

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МОРДОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. Н.П. ОГАРЁВА»

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители –
доктор медицинских наук, профессор
Е.А. Коган

доктор медицинских наук, доцент
Е.В. Блинова

Саранск-2018

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	5
1	АЛКОГОЛЬНАЯ БОЛЕЗНЬ ПЕЧЕНИ: МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНА И СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ (обзор литературы).....	16
1.1	Современные представления о патогенезе алкогольной болезни печени.....	18
1.1.1	Клеточные и молекулярные механизмы формирования алкогольной болезни печени.....	18
1.1.2	Экспериментальные подходы к воспроизведению АБП. Роль свободнорадикальных процессов в развитии заболевания.....	24
1.1.3	Механизмы свободнорадикальных реакций при АБП.....	28
1.2	Морфологические изменения печени при алкогольном поражении.....	30
1.3	Фармакологические подходы к лечению АБП.....	35
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1	Дизайн исследования.....	41
2.2	Следование биоэтическим процедурам и нормативным актам.....	44
2.3	Материал исследования.....	46
2.3.1	Характеристика лабораторных животных и условий их содержания. Формирование экспериментальных групп....	46
2.3.2	Используемые в работе лекарственные вещества, реактивы, диагностические наборы и антитела	49
2.4	Модель острого алкогольного поражения печени.....	54

2.5	Методы исследования.....	55
2.5.1	Морфологические методы исследования.....	55
2.5.1.1	Гистологические исследования печени.....	56
2.5.1.2	Морфометрический анализ.....	57
2.5.1.3	Иммуногистохимический метод исследования.....	58
2.5.2	Биохимические методы исследования.....	62
2.5.3	Иммуноферментный метод исследования концентрации ФНО-альфа, ИЛ-10 и ФРГ.....	64
2.5.4	Методы исследования активности антирадикальных про- цессов в печени и крови.....	65
2.5.5	Методы статистической обработки результатов исследо- вания.....	67
3	МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ КРЫС С ОСТРЫМ АЛКОГОЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ	67
3.1	Макроморфологические изменения печени животных с острым алкогольным гепатитом на фоне внутрижелудоч- ного введения ЛБК-527 и ЛХТ-8-16.....	67
3.2	Гистологические изменения печени крыс с острым алко- гольным гепатитом при курсовом введении ЛХТ-8-16 и ЛБК-527.....	71
4	ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ И СО- СТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ОСТРОМ АЛКОГОЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ЛБК-527 И ЛХТ-8-16.....	86
4.1	Функциональные изменения печени при острым алкоголь- ном поражении и воздействии исследуемых ве- ществ.....	87
4.2	Состояние свободнорадикальных процессов при острым алкогольным повреждении печени и введении ЛБК-527 и	

	ЛХТ-8-16.....	92
5	ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ АЛКОГОЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ.....	100
5.1	Изучения уровня ФНО-альфа, ИЛ-10 и ФРГ в печени крыс при остром алкогольном гепатите и воздействии исследуемых веществ методом ИФА.....	100
5.2	Изучение уровня экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза в печени крыс при остром алкогольном гепатите на фоне протекторного воздействия ЛБК-527 и ЛХТ-8-16.....	103
6	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
6.1	Итоги выполнения диссертационного исследования.....	120
6.2	Перспективы дальнейшей разработки темы.....	120
	ВЫВОДЫ.....	123
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	124
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	125
	СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	149

ВВЕДЕНИЕ

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 стеа-

то гепатит, 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 центролобулярных гепатоцитов, появлением телец Мэллори и фиброза (Cesaratto C. et al., 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 (Cessaratto 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 (Cessaratto C. et al., 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 экспрессии регуляторов апоптоза (Bcl-2, каспаза-3) и пролиферации (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 (Bcl-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 тка-

невой 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 Bcl-2 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 цитопротекторной активностью.

Впервые показано, что внутрижелудочное курсовое введение магний-содержащего 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 гипоэкспрессии каспазы-3 и активирует пролиферативный потенци-

ал гепатоцитов (по уровню Ki-67 и PCNA) главным образом в области периферии печеночной дольки.

Научно-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 фундаментальных 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 гепатита воспроизводили ежесуточным внутрижелудочным введением 40% водного 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.

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

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 па-

раметрических 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 ПМГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), протокол №8 от 5.09.2018 г.

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 паренхимы печени. При деятельном участии автора проведено иммуногистохимическое исследования. 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. Лично автором написаны рукописи диссертации и автореферата.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, в том числе 3 статьи – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России (из них 2 – оригинальные, 1 – обзорная), 2 статьи – в изданиях, индексируемых международной системой цитирования Scopus, и 1 патент на изобретение РФ.

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.

1. АЛКОГОЛЬНАЯ БОЛЕЗНЬ ПЕЧЕНИ: МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНА И СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

(обзор литературы)

С избыточным потреблением алкоголя связано около 3,8% всех случаев смерти и не менее 4,6% лет, потерянных вследствие инвалидности, во всем мире [15]. В Европе проблема приобретает особую актуальность, поскольку в государствах региона 6,5% всех смертей связаны с потреблением алкоголя [16], а последние исследования свидетельствуют о том, что алкогольная зависимость и связанное с ней злоупотребление спиртными напитками приводит к каждой седьмой смерти мужчин и каждой тринадцатой смерти европейских женщин в возрасте от 15 до 63 лет [17].

Алкоголизм является наиболее частой причиной развития цирроза печени в европейских странах и США, тогда как алкогольная болезнь печени (АБП) – основная причина смерти, ассоциированная со злоупотреблением алкоголем у взрослых [18, 19]. За последние 30 лет смертность от цирроза печени в большинстве Западноевропейских государств снизилась, однако в Великобритании, Ирландии, Финляндии, а также странах Восточной Европы, в том числе и России, наблюдается рост смертности, обусловленной циррозом печени [20]. В США, для сравнения, смертность трудоспособного населения – представителей европеоидной расы – от всех причин за период с 1999 по 2013 годы значительно возросла, и наблюдающийся рост обусловлен употреблением наркотиков, алкоголя, хроническими заболеваниями печени и циррозом [21].

