств АО «ВНЦ БАВ» (Россия) и предоставленных нам для исследования. Первое вещество (лабораторный шифр – ЛБК-527) – магния бис-ацетаминоэтансульфоноат. Второе вещество является стабильной фармацевтической композицией деанола ацеглумата с альфа-липоевой кислотой (лабораторный шифр разработчика ЛХТ-8-16), в 1 г которой содержится по 250 мг каждого из действующих веществ. Разделы работы по изучению морфофункциональных изменений печени крыс выполнены с использованием в качестве препарата сравнения гепатопротектора S-аденозил-L-метионина 1,4-бутандисульфоната под коммерческим названием «Гептрал»[®] во флаконах, содержащих 760 мг лиофилизата действующего вещества, и ампулы по 5 мл с растворителем для внутривенного и внутримышечного введения, производства компании «Фамар Л’Эйль» (Франция, номер серии 79134ТВ22 со сроком годности до 09.2018). Исследуемые вещества животные получали внутрижелудочно ежедневно за 1 час до введения этанола в эквитоксических дозах, составляющих 5 и 2,5% от показателя ЛД₅₀, определенного для данного вида животных при указанном пути введения. Дозы составили: 100 и 50 мг/кг для ЛБК-527, 120 и 60 мг/кг для ЛХТ-8-16, и 60 и 30 мг/кг для препарата сравнения, в течение недели.

При изучении концентрации АСТ, АЛТ, ГГТП, ЩФ, общего белка, общего билирубина в сыворотке крови лабораторных животных использовали диагностические наборы «FUJI-FILM» (Япония). Для ИГХ исследования использовали кроличьи антитела к каспазе-3 (клон E87) (Genetex, разведение 1:100) и Bcl-2 (клон C21) (Santa Cruz, США), и мышинные антитела к Ki-67 (клон MM1) (Novo Castra, Великобритания) и PCNA (клон PC10) (Dako, разведение 1:100). Для определения концентрации цитокинов – ИЛ-10, ФНО-альфа и ФРГ использовали тест-системы, разработанные для исследовательских целей CUSABIO BIOTECH Co., LTD (США).

Методы исследования

При макроскопическом исследовании осуществляли взвешивание органа, расчет его относительной массы, описывали визуальную картину, включающую форму, размер, цвет,

внешнее состояние печеночной капсулы и краев органа, наличие видимых патологических изменений как на поверхности, так и на срезе.

Гистологические методы исследования. Гистологическую проводку биологического материала осуществляли в автоматическом режиме с использованием автоматической станции марки «STP-120» (типа «Карусель», производства Германии), последующую парафинизацию блоков также проводили автоматически, применяли систему «EC350» (производства Германии). Для приготовления микропрепаратов использовали ротационный микротом марки «HM340E» производства компании «Micom Laborgerate GmbH» (Германия). Из каждого парафинового блока изготавливали по 6-10 срезов толщиной 4-5 мкм. Окрашивание гематоксилином и эозином осуществляли по Хеллендахелю. Окрашивание суданом-III проводили по методу О.В. Волковой и Ю.К. Елецкого (1982) с использованием замороженных срезов свежей нефиксированной печени крыс и щелочного раствора судана-III.

Морфометрический анализ. Визуализацию изображений осуществляли с использованием светового микроскопа марки «OLYMPUS BX51» (Япония). Морфометрию срезов печени анализировали с помощью программы анализа изображений «Image Scope Color» и «cellSens Standart» (Россия). С этой целью проводили микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой «OLYMPUS XCOLYMPUS XC-30» (Япония) на базе микроскопа «OLYMPUS BX51» (Япония) при увеличении окуляра SWH x10 и объективов UP-LanFL x200, x400 (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе). Определяли среднюю площадь гепатоцитов и их ядер в мкм^2 , а также вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Осуществляли подсчет двухъядерных гепатоцитов. Применяли две полуколичественные системы анализа тяжести острого алкогольного поражения печени. Для оценки распространенности воспалительно-дистрофических реакций в паренхиме органа использовали оценочную шкалу Zhao et al. (2017). Для характеристики активности воспаления, вызванной воздействием токсических доз этилового алкоголя, пользовались гистологической шкалой Кноделя.

Иммуногистохимический метод исследования. Использовали парафиновые срезы толщиной 3-4 мкм, расположенные на стеклах, покрытых полилизинным слоем (Menzel-Glaser Polylysine Slides, Германия). Неокрашенные срезы от каждого случая обрабатывали с помощью стандартного метода иммуногистохимии с термической демаскировкой антигенов. Для выявления первичных антител, связавшихся с соответствующими антигенами, использовали универсальную полимерную систему Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Nichirei, Япония). Анализ ИГХ реакции производили в 6 полях зрения (по 3 поля из центрлобулярных и по 3 – из периферических отделов печеночной дольки) при увеличении x400. Для расчета доли каспаза-3-позитивных и Bcl-2-позитивных клеток подсчитывали количество гепатоцитов с окрашенной

цитоплазмой к общему числу клеток в исследуемых полях зрения и полученное отношение выражали в процентах. Для оценки ИГХ реакции на Ki-67, PCNA определяли индекс пролиферации, для чего подсчитывали количество позитивно окрашенных ядер гепатоцитов и клеток синусоид в полях зрения, определяли их отношение к общему числу ядер в исследуемых областях, и полученное отношение выражали в процентах.

Биохимические методы исследования. На 8-е сутки эксперимента в плазме крови животных, полученной из полости левого желудочка, всех контрольных и опытных групп изучали концентрацию АСТ, АЛТ, ГГТП, ЩФ, общего белка, общего билирубина сухим способом на автоматическом ветеринарном биохимическом экспресс-анализаторе FUJI-DRI-CHEM 4000ie производства компании FUJI-FILM (Япония).

Количественный ИФА. Методом количественного ИФА изучили концентрации ФНО-альфа, цитокина с противовоспалительной активностью – ИЛ-10, а также фактора роста гепатоцитов в гомогенатах печени крыс с применением ридера StatFax 4200 (США).

Исследование ПОЛ и антирадикальной активности в ткани печени проводили хемилюминесцентным методом на электрофотометре Emilit EL, а в плазме крови – путем определения активности каталазы и ТБК-зависимых продуктов ПОЛ.