Строгая зависимость между поражением печени и употреблением алкоголя у подавляющего большинства пациентов обусловлена формированием синдрома алкогольной зависимости, характеризующегося развитием толерантности к психотропным эффектам алкоголя, болезненным пристрастием к спиртному и постоянным его употреблением несмотря на негативное

воздействие последнего на организм. Каждодневное употребление алкоголя или эпизодическое «запойное» употребление вносят вклад в развитие и прогрессию широкого спектра как психических, так и соматических патологических состояний. Существует ряд заболеваний, обусловленных исключительно негативным воздействием алкоголя, среди которых необходимо отметить алкогольный панкреатит [22], фетальный алкогольный синдром [23] и др. Кроме того, среди патологических процессов, в развитии и прогрессии которых доказано патогенное действие алкоголя, необходимо указать на злокачественные поражения орофарингеальной области, пищевода, печени, толстой кишки и молочной железы [24], сердечно-сосудистых заболеваний [25], нейропсихических состояний (эпилепсия, депрессивные расстройства) [26] и т.д.

Избыточное употребление алкоголя занимает большое место в ряду причин смерти пациентов с заболеваниями печени как этиологический фактор развития АБП, так и фактор, отягощающий течение предсуществующих неалкогольной болезни печени, вирусных гепатитов, гемохроматоза. Глобальные исследования заболеваемости и смертности на планете говорят о неуклонном росте количества смертей, ассоциированных с хроническими заболеваниями печени, указывая на 1 млн. смертей в 2010 году, что составило 2% в структуре смертности [27]. Суммарное число лет, потерянных в результате патологии печени превышает сумму лет, потерянных в результате онкологических заболеваний респираторного тракта, пищевода, желудка, толстой кишки и поджелудочной железы взятых вместе [28]. Вместе с тем, сложно сказать, какова доля АБП среди причин смертности ввиду неоднородности популяции, этиологии поражения печени, особенностей регистрации причин смерти в различных странах. Наиболее достоверная информация может быть получена по данным Финляндии, где в популяционных исследованиях установили причинную связь между 87% смертей вследствие поражения печени и злоупотреблением алкоголем. По данным ВОЗ [29] от 60 до 80% в структуре смертности от заболеваний печени в Европейском Союзе, связаны со зло-

употреблением спиртными напитками [30]. Помимо рассуждений о заболеваемости и смертности, ассоциированной с АБП, необходимо отметить, что заболевание занимает второе место среди показаний к трансплантации печени (на заболевание приходится 40% всех пересадок печени в Европе и 25% – в США) [31]. Экономические потери стран Евросоюза, связанные с АБП, составляют в год около 125 млрд. евро, составляя 1,3% ВВП [32].

1.1 Современные представления о патогенезе алкогольной болезни печени

Избыточное употребление алкоголя, как уже было сказано выше, может вызвать целый спектр патологических процессов в печени, среди которых алкогольный стеатоз наблюдается практически поголовно у лиц, выпивающих в день 40 г чистого этилового алкоголя. Помимо стеатогепатоза АБП 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 [33] (рис. 1.1).

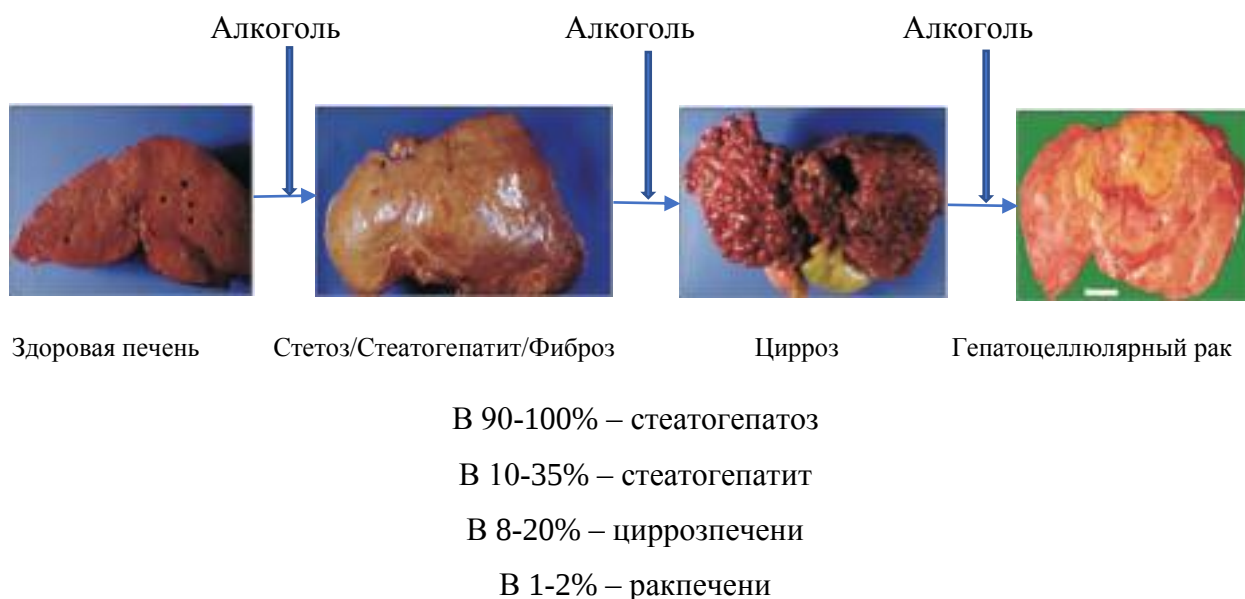


Рисунок 1.1 Макроскопическая картина печени, соответствующая прогрессии и последовательному формированию клинических форм АБП по Telietal., 1995 [33]

Большую озабоченность вызывает рост заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой лиц АБП, у которых цирроз трансформируется в рак печени в 1-2% ежегодно [34]. Особенности АБП является то, что стеатоз и алкогольный гепатит, в меньшей степени фиброз печени до стадии цирротической трансформации, являются состояниями обратимыми, достигаемыми стойким отказом от спиртного, тогда как фулминантный алкогольный стеатогепатит, декомпенсированный цирроз и рак печени имеют крайне неблагоприятный прогноз.

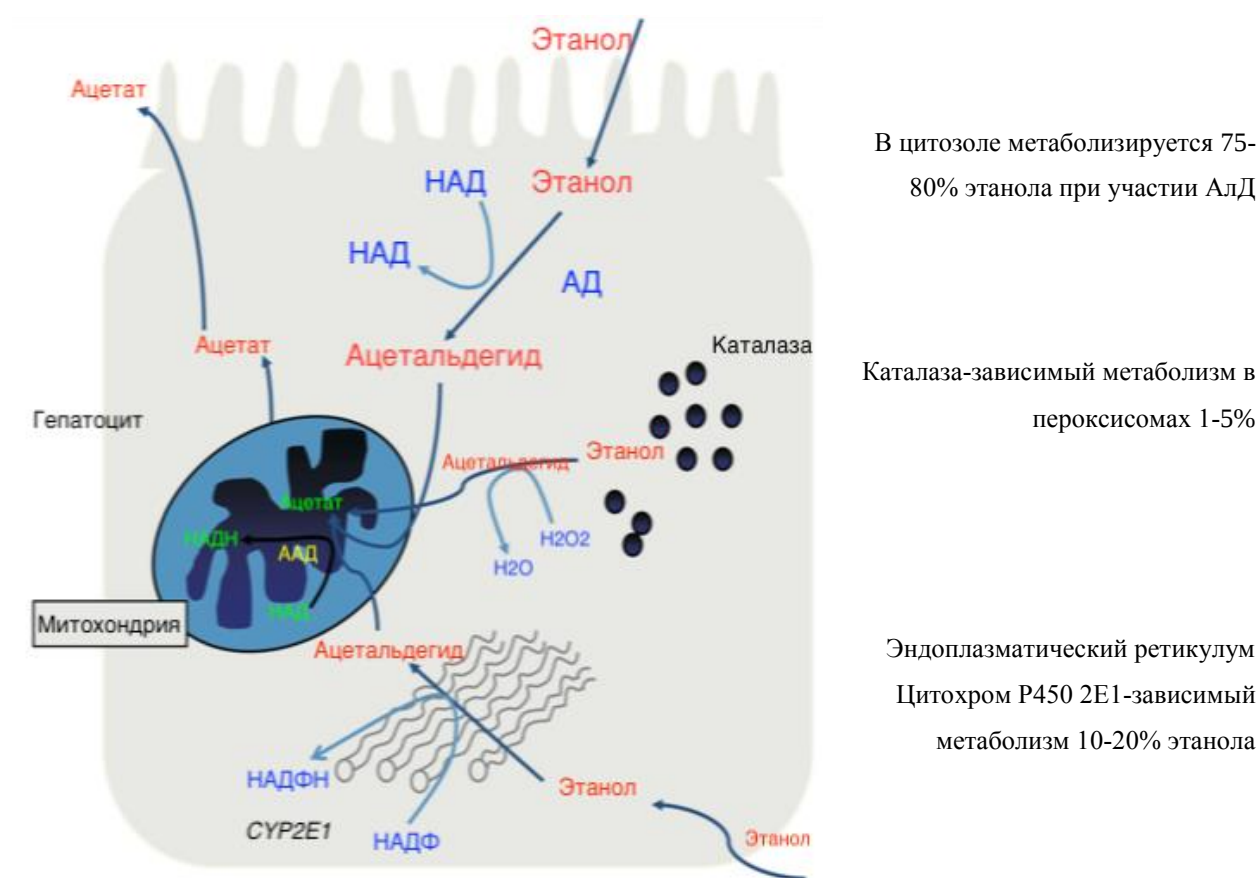
1.1.1 Клеточные и молекулярные механизмы формирования алкогольной болезни печени

Клеточные и молекулярные механизмы алкогольного поражения печени с формированием АБП до настоящего времени далеки от полного понимания, 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 в контексте продолжающегося патогенного воздействия алкоголя на организм. Ключевым компонентом эволюции клинических патологических форм АБП является прямое цитотоксическое действие основного метаболита, образующегося в процессе деградации алкоголя, – ацетальдегида (АА) [35].

Две ведущие ферментативные системы принимают участие в метаболизме этилового алкоголя с образованием АА посредством реакции оксидации. Одна из них, алкогольдегидрогеназная (АлД) ответственна за метаболизм низких концентраций алкоголя. Энзиматический аппарат системы локализован в цитозоле гепатоцита и обладает неизменным, фиксированным ферментативным потенциалом, который не изменяется при увеличении концентрации поступающего этанола. В отличие от АлД ферментная система цитохрома P450 2E1 (CYP2E1), локализованная в митохондриальном аппарате

печеночной клетки, является индуцибельной и может увеличивать ферментативную активность в 10-20 раз по сравнению с исходной величиной у хронических алкоголиков [36].

Обе упомянутые ферментные системы генерируют АА, высоко реактивный цитотоксикант и мутагенный метаболит, и принимают участие не только в обмене этилового спирта, но и некоторых других органических субстанций, также вносящих вклад в алкоголь-опосредованную цитотоксичность (рис. 1.2).



Примечание: АД – алкогольдегидрогеназа, ААД – ацетальдегиддегидрогеназа

Рисунок 1.2 Участие отдельных ферментативных систем гепатоцита в метаболизм этанола по Stikeletal., 2017 [19] Ред. автора
(пояснения в тексте)

Помимо генерации АА система цитохрома Р450 2Е1 участвует в активации оксидативных процессов в гепатоцитах, имеющих патогенетическое значение, за счет образования активных форм кислорода и свободных радикалов, таких как супероксид анион и пероксид водорода. Внутриклеточная активность ферментов системы цитохрома у человека может многократно увеличиваться вследствие потребления более 40 г чистого этанола в сутки в течение 1 недели [37].