Статистическая обработка данных. При сравнении количественных признаков проводили дисперсионный анализ для оценки нормальности распределения (ANOVA) с последующим использованием критериев оценки множественных сравнений Ньюмена-Кейлса или Даннета. Достоверность результатов сравнения качественных признаков оценивали с помощью непараметрического точного критерия Фишера. При изучении различий признаков до и после воздействия применяли критерий Уилкоксона при 5% уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Животные контрольной группы, получавшие токсические дозы алкоголя имели увеличенную, плотную, ярко-желтую как на поверхности, так и на разрезе, с красноватыми или окрашенными желчью участками печень, края органы были закруглены. При этом, как у самцов, так и у самок регистрировали рост веса печени, причем в группе самцов орган увеличивался в весе в среднем на 83%, а в группе самок – на 74% по сравнению с интактными животными соответствующего пола. Происходили и пропорциональные изменения показателя относительной массы органа (табл.1).

Микроскопическая картина алкогольного повреждения печени соответствовала явлениям гибели паренхиматозных клеток с формирующейся умеренной активностью воспалительного процесса по шкале Кноделя (табл. 2): отмечали полнокровие ткани с расширением сосудов и синусоид, явлением агрегации, сладжа эритроцитов и частичным внутрисосудистым гемолизом

эритроцитов. Дольчатое строение печеночной ткани размыто, печеночные балки дисконплексованы. Наблюдались центрлобулярные некрозы гепатоцитов.

Таблица 1

Значения абсолютной и относительной масс печени крыс ($M \pm SD$) с острым алкогольным поражением печени под действием исследуемых соединений

Исследуемая группа	Масса животного, г, самец/самка	Абсолютная масса, печени, г самец/самка	Относительная масса, печени, самец/самка
Интактные животные	195,2±10,6	5,9±0,7	0,026±0,002
	245,0±13,2	8,3±0,2	0,030±0,001
Контроль с ОАП	282,3±10,2*	10,8±0,3*	0,039±0,001*
	312,9±11,2	14,8±0,6*	0,047±0,001*
ОАП, АМ в дозе 60 мг/кг	260,3±12,6	7,8±0,5 ^A	0,031±0,002 ^A
	314,4±11,3	8,9±0,6 ^A	0,029±0,001 ^A
ОАП, АМ в дозе 30 мг/кг	273,7±10,4*	9,5±0,7* ^A	0,034±0,002* ^A
	322,8±9,8	11,3±0,5 ^A	0,035±0,002 ^A
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг	276,4±10,3*	8,3±0,5* ^A	0,030±0,001 ^A
	337,2±11,1*	10,7±0,5* ^A	0,031±0,001 ^A
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 60 мг/кг	284,7±8,6*	8,9±0,4* ^A	0,031±0,001 ^A
	315,4±10,5	11,3±0,3* ^A	0,035±0,001* ^A
ОАП, ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг	267,4±10,2	7,4±0,3 ^A	0,028±0,001 ^A
	302,6±10,4	8,8±0,4 ^A	0,027±0,002 ^A
ОАП, ЛБК-527 в дозе 50 мг/кг	278,2±11,6*	8,1±0,4* ^A	0,029±0,001 ^A
	314,5±9,7*	9,7±0,4 ^A	0,031±0,002 ^A

Примечание: АМ – S-аденозил-L-метионин; * - различия при сравнении с интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^A – различия при сравнении с группой контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (ANOVA, критерий Даннета)

Гепатоциты центра дольки с явлениями кариопикноза, кариолизиса, вакуолизации и лизиса цитоплазмы, свидетельствующие о формировании явлений дистрофии и цитолиза. При проведении гистохимического исследования у крыс контрольной группы регистрировали формирование смешанного (крупно- и мелкокапельного) стеатоза, преимущественно затрагивающие портальные тракты и перипортальные зоны (рис. 1).

Магниева соль 2-аминоэтансульфонової кислоти в обох изученных дозах сдерживало увеличение массы органа, наблюдаемое в контроле (табл. 1). А также уменьшало развитие дистрофических и воспалительных явлений в органе (минимальное воспаление или отсутствие такового по Кноделю) (табл. 2).

Гепатопротекторное действие соединения ЛБК-527 заметно снижало выраженность явлений жировой дистрофии, что проявлялось как в уменьшении доли подверженных патологическим изменениям гепатоцитов, так и площади цитоплазмы паренхиматозных клеток, занятых каплями жира (рис. 1). В совокупности с описываемыми феноменами статистически значимое

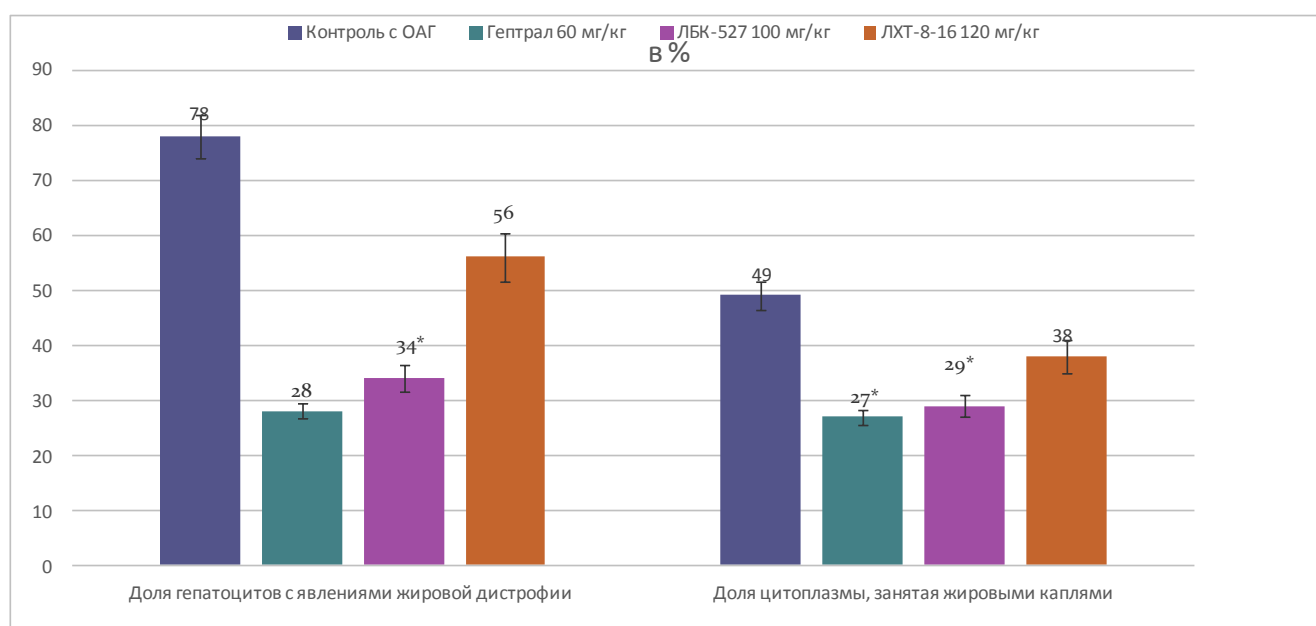
при сравнении с контролем увеличение доли двухъядерных гепатоцитов свидетельствовало об активации регенераторных механизмов в ткани органа.