У грызунов индукция цитохрома 2Е1 коррелирует с ростом НАДФ окислительной активности, продукцией гидроксипропиловых радикалов, стимуляцией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и тяжестью поражения печени. Доказательством цитохром-опосредованной роли описанных процессов является их полное предотвращение на фоне введения ингибитора СУР2Е1 клофетиазола [37, 38]. Кроме того, следует подчеркнуть, что АА обладает мощной карциногенной активностью, доказанной как у людей, так и в опытах на животных, что используется многими исследователями для объяснения возможных ассоциаций злоупотребления алкоголем и определенных форм злокачественных новообразований [39, 40].

Первым этапом в развитии алкоголь-ассоциированной патологии печени является стеатоз, формирующийся буквально у каждого человека, злоупотребляющего спиртными напитками как результат нарушения внутрипеченочного обмена липидов [41]. Последний, в свою очередь, проявляется снижением окисления жирных кислот и повышением их синтеза наряду с синтезом триглицеридов, ростом поступления липидов печеночные клетки как в связи с мобилизацией жиров из внепеченочных депо, так и за счет притока хиломикронов из тонкого кишечника. Более того, в патологический липогенез вовлекаются такие механизмы, как дизрегуляция стеатогенных ферментов и факторов транскрипции, в частности, стерол-связывающего регуляторного протеина 1с, пероксисомного рецептора, активирующего пролиферацию, типа а, и митохондриального триглицерид-транспортного протеина.

В последних исследованиях показана потенциальная роль протеолитических ферментов PNPLA3 and TM6SF2, участвующих в обмене липидов, для которых показана взаимосвязь между наследственными вариантами кодирующих их генов и АБП. Однако, несмотря на столь широкую вовлеченность различных ферментативных систем в развитие заболевания, механизм повреждающего действия алкоголя на них до сих пор не ясен.

Воспаление, возникающее на фоне алкогольного стеатоза, может повлечь развитие фулминантного алкогольного стеатогепатита, как правило, летального, и является основной причиной фиброгенеза, ведущего к формированию фиброза, цирроза и, в наименее благоприятном случае, гепатоцеллюлярного рака.

Гистологически фулминантный алкогольный стеатогепатит характеризуется различной степенью выраженности стеатоза, типичным воспалительным инфильтратом, состоящим из полиморфноядерных клеток, баллонной дистрофией центролобулярных гепатоцитов, появлением телец Мэллори-Дэнка и фиброза [42]. Ключевая патогенетическая ось проходит по направлению кишечника – печень. Так, употребление алкоголя ведет к повышению проницаемости кишечника для эндотоксинов (липополисахаридов) Грам-отрицательных микроорганизмов, колонизирующих его просвет, их транслокации в систему портального кровотока. В крови воротной вены липополисахариды связываются с эндотоксиновыми рецепторами CD14 клеток Купфера, с последующей активацией MyD88-независимого сигнального пути при участии TLR4, и последующей продукцией провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) с последующим повреждением ткани печени [43-45]. В процесс активации печеночного воспаления, 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 [45-47].

Одним из патогномоничных патоморфологических проявлений АБП является фиброз, который, по образному выражению ряда патоморфологов,

напоминает процесс организации обширной раны путем активации фиброгенеза и подавления фибролизиса[48]. По мере прогрессирования фиброза печеночная паренхима замещается массами волокон экстрацеллюлярного матрикса, образованными печеночными звездчатыми клетками и миофибробластами, что, в конечном счете, приводит к деформации микро-и макроструктуры органа и прогрессивному нарушению его функций [48].

Различные триггеры могут активировать макрофаги печени (клетки Купфера) и другие клетки воспалительного инфильтрата, вследствие чего повышается продукция профиброгенных цитокинов: тромбоцитарного фактора роста и трансформирующего фактора роста-бета1. Последние стимулируют звездчатые клетки и фибробласты к 10-кратному повышению выработки коллагена, неколлагеновых гликопротеинов, протеогликанов, гликозаминогликанов по сравнению с неповрежденным органом. В условиях формирования АБП более 80% всего коллагена печени может быть представлено фибриллярным коллагеном типов 1 и 3. В свою очередь, ферменты, принимающие участие в деградации матрикса – матриксные металлопротеазы – подавляются тканевыми ингибиторами [48]. Триггерами фиброгенеза при АБП являются АА [49], активные формы кислорода [50], лептин [51], эндоканнабиноиды [52], и липидные пероксиды [53].

С одной стороны, наиболее грозным исходом АБП является гепатоцеллюлярная карцинома, а, с другой, – подавляющее большинство злокачественных опухолей печени эпителиального происхождения формируются на фоне алкогольных циррозов печени [54]. Помимо того, что цирротическая трансформация печени сама по себе является предраковым состоянием, известен ряд патофизиологических аспектов, ассоциированных с развитием алкоголь-ассоциированного рака печени. Одним из таких важных факторов развития опухоли является АА, который проявляет не только токсические свойства, но также обладает мутагенной активностью за счет формирования аддуктов ДНК, точечных мутаций, подавления репарации поврежденной ДНК и, по-

средством активированной системы CYP2E1, трансформации неактивных проканцерогенов в канцерогены [24].

Среди других важных механизмов, играющих значимую роль в формировании и прогрессии АБП, следует отметить алкоголь-опосредованное нарушение эпигенетической модификации метилирования ДНК. Так, была показана корреляционная связь между выживаемостью пациентов с гепатоцеллюлярным раком печени, в том числе и алкогольного происхождения, и эпигенетическим подавлением гиперметилованных генов опухолевого супрессора наряду с активацией онкогенов посредством гипометилирования [55]. Недавно проведенные исследования пролили свет на патогенез фульминантного алкогольного стеатогепатита. Ученые установили, что ведущую роль в процессе прогрессии заболевания играет ингибирование процессов регенерации гепатоцитов. В исследованиях на эксплантах печени пациентов, перенесших трансплантацию органа, установлено, что у лиц, толерантных к фармакотерапевтическому воздействию, наблюдается угнетение экспрессии цитокинов, стимулирующих регенерацию органа и отсутствие пролиферирующих гепатоцитов [56]. Научная находка была подтверждена позднее, когда была доказана связь между прогнозом заболевания, присутствием и количеством пролиферирующих гепатоцитов [57]. Кроме того, массивная экспансия печеночных клеток предшественников, называемая протоковой реакцией, обычно наблюдаемая при алкогольных гепатитах, у пациентов с фульминантным гепатитом не сопровождается дифференцировкой в зрелые гепатоциты и положительно коррелирует с тяжестью заболевания и смертностью [58].

1.1.2 Экспериментальные подходы к воспроизведению АБП. Роль свободнорадикальных процессов в развитии заболевания

Экспериментальное исследование патоморфологии и патофизиологии АБП крайне затруднено в связи с отсутствием релевантных моделей алкогольного поражения печени, максимально приближенных к условиям реаль-

ной клинической практики, особенно это касается наиболее тяжелых проявлений заболевания [59].

Грызуны демонстрируют устойчивость к гепатотоксическому действию алкоголя, что объясняется видоспецифичностью метаболизма этанола. Если и удастся воспроизвести поражение печени у мышей, то для этого необходимо дополнительное воздействие второго токсиканта (тетрахлористый углерод или тиоацетамид) или назначение сложной диеты с созданием дефицита холина и метионина. Однако полного соответствия морфологических проявлений поражения печени у мышей и человека получить не удастся [60].

Одним из возможных решений проблемы является использование метода внутрижелудочного введения алкоголя или использование Tsukamoto-French модели, предполагающей длительное введение жидкой пищи богатой этиловым алкоголем через специально выполненную гастростому, при которых наблюдается стеатоз, воспаление, фиброз, а также такие микроскопические феномены как тельца Мэллори, балонная дистрофия гепатоцитов, нейтрофильная инфильтрация [61, 62]. Современные исследователи связывают с дефицитом удобных и клинически совместимых экспериментальных моделей невысокий прогресс в понимании молекулярных механизмов развития заболевания, а также определении возможных таргетов для рациональной фармакотерапии. Возможными обнадеживающими подходами в области экспериментальной гепатологии являются разработка метода комбинированного алкогольного воздействия, сочетающего в себе алкогольные эксцессы с продолжающимся длительным введением высоких доз этанола, а также выведение генетически модифицированных грызунов (например, с использованием CRISPR/Cas9 техники), которые, возможно, позволят преодолеть видоспецифичную нечувствительность к алкоголю [63].

Использование экспериментальных моделей, упомянутых выше, позволило, тем не менее, существенно обогатить наши представления о ключевых патофизиологических и патоморфологических процессах при алкогольном

поражении печени. Важнейшее патогенетическое значение при исследуемом заболевании принадлежит оксидативному стрессу (рис. 1.3).

Существует четыре группы полученных экспериментально доказательств вклада перекисного окисления липидов в формирование и прогрессию АБП: повышение продуктов ПОЛ и активных форм кислорода, истощение естественных антиоксидантных систем и появление биомаркеров оксидативного повреждения, защитная роль экзогенных антиоксидантов и защитная роль стимуляции экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные системы [64].

Способность хронического потребления этилового алкоголя к повышению продукции активных форм кислорода и свободных радикалов была показана с применением целого ряда лабораторно-экспериментальных подходов – клеточных культур, изолированных органов, лабораторных животных, а также у человека [64].



Рисунок 1.3 Роль системы ПОЛ в алкогольном повреждении печени по Zhuetal., 2012 [64]. Ред. автора

Несмотря на то, что острый алкогольный эксцесс может вызывать индукцию активности определенных «антиоксидантных» генов, длительное воздействие высоких доз этанола обычно приводит к подавлению механизмов антиоксидантной защиты как на тканевом уровне (в печени), так и в крови. Наиболее ранним маркером истощения естественных антиоксидантных механизмов является снижение концентрации глутатиона в митохондриях гепатоцитов, имеющего большое значение при печеночной патологии [65]. Наряду с повышением продукции активных форм кислорода и свободных радикалов у животных, длительно находящихся под воздействием алкоголя, наблюдается повышение ряда маркеров оксидативного стресса. Биологические маркеры включают продукты пероксидации липидов – малоновый диальдегид, 4-гидро-2-ноненал, F₂-изопростаны, окислительной модификации ДНК – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, продукты протеолиза, а также 1-гидроксиэтильные радикалы. При этом необходимо подчеркнуть, что наблюдается сильная корреляция между тяжестью поражения печени и уровнем биомаркеров оксидативного стресса. Это служит основанием использования указанных продуктов в качестве индикаторов тяжести поражения печени и эффективности фармакотерапевтического воздействия [66, 67].

Вовлеченность системы ПОЛ в патогенез АБП обосновывает необходимость использования антиоксидантов в качестве компонентов терапевтических стратегий при лечении заболевания. И действительно, профилактическая и лечебная роль ряда веществ экспериментально была доказана. Среди таких веществ – витамины с антиоксидантной активностью, глутатион-продуцирующие агенты (эфир глутатиона, ацетилцистеин, S-аденозил-L-метионин), вещества с миметической активностью, пробукол и полифенолы растительного происхождения [68-72]. Перспективным представляется использование химических индукторов эндогенных антиоксидантов, чья эффективность доказана при алкоголь-ассоциированной патологии печени [73, 74].