Таблица 2

Значение индекса гистологической активности гепатита по Кноделю в группах крыс с острым алкогольным поражением под действием исследуемых соединений

Исследуемая группа	Активность воспаления			
	Отсутствует 0	Минимальная (1-4)	Небольшая (5-8)	Умеренная (9-12)
Интактные животные	10	-	-	-
Контроль с ОАП	-	-	-	10*
ОАП, АМ, 60 мг/кг	8 ^А	2	-	-
ОАП, АМ, 30 мг/кг	7 ^А	3	-	-
ОАП, ЛХТ-8-16, 120 мг/кг	8 ^А	2	-	-
ОАП, ЛХТ-8-16, 60 мг/кг	4*	6 ^А	1	-
ОАП, ЛБК-527, 100 мг/кг	10 ^А	-	-	-
ОАП, ЛБК-527, 50 мг/кг	9 ^А	1	-	-

Примечание: * - различия при сравнении с интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^А – различия при сравнении с группой контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (точный критерий Фишера)



Примечание: * - различия при сравнении с контролем с ОАП статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Даннета)

Рисунок 1 – Морфометрическая характеристика явлений жировой дистрофии печени крыс при остром алкогольном поражении и действии ЛБК-527 и ЛХТ-8-16

Для наиболее объективного суждения об активности процессов программируемой гибели гепатоцитов и регенераторно-пролиферативного потенциала паренхимы печени с использованием иммуногистохимического метода изучили уровень экспрессии активатора апоптоза кас-

пазы-3, антиапоптотического фактора Bcl-2, ядерных маркеров пролиферации Ki-67 и PCNA в препаратах печени крыс. На фоне формирования острого алкогольного повреждения происходило усиление экспрессии каспазы-3, свидетельствующее об активации апоптоза (рис. 2).

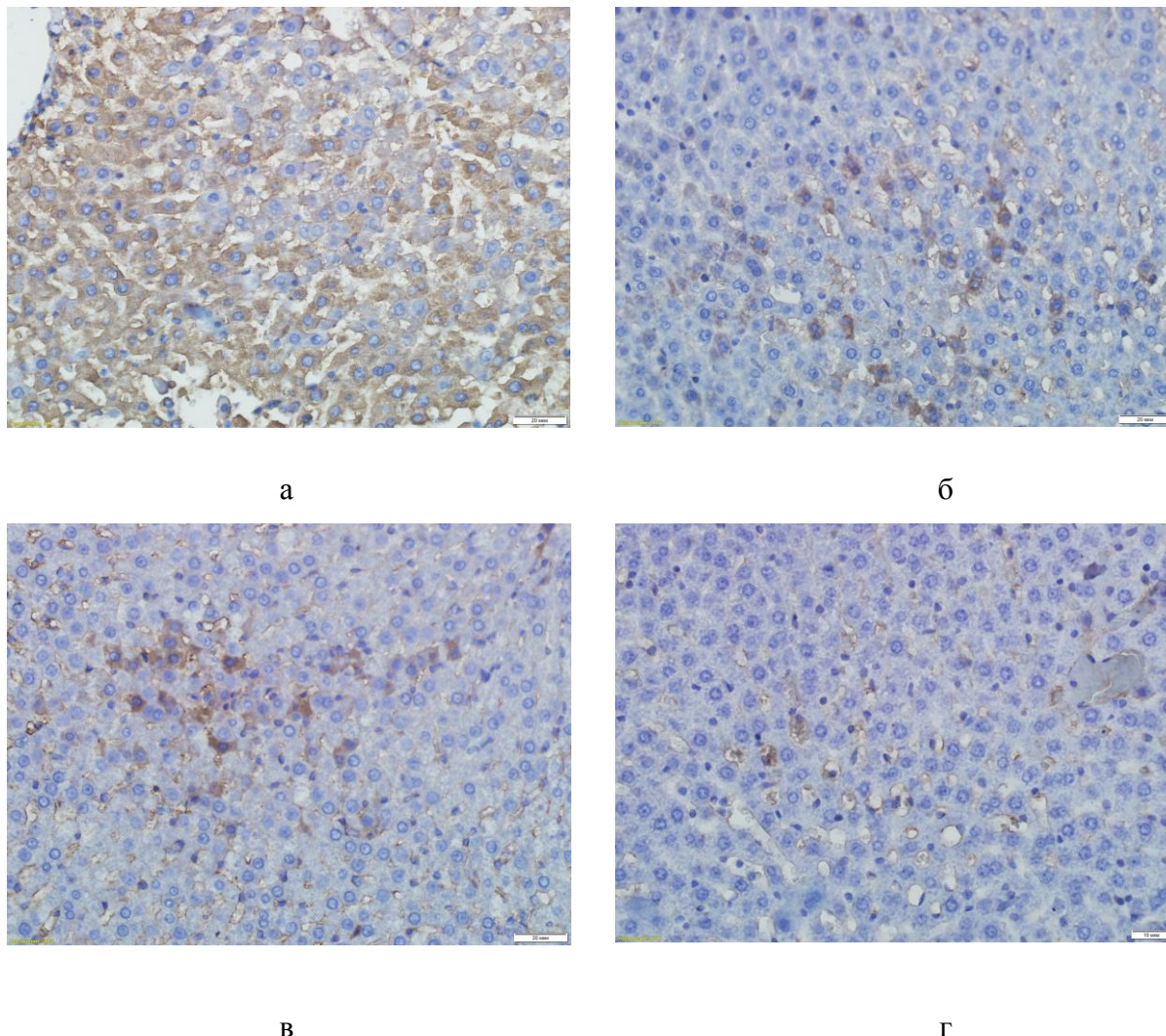


Рисунок 2 – Каспаза-3 в клетках печени (ув. 400): а) печень крысы с ОАГ (контроль); печень крысы с алкогольным процессом на фоне: б) АМ в дозе 60 мг/кг/сут; в) ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут; г) ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут; иммунопероксидазная реакция