Наряду с высокой активностью экзогенных антиоксидантов у животных с экспериментальной АБП, индукция экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные белки (Mn-, Cu-, Zn-содержащая супероксиддисмутаза (СОД)) трансгенным путем или с помощью адресной доставки генов, снижает степень повреждения печени при ее алкогольном поражении [75-77]. Подобного же положительного эффекта можно добиться путем введения антиоксидантных белков (например, тиреодоксина) [78]. Напротив, у животных, нокаутных по генам, кодирующим синтез Cu-, Zn-СОД, каталазы, глутатионпероксидазы 1, металлотионеина, показано повышение чувствительности к повреждающему действию длительной экспозиции алкоголя [79-82]. Позднее было установлено, что подавление синтеза сульфоредексина или пероксидоредексина 1 существенно утяжеляет течение АБП у мышей [83]. Последний, как оказалось, близко ассоциирован с ферментной системой цитохрома P450 2E1 в цитозольном участке мембраны эндоплазматического ретикулума гепатоцитов и принимает непосредственное участие в процессе утилизации активных форм кислорода, продуцируемый системой цитохрома [83].

Наиболее значимый вклад в понимание роли свободнорадикальных процессов в формировании АБП внесли исследования по направленному подавлению активности ядерного транскрипционного фактора Nrf2 – центрального регулятора генов антиоксидантных ферментов у мышей с алкогольной болезнью печени. Было установлено, что у экспериментальных животных наблюдался значительный рост объемов некроза гепатоцитов, объема и глубины воспалительного процесса, ПОЛ и смертности [84]. Таким образом, было доказано, что использование активаторов Nrf2 – сигнального пути является действенной стратегией ограничения повреждающего действия алкоголя и других токсинов на печень человека и животных [85].

1.1.3 Механизмы свободнорадикальных реакций при АБП

Поскольку употребление алкоголя стимулирует оксидативное повреждение гепатоцитов, последние являются основным источником активных

форм кислорода и свободных радикалов. В паренхиматозных клетках печени, как мы уже упоминали, существует несколько путей продукции биоактивных веществ, способных запускать механизмы ПОЛ: митохондрии, система цитохрома P450 2E1, НАД(Ф)Н оксидазы (NOX) и индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS).

В митохондриях под действием этанола повышается уровень восстановленного НАД, поставляющего электроны для дыхательной цепи, в результате чего происходит потеря одного электрона у кислорода с превращением его супероксид-анион. Дополнительная продукция супероксид-аниона происходит в результате прямого повреждающего действия АА на митохондрии [86, 87].

В недавно проведенных исследованиях была установлена роль редокс-активного белка $p66^{SHC}$, связанного с митохондриями и генерирующего активные формы кислорода путем его акцепции от цитохрома с [88]. Данный протеин потенцирует этанол-индуцированный оксидативный стресс и его повреждающее действие на клетки печени [89]. У животных, дефицитных по белку $p66^{SHC}$, показана более высокая толерантность к патогенному действию алкоголя, что проявляется в снижении частоты и интенсивности развития стеатоза и некроза по сравнению с животными без описываемого дефицита [89]. Интересными также являются результаты, согласно которым дефицит $p66^{SHC}$ сопровождается повышением этанол-зависимой активации Мп-СОД в культуре гепатоцитов и в опытах *in vivo*, что свидетельствует о роли белка как транскрипционного супрессора синтеза СОД [90].

Роль системы цитохрома P450 2E1 уже неоднократно обсуждалась в рамках настоящего обзора, поэтому мы не будем останавливаться на этом подробно. Хотя NOX и iNOS первично ответственны за продукцию свободных радикалов при воспалении, в условиях алкоголь-опосредованного воздействия на клетки печени происходит чрезмерная активация ферментных систем, ведущая к росту продукции супероксид-аниона и оксида азота [91, 92]. Реакция двух этих радикалов приводит к образованию пероксинитрита,

обладающего высоким повреждающим потенциалом в отношении структур митохондрий [93, 94].

В продукцию активных форм кислорода и свободных радикалов при АБП вовлечены не только паренхиматозные клетки печени, но и печеночные макрофаги – клетки Купфера, а также клеточные элементы воспалительных инфильтратов. В этих клеточных элементах существенное значение в активации процессов ПОЛ имеет белок $p47^{phox}$ и iNOS, что доказывает участие оксида азота и процесса его продукции в реализации печеночного повреждения при АБП [95-98].

В звездчатых клетках печени под действием ацетальдегида происходит повышение выработки коллагеновых волокон. Этот процесс лимитируется фосфорилированием PPAR- γ , которое стимулируется посредством пероксидного сигнального пути активации профиброгенного c-Abl-сигнального пути [99-101].

Таким образом, обобщая значение оксидативного стресса в развитии и прогрессировании АБП, можно отметить, что в основе стресс-опосредованного поражения органа при воздействии высоких доз алкоголя лежат три ведущих механизма: во-первых, повреждение митохондрий [102-104]; во-вторых, поддержание воспалительного процесса в печени вследствие нарушения регуляции окислительно-восстановительных процессов в клетках и тканях органа [105-107], и, в-третьих, трансформация звездчатых клеток с последующим ремоделированием межклеточного матрикса как результат дисрегуляции редокс-систем [108-110]. Кроме того, большое значение в стресс-опосредованном развитии заболевания является вовлечение Nrf2 – сигнального пути [111-117].

1.2 Морфологические изменения печени при алкогольном поражении

Патоморфологическими формами АБП являются алкогольный стеатоз, стеатогепатит, алкогольный цирроз печени.

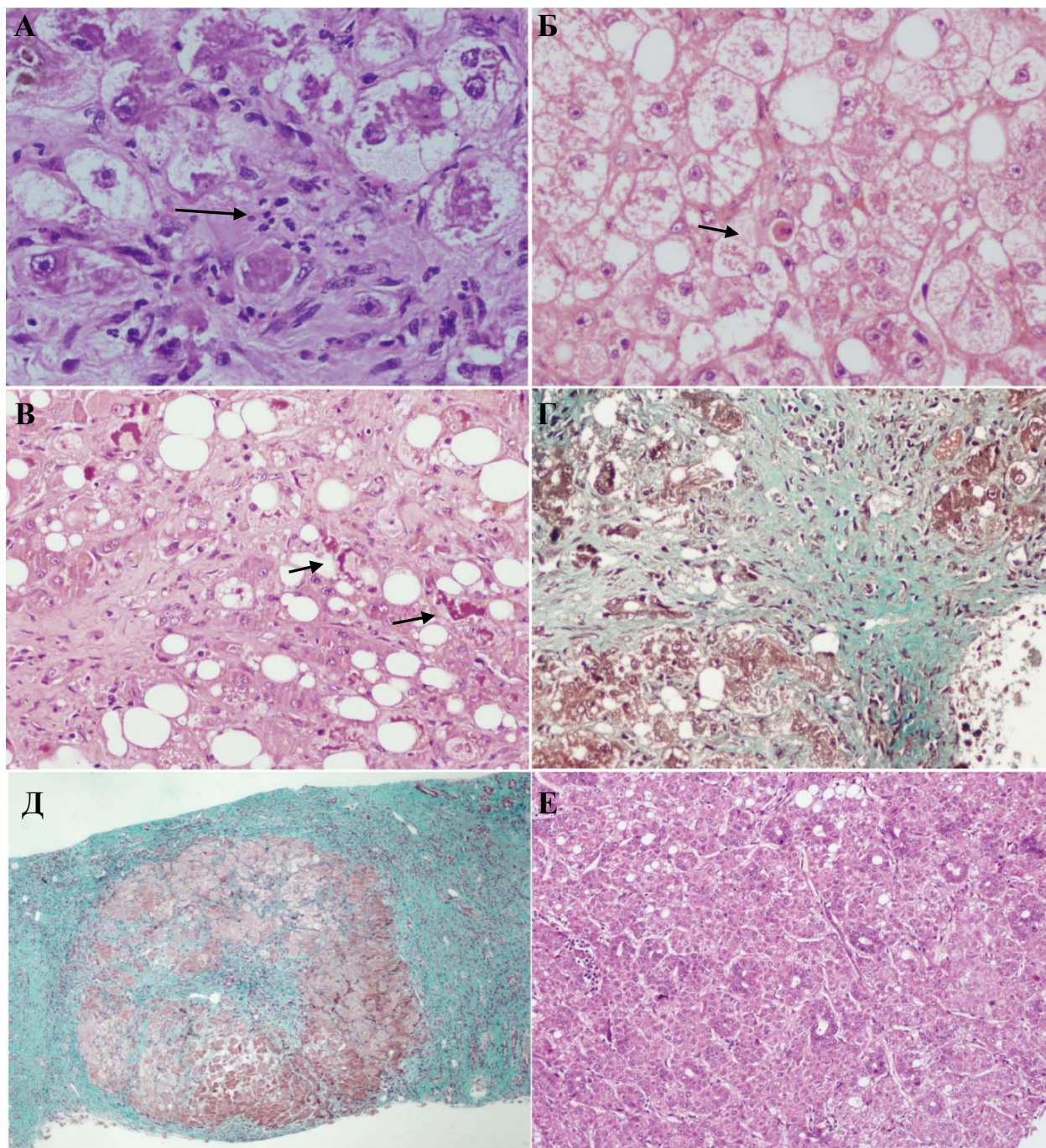
Алкогольный стеатоз определяется в настоящее время как накопление липидных капелек в цитоплазме гепатоцитов. В профессиональной терминологии закрепилось понятие жировой дистрофии печени при суммарном количестве гепатоцитов с явлениями стеатоза составляло от 5 до 50%. В случае обнаружения более 50% паренхиматозных клеток с явлениями стеатоза принято говорить о жировом гепатозе [118]. Однако наличие стеатоза как такового не является обязательным для выставления диагноза АБП, поскольку известны случаи уменьшения выраженности патологического процесса на фоне продолжающегося употребления алкоголя [119].

Стеатоз может быть макро- и микровезикулярный в зависимости не только от размеров липидных внутриклеточных включений, но также в связи с патогенезом и этиологией заболевания. При АБП, как правило, наблюдается макровезикулярный или смешанный стеатоз. Патологический процесс начинается в центрилобулярной зоне 3 и распространяется по направлению к перипортальной зоне 1. Сначала возникают маленькие капельки жира в цитоплазме (микровезикулы), которые по мере увеличения образуют большие капли жира (макровезикулы), смещающие ядро печеночной клетки к периферии. В свою очередь, макровезикулы склонны к слиянию и формированию так называемых жировых кист (больших неправильной формы экстрацеллюлярных жировых вакуолей). Продолжающееся накопление липидов может приводить к разрыву жировых кист и формированию гистиоцитарной клеточной реакции или липогранулёмы. Макровезикулярные жировые капли обладают большим поверхностным натяжением, низкой чувствительностью к действию внутриклеточных липаз, что сопровождается их длительной персистенцией даже после прекращения приема алкоголя [120].

Микровезикулярный стеатоз представлен множественными перинуклеарно расположенными капельками липидов. Истинный микровезикулярный стеатоз формируется при пенной алкогольной дегенерации.

Формирование алкогольного стеатогепатита всегда сопровождается повреждением печеночной ткани на фоне предсуществующего стеатоза. Повре-

ждение проявляется вакуольной дистрофией гепатоцитов, нейтрофильной воспалительной реакцией в лобулярной паренхиме (рис. 1.4А), апоптозом (рис. 1.4Б), появлением телец Мэллори (рис. 1.4В).