Эффект ЛБК-527 проявлялся почти полным отсутствием окрашивания мембран и цитоплазмы гепатоцитов как в центральном отделе дольки печени, так и на периферии. При курсовом внутрижелудочном введении ЛБК-527 наблюдалась гиперэкспрессией антиапоптотического регуляторного маркера Bcl-2 в цитоплазме гепатоцитов (рис.3).

Алкогольная интоксикация приводила к умеренной экспрессии Ki-67, что может говорить о компенсаторной активации защитных механизмов ткани на фоне формирующихся некрозов и воспалительной реакции (рис.4). Экспрессию PCNA ни в центрлобулярных, ни в периферических отделах дольки печени мы не регистрировали.

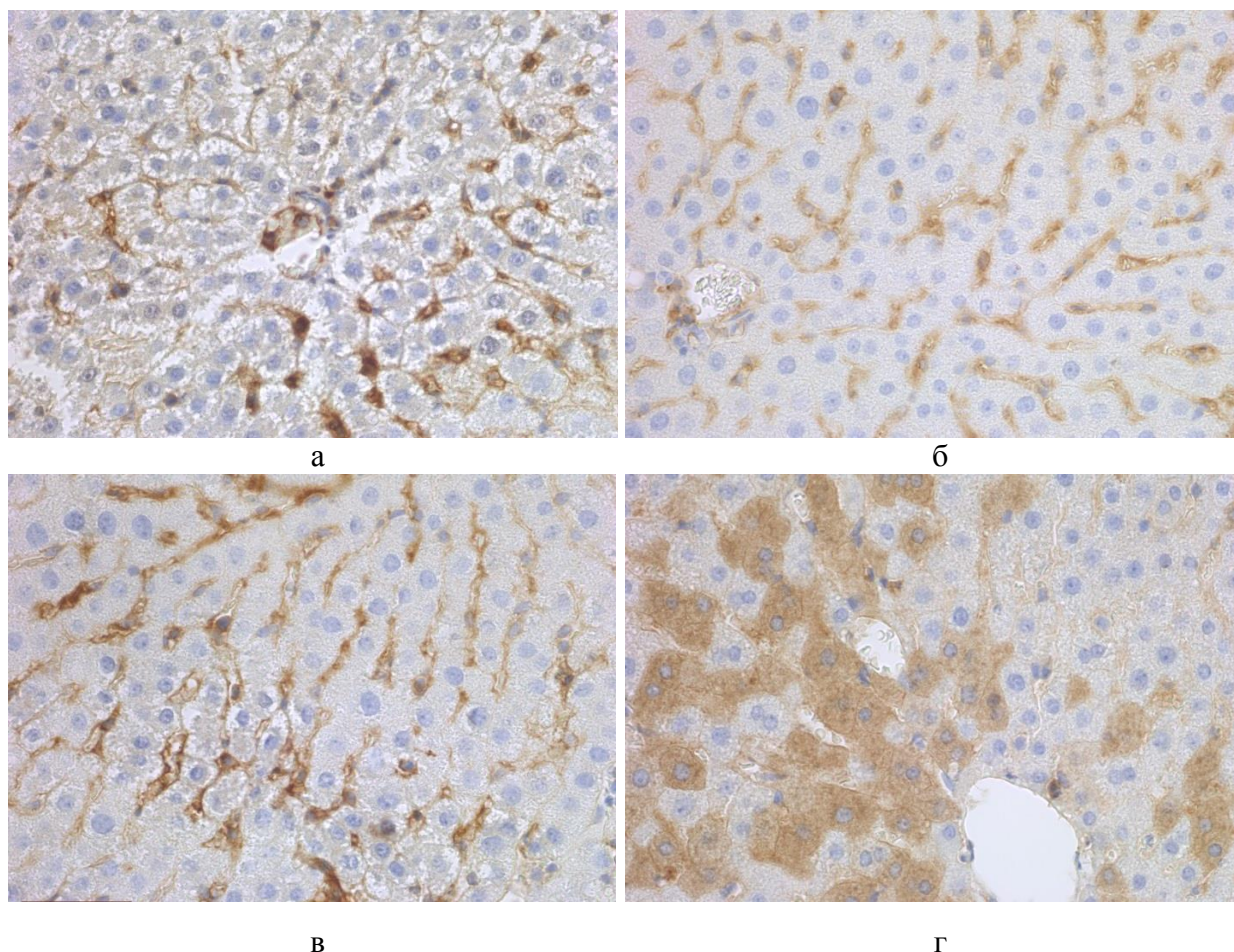


Рисунок 3 – Vcl-2 в клетках печени (ув. 400): а) печень крысы с ОАП (контроль); печень крысы с алкогольным процессом на фоне: б) АМ в дозе 60 мг/кг/сут; в) ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут; г) ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут; иммунопероксидазная реакция

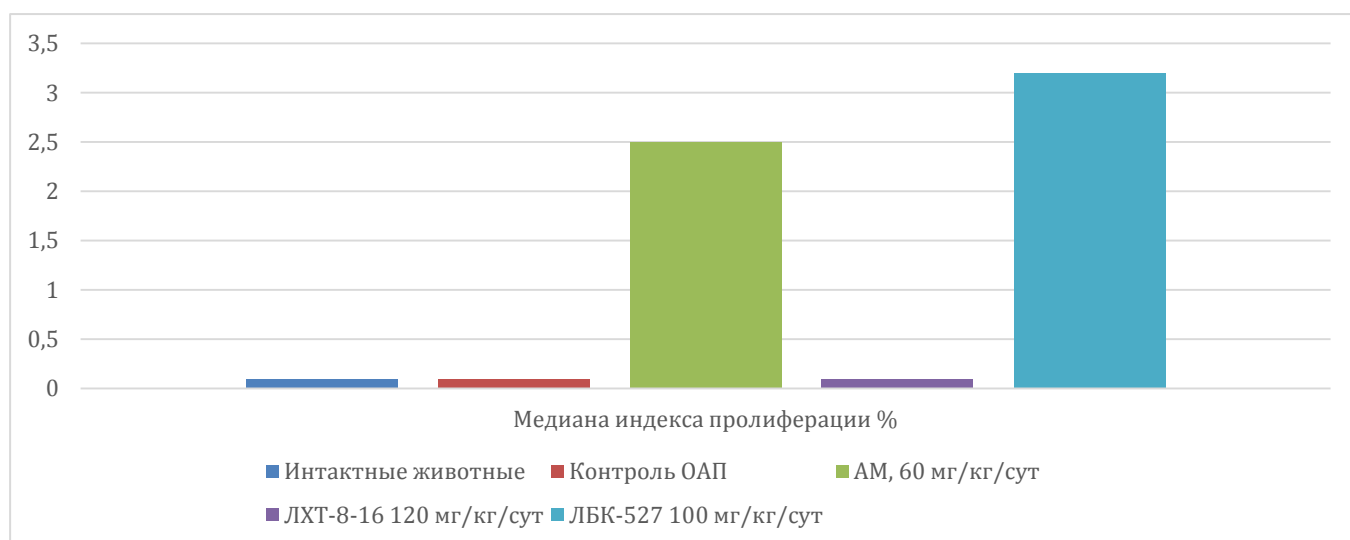


Рисунок 4 – Значение индекса пролиферации (по уровню экспрессии Ki-67) в печени крыс исследуемых групп

Профилактическое введение ЛБК-527 сопровождалось повышением экспрессии маркера пролиферации в перипоральных зонах дольки, что свидетельствует о наличии пролиферативного потенциала у данного соединения.

Острое алкогольное поражение печени характеризовалось значительным ростом сывороточной концентрации АСТ и АЛТ с одновременной элевацией ферментативной активности ГГТП, что свидетельствовало о формировании активного алкогольного гепатита с выраженным цитолитическим синдромом и коррелировало с результатами морфологического исследования (табл. 3). Рост концентрации общего билирубина в плазме периферической крови на фоне повышения активности ЩФ являлось подтверждением наличия холестатического синдрома.

Гепатопротекторные свойства ЛБК-527 проявлялись в значительном при сравнении с контролем снижении уровней аминотрансфераз на фоне заметного ослабления активности ГГТП. В исследуемых дозах соединение ЛБК-527 предотвращало рост ферментативной активности ЩФ и плазменной концентрации общего билирубина. Профилактика холестаза и значимое снижение ферментации внутриклеточных энзимов доказывало выраженный цитопротекторный эффект исследуемых веществ в отношении паренхиматозных клеток печени, причем у ЛБК-527 в обеих изученных дозах. Полученные результаты могут являться обоснованием утверждения о большей широте терапевтического действия ЛБК-527.

Внутрижелудочное курсовое введение магнийсодержащего производного 2-аминоэтансульфоновой кислоты в дозах 100 и 50 мг/кг/сут сдерживает алкоголь-зависимую активацию тканевого и системного ПОЛ (табл. 4), повышает активность локальных (по уровню активности СОД) и системных (по активности каталазы) антирадикальных механизмов, снижает активность цитолитического и холестатического синдромов и по силе фармакологического эффекта не уступают препарату сравнения S-аденозил-L-метионину.

Также в контроле регистрировали снижение сывороточной активности каталазы и тканевого уровня СОД на фоне значительного увеличения содержания продуктов ПОЛ в крови, что говорило о декомпенсации антиоксидантного потенциала. Наблюдалась депрессия общей антирадикальной активности печени на фоне роста интенсивности ПОЛ. Фармакологическое воздействие на печень животных веществом с цитопротекторной активностью и ЛБК-527 позволяет сдерживать повреждающее действие этанола в отношении как свободнорадикальных реакций, так и биохимических проявлений печеночного повреждения.

Методом количественного ИФА определили в гомогенате печени уровни ФНО-альфа, ИЛ-10 и ФРГ (рис. 5). Выбор данной панели цитокинов был обусловлен их критической ролью как в развитии алкоголь-индуцированного повреждения печени, так и в активации защитных – противовоспалительных и регенеративных реакций.

Таблица 3

Значения некоторых биохимических показателей функции печени (M±SD) на фоне острого алкогольного воздействия и введения исследуемых веществ

Группа	АСТ У/л	АЛТ У/л	Билирубин мкмоль/л	Общий белок г/л	ЩФ У/л	ГГТП У/л
Интактные животные	13,8±2,3	11,3±1,4	6,5±1,2	28,5±2,3	219,5±8,5	1,1±0,3
Контроль с ОАП	281,7±5,2*	69,1±2,2*	27,5±2,2*	23,25±3,7	293,6±6,1*	7,1±0,7*
ОАП, АМ в дозе 60 мг/кг	117,8±6,5 ^A	40,0±4,3 ^A	9,2±1,5 ^B	28,4±1,0	132,3±7,7 ^A	1,2±0,2 ^B
ОАП, АМ в дозе 30 мг/кг	155,7±4,3 ^A	46,7±3,9 ^A	11,8±1,5 ^A	31,6±1,9	207,1±5,6 ^B	2,3±0,2 ^A
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг	152,3±3,8 ^A	52,2±3,1 ^A	11,5±1,2 ^B	29,2±1,5	287,8±4,7*	1,5±0,2 ^B
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 60 мг/кг	216,3±8,3 ^A	60,7±4,8*	13,5±3,2 ^B	26,5±2,3	276,5±5,1*	3,2±0,5 ^A
ОАП, ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг	119,6±3,1 ^A	47,2±3,6 ^A	8,2±1,4 ^B	29,8±2,2	211,0±3,4 ^B	2,2±0,5 ^B
ОАП, ЛБК-527 в дозе 50 мг/кг	128,7±4,6 ^A	45,8±2,7 ^A	12,4±1,7 ^B	25,7±3,1	224,9±7,9 ^B	2,9±0,3 ^B

Примечание: * - различия при сравнении с группой интактных животных статистически достоверны при $p < 0,05$; ^A – различия при сравнении с группами интактных и контрольных животных статистически достоверны при $p < 0,05$; ^B – различия при сравнении с группой контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (одномерный дисперсионный анализ, критерий Даннета)

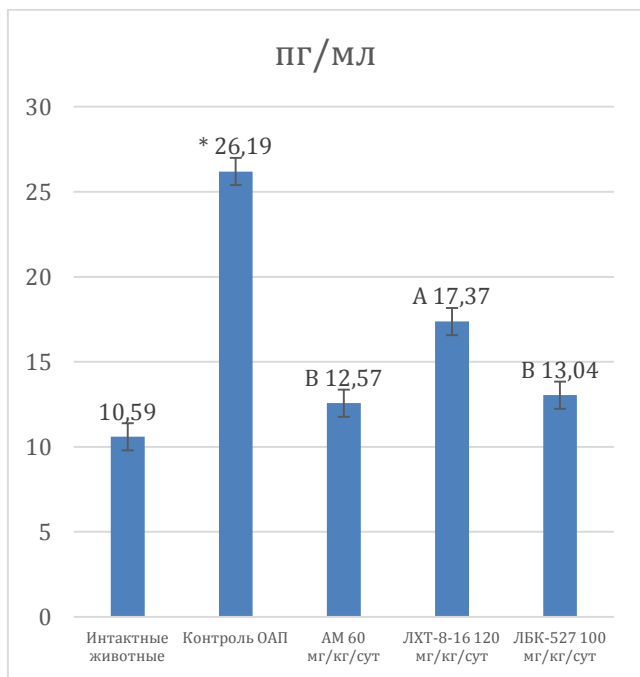
Показатели интенсивности световспышки ткани печени крыс

Интенсивность световспышки	Группа, доза вещества		M±SD, имп/с
Общая оксидативная активность печеночной ткани	Интактные животные		16,74±3,35
	Контроль ОАП		73,15±4,62*
	АМ	60 мг/кг	20,88±3,72 ^B
		30 мг/кг	48,53±4,12 ^A
	ЛХТ-8-16	120 мг/кг	47,35±2,65 ^A
		60 г/кг	64,17±5,52*
	ЛБК-527	100 мг/кг	28,41±3,14 ^B
		50 мг/кг	36,55±4,17 ^B
Общая антиоксидантная активность ткани печени	Интактные животные		15,96±2,13
	Контроль ОАП		6,54±1,15*
	АМ	60 мг/кг	17,68±1,46 ^B
		30 мг/кг	10,40±1,38 ^A
	ЛХТ-8-16	120 мг/кг	14,29±0,57 ^B
		60 мг/кг	8,08±0,43*
	ЛБК-527	100 мг/кг	18,29±1,57 ^B
		50 мг/кг	13,58±1,02 ^B

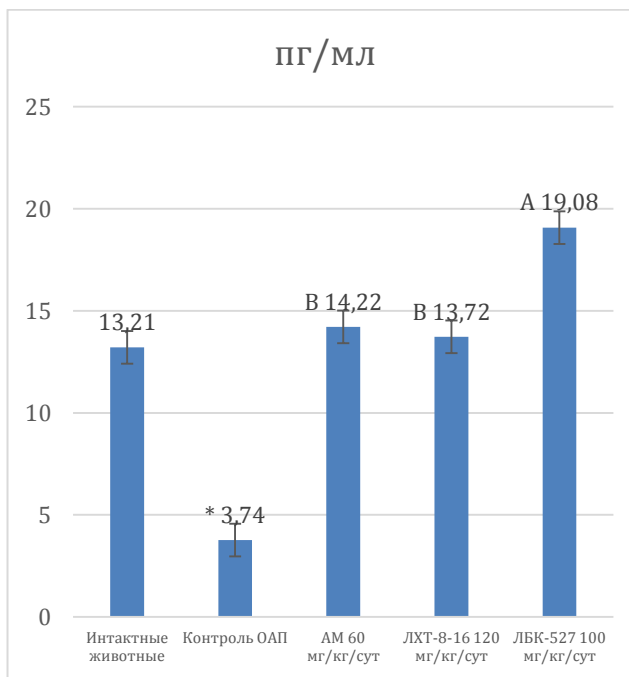
Примечание: * - различия при сравнении с интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^A – различия при сравнении с группой контроля и интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^B – различия при сравнении с группой контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (ANOVA, критерий Ньюмена-Кейлса)

У крыс контрольной группы наблюдали повышение тканевой концентрации ФНО-альфа более, чем в два с половиной раза на фоне почти четырехкратного снижения уровня ИЛ-10. При этом происходило пропорциональное увеличение концентрации фактора роста гепатоцитов, что было расценено нами как компенсаторная реакция по активации процессов гипертрофии клеток печени в ответ на алкоголь-индуцированную гибель гепатоцитов. Введение препарата сравнения, а также ЛБК-527 в высших дозах сопровождалось восстановлением уровня иммунного воспалительного триггера – ФНО-альфа до значений интактных животных. Также до уровня здоровых крыс восстанавливалось и тканевое содержание противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Введение ЛБК-527 приводило к еще большей активации гипертрофических процессов в органе, о чем свидетельствовало повышение содержания ФРГ выше уровня контрольных животных, тогда как композиция ЛХТ-8-16 ограничивалась некоторым снижением концентрации ФНО-альфа и восстановлением концентрации ИЛ-10 до уровня интактных животных.

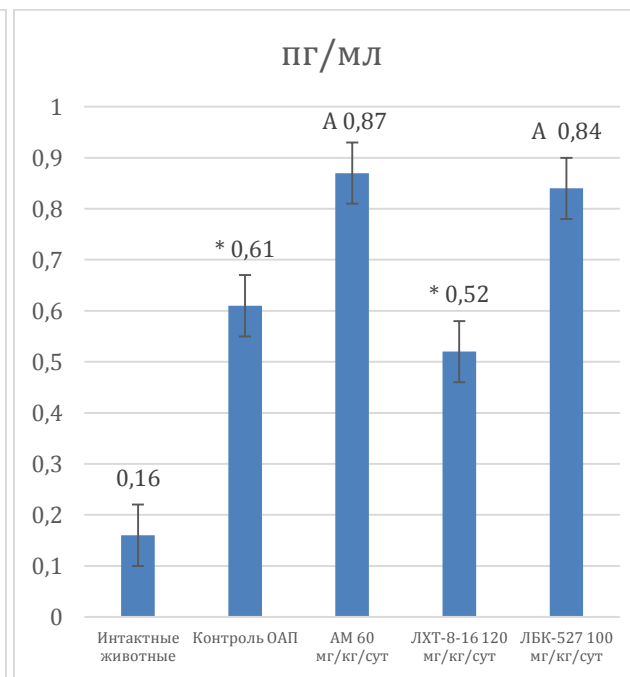
При изучении активности фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 в дозах 60 и 120 мг/кг, мы получили следующие результаты. Композиция ЛХТ-8-16 сдерживала рост абсолютной и относительной массы печени на фоне воздействия этанола при введении в высшей



ФНО-альфа



ИЛ-10



ФРГ

Примечание: * - различия при сравнении с интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^A – различия при сравнении с группой контроля и интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^B – различия при сравнении с группой контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (ANOVA, критерий Ньюмена-Кейлса)

Рисунок 5– Концентрация некоторых цитокинов в гомогенате печени при остром алкогольном повреждении на фоне соединений ЛБК-527 и ЛХТ-8-16

терапевтической дозе 120 мг/кг (табл. 1). При введении вещества в дозе 60 мг/кг масса печени, хотя и была меньшей, чем в контроле, но не достигала уровня интактных животных.

Дозозависимый характер гепатопротекторного действия композиции проявлялся и на микроструктурном уровне. Тканевая и клеточная реакция печени крыс на фоне введения ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг отличалась меньшей интенсивностью дистрофически-деструктивных процессов, большей сохранностью печеночной паренхимы, сохранением дольковой и балочной структуры печени, снижением интенсивности лейкоцитарной реакции (минимальная воспалительная реакция по шкале Кноделя) (табл. 2).

При снижении дозы выраженность патологических изменений значительно нарастала: встречались бесструктурные гепатоциты в виде мелкозернистых слабобазофильных масс, между которыми видны явления слабой или умеренной лейко- и лимфоцитарной инфильтрации.

При морфометрическом анализе препаратов, окрашенных суданом-III, также было видно, что композиция ЛХТ-8-16 в высшей дозе достоверно снижает долю гепатоцитов с жировыми включениями в цитоплазме и площадь цитоплазмы (рис. 1), занятой липидными каплями, тогда как на фоне введения ЛХТ-8-16 в дозе 60 мг/кг такого эффекта не наблюдали. Снижение активности цитолиза, наблюдаемое при введении композиции в высшей терапевтической дозе протекает на фоне сохраняющегося холестаза (табл. 3).

При проведении иммуногистохимического исследования было установлено незначительное влияние композиции на процессы апоптоза гепатоцитов и клеточной пролиферации: экспрессия каспазы-3 умеренно снижалась (рис. 2), тогда как площадь и интенсивность окрашивания микропрепаратов, обработанных антителами к Ki-67, Vcl-2 и PCNA не отличались от контроля (рис. 3, 4). Внутрижелудочное курсовое введение фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут умеренно сдерживает алкоголь-зависимую активацию тканевого и системного ПОЛ, что не компенсируется повышением активности локальных (по уровню активности СОД) и системных (по активности каталазы) антирадикальных механизмов (табл. 4).

Фармацевтическая композиция ЛХТ-8-16 также оказывала умеренное влияние на тканевые уровни исследуемых цитокинов: так, под действием композиции происходило снижение концентрации ФНО-альфа при сравнении с контрольными значениями, однако депрессия показателя не достигала уровня интактных животных. До интактных значений происходило восстановления концентрации в ткани печени ИЛ-10, тогда как содержание фактора роста гепатоцитов оставалось в рамках естественных компенсаторных реакций (рис. 5).

При анализе полученных результатов мы установили, что из двух исследуемых соединений наибольшей гепатопротекторной активностью, обладает вещество ЛБК-527, при этом по совокупности полученных результатов оно может рассматриваться как альтернатива препарату сравнения. В частности, ЛБК-527 не уступает препарату сравнения по силе противовоспалитель-

тельного эффекта и способности предотвращать стеатоз гепатоцитов, в то время как у композиции ЛХТ-8-16 установлена лишь умеренная активность. Магнийсодержащее производное 2-аминоэтансульфоновой кислоты превосходит препарат сравнения по активации антирадикальной активности в ткани печени и не уступает ему по способности сдерживать развитие цитолитического и холестатического синдромов в обеих вводимых дозах. ЛХТ-8-16 в суточной дозе 120 мг/кг заметно уступает по этим показателям ЛБК-527 и препарату сравнения. Препараты сравнения и ЛБК-527 подавляют апоптотическую готовность и пролиферативный потенциал печеночной ткани, что нельзя сказать о композиции ЛХТ-8-16.

Итоги выполнения диссертационного исследования

Таким образом, внутрижелудочное курсовое введение магнийсодержащего производного 2-аминоэтансульфоновой кислоты в дозах 100 и 50 мг/кг/сут, фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут сдерживает алкоголь-зависимую активацию тканевого и системного ПОЛ, предотвращает глубину и распространенность дистрофического и воспалительного процесса в органе, повышает противовоспалительный и регенераторный потенциал печеночной паренхимы, ингибирует программируемую гибель гепатоцитов и снижает активность цитолитического и холестатического синдромов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Комплексное изучение гистологических проявлений острого повреждающего действия этилового алкоголя на печень, углубленное использование иммуногистохимических маркеров программируемой гибели клеток и их пролиферации, наряду с исследованием процессов свободно-радикальной липопероксидации и антиокислительного потенциала, концентрации регуляторных молекул в паренхиме органа и его функционального состояния позволяют установить ключевые элементы развития патологического процесса, структурной перестройки органа, определить важнейшие биологические мишени для возможного профилактического и лечебного воздействия.
2. Полученные результаты о молекулярно-клеточных механизмах протекторного действия магнийсодержащего соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты, а также фармацевтической композиции на его основе, являются основанием для проведения углубленного доклинического исследования фармакокинетики и фармакодинамики веществ, их безопасности при системном применении, разработки оптимальной лекарственной формы для приема внутрь в аспекте создания высокоэффективного отечественного гепатопротекторного лекарственного средства.

ВЫВОДЫ

1. Внутрижелудочное курсовое введение магнийсодержащего соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛБК-527 в дозах, пропорциональных 5 и 2,5% от показателя ЛД₅₀, определенного при данном пути введения, ведет к сохранению макроструктуры печени крыс, полу-

чающих токсические дозы этанола, долькового строения и балочной структуры паренхимы органа, профилактике гибели печеночных клеток, снижению интенсивности жировой дистрофии гепатоцитов и подавлению воспаления (по шкале Кноделя). ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут повышает экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2, вызывает гипоксессию регулятора апоптоза каспазы-3 и активирует пролиферативный потенциал гепатоцитов (по уровню PCNA и Ki-67) главным образом в области периферии печеночной дольки.

2. Фармакологический эффект вещества ЛБК-527 в обеих изученных дозах на фоне формирования экспериментального острого алкогольного поражения печени проявляется в выраженном снижении активности алкоголь-опосредованного цитолиза, профилактике холестаза и обусловлено уменьшением тканевой концентрации ФНО-альфа, свободнорадикальной активности паренхимы органа с пропорциональным повышением уровня ИЛ-10, ФРГ и активацией антиокислительного потенциала в ткани печени.

3. Гепатопротекторное действие фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 на основе альфа-липоевой кислоты и деанола ацеглумата формируется лишь при ее введении в высшей терапевтической дозе 120 мг/кг/сут. и сопровождается ослаблением при сравнении с контролем макро- и микроскопических изменений печени, снижением абсолютной и относительной массы органа, сохранением балочной структуры и долькового строения, снижением площади некроза и жировой гипертрофии гепатоцитов, уменьшением активности воспаления (по шкале Кноделя) до минимальной, умеренным ингибированием апоптотического процесса без существенного влияния на пролиферативный потенциал клеток печени.

4. Следствием патогенетического терапевтического влияния ЛХТ-8-16 на орган является умеренное снижение активности аминотрансфераз, гамма-глутамилтранспетидазы и щелочной фосфатазы в периферической крови, а также ослабление активности перекисного окисления липидов как в ткани печени, так и на системном уровне – в периферической крови с одновременной активацией ферментативной активности эндогенных ферментов-антиоксидантов – СОД печени и каталазы плазмы. Фармацевтическая композиция оказывает умеренное подавляющее влияние на концентрацию ФНО-альфа в ткани печени, несколько повышает тканевой уровень ИЛ-10.

5. При сопоставлении гепатопротекторного действия двух исследуемых веществ наибольшей активностью обладает вещество ЛБК-527, при этом по совокупности полученных результатов оно может рассматриваться как альтернатива препарату сравнения S-аденозин-L-метионина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Динамика цитолитического синдрома и морфологической картины при экспериментальном поражении печени на фоне применения новых гепатопротекторов / В.А. Горшков, Е.В. Блинова,

М.А. Морозов, А.А. Степанова, **М.С. Хальзова** // **Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке.** – 2016. – Т. 18, №11. – С. 105-107.

2. Экспериментальное обоснование применения некоторых антиоксидантов для лечения токсического гепатита у беременных / В.А. Горшков, Е.В. Блинова, М.А. Морозов, **М.С. Хальзова**, А.А.Степанова // **Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке.** – 2016. – Т. 18, №1. – С. 324-326.

3. Гепатопротекторная активность аминоэтансульфоната магния у беременных крыс с экспериментальным парацетамоловым и этаноловым гепатитом / Е.В. Блинова, **М.С. Хальзова**, Д.С. Блинов // **Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.** – 2016.– Т. 134, № 10. – С. 50-53.

4. Морфологические аспекты применения некоторых цитопротекторов при острых гепатитах у беременных в эксперименте / Е.В. Блинова, М.Х.С. Яхья, Д.С. Блинов, А.И. Мелешкин, **М.С. Хальзова** и др. // **Морфология.** – 2016. – Т. 149, №3 (Прил.) – С. 36-37.

5. Применение нового магнийсодержащего соединения при комбинированном поражении печени в эксперименте / М.А. Морозов, **М.С. Хальзова**, А.А. Степанова // **Мат. научно-практ. конф. с межд. участием "Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны"**. – Самара, 2017. – С. 176.

6. Гепатопротекторная активность органического соединения магния у крыс с экспериментальным гепатитом / Е.В. Блинова, **М.С. Хальзова**, Д.С. Блинов и др. // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2018. – Т. 81, №4. – С. 18-21.

7. Изучение безопасности применения магниевой соли с аминоэтансульфоновой кислотой для лечения гепатитов различной этиологии / **М.С. Хальзова**, В.А. Горшков, М.А. Морозов, Ж.А. Овсепян // **Материалы XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье»** –Санкт-Петербург, 2018. – С. 290-291.

8. Molecular and cellular mechanisms of acute cytotoxic liver damage as potential biological targets for magnesium-containing cell-protective drug / M.O. Dudina, I.R. Suslova, **M.S. Khalzova**, J.V. Dergunova, E.A. Kogan, et al. // **Research Results in Pharmacology.** – 2018. – Vol. 4(3). – P. 9-15.

Патент

1. **Патент на изобретение №2629606**, Российская Федерация. Применение соединения магния, обладающего гепатопротекторной активностью, для лечения алкогольного и лекарственного гепатита / Е.В. Блинова, **М.С. Хальзова**, Д.С. Блинов и др., заявитель и патентообладатель – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «МГУ им. Н.П. Огарёва» – 2016131670/16, заявл. 01.08.2016, опубл. 30.08.2017. – Бюл. №25. – 8 с.

Список использованных сокращений:

АБП – алкогольная болезнь печени

АЛТ – аланиновая аминотрансфераза

АМ – S-аденозил-L-метионина

1,4 бутандисульфонат

АСТ – аспарагиновая аминотрансфераза

ГГТП – гамма-глутамил транспептидаза

ИГХ – иммуногистохимия

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферменный анализ

ОАП – острое алкогольное поражение

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

ФРГ – фактор роста гепатоцитов

ЩФ – щелочная фосфатаза