Примечание: А – Нейтрофильное воспаление (стрелка) и балонная дистрофия гепатоцитов при АБП (гематоксилин-эозин, x400); Б – Апоптотическая гибель клеток (стрелка) при АБП (гематоксилин-эозин, x400); В – Гиалин Мэллори (стрелка) при АБП (гематоксилин-эозин, x400); Г – Склерозирующий гиалиновый некроз (трихром по Массону, x200); Д – Цирроз с перичеселлюлярным фиброзом (трихром по Массону, x40); Е – Гепатоцеллюлярный рак с фокальным стеатозом (гематоксилин-эозин, x100)

Рисунок 1.4 Морфологические изменения печени при АБП по Sakhuja,

2014 [121]. Ред. автора

Вакуольная дистрофия гепатоцитов является патогномоничным морфологическим признаком алкогольного поражения печени. Гепатоциты заметно увеличены в размере с разреженной цитоплазмой, сгустками промежуточных филаментов, теряют способность окрашиваться на цитокератины 8 и 18. Онкотическое набухание клеток, возникающее в результате истощения внутриклеточной АТФ и перегрузки гепатоцитов кальцием, влечет к потере цитоплазматической мембраной способности контролировать клеточный объем, разрыву сети промежуточных филаментов, набуханию и онкотическому некрозу клеток [120].

Литический некроз как фатальное последствие балонной дистрофии гепатоцитов является наиболее типичной формой гибели клеток при фульминантном алкогольном гепатите. При этом, апоптотический процесс клеточной гибели также может наблюдаться и свидетельствовать либо о продолжающемся, либо недавно произошедшем повреждении ткани. Апоптоз, как правило, запускается оксидативным повреждением внутренней мембраны митохондрий. Апоптотические гепатоциты (рис. 1.4Б), также называемые ацидофильными тельцами, характеризуются сморщиванием клетки, конденсацией хроматина и фрагментацией ядра и, в дальнейшем, самой клетки. Гибель гепатоцитов посредством апоптоза более типична для неалкогольного поражения печени [122].

Тельца Мэллори представляют собой тянущиеся сгустки или сверки эозинофильного вещества в цитоплазме гепатоцитов, чаще расположенные перинуклеарно. Считается, что тельца образуются хаотичными агрегатами волокон кератина [123]. Их деградация протеосомами посредством убиквитинирования приводит к формированию убиквитинированного кератина, убиквитинированного белка р62, белков теплового шока 70 и 25. Доказано, что тельца Мэллори проявляют иммунную реактивность к антителам к убиквитину, кератином 8 и 18, а также протеину р62. Образование телец Мэллори является признаком токсического повреждения гепатоцитов и принимает

участие в прогрессировании и утяжелении воспалительной реакции в ткани печени [120].

Лобулярное воспаление при АБП характеризуется нейтрофильной инфильтрацией, при этом нейтрофилы могут окружать гепатоциты с явлениями вакуольной дистрофии, что известно в литературе под термином сателлитоз [124]. Явления портального воспаления не так выражены, как это наблюдается при других формах гепатитов, например, вирусного происхождения, однако зачастую имеет место. Воспалительный инфильтрат представлен лимфоцитами, плазматическими клетками, нейтрофилами, эозинофилами, а также тучными клетками. Портальное воспаление сопровождается дуктуальной реакцией и явлениями перипортального фиброза и, как правило, формируется на фоне хронического алкогольного панкреатита [125].

Другими типичными морфологическими находками при АБП являются гликогенизированные ядрышки, мегамитохондрии, отложение гемосидерина в гепатоцитах, холестаз и дуктулярная реакция [126]. Гликогенизированные ядрышки представляют собой вакуолизации в ядре гепатоцитов и чаще всего наблюдается в клетках перипортальной локализации.

Фиброз при АБП начинается в зоне 3, перивенулярных регионах и распространяется перицеллюлярно / перисинусоидально. По мере прогрессирования фиброз идентифицируется в портальном тракте с образованием центрo-портального или порто-портального фиброза. Продолжающееся алкогольное повреждение органа сопровождается одновременным течением фиброзования и регенерации, что в конечном итоге приводит к формированию узлов-регенератов и циррозу печени [127]. Наиболее удобными методами гистологического окрашивания для идентификации фиброза печени являются трихром по Массону и Сириус красный. Для дифференциации обширных пучков фиброзной ткани от зон коллапса вследствие массивного алкогольного гепатита на поздних этапах развития АБП используется окрашивание орсеином, при этом участки фиброза являются орсеин-позитивными. Очаги печеночной паренхимы с нарушенной балочной структурой (узлы-регенераты)

являются результатом вовлечения в процесс фиброзирования центральной и воротной вен, тогда как дуктулярная реакция является следствием миграции и экспансии стволовых клеток [127].

Гепатоцеллюлярная карцинома развивается у 5-15% лиц с алкогольным циррозом печени, и, таким образом, алкоголь является наиболее распространенным триггером развития заболевания. Посмертные исследования показывают наличие диспластических узлов размером 5 мм и более в цирротических узлах-регенератах. Диспластические узлы являются предраковым состоянием при раке печени. В опухолевых клетках (рис. 1.3Е) можно найти гиалин Мэллори (алкогольный гиалин), стеатоз и даже фокусы микровезикулярной пенной дистрофии [121].

1.3 Фармакологические подходы к лечению АБП

К сожалению, до настоящего времени не существует стандартных протоколов терапии АБП, что связано как с объективными сложностями в понимании патогенеза заболевания, так и с не разработанностью адекватных моделей для исследования эффективности и безопасности потенциальных фармакотерапевтических воздействий. Так или иначе, появление новых биологических маркеров, сигнальных путей, вовлеченных в процесс повреждения гепатоцитов, расширяет возможные горизонты для направленного лечебного действия инновационных субстанций.

В целом, комплекс консервативных мероприятий при АБП включает отказ от алкоголя, преодоление зависимости и достижение стойкой абстиненции, нутритивную поддержку и, собственно, гепатопротекторную фармакотерапию. В рамках настоящего обзора мы позволили себе более подробно остановиться на фармакотерапевтических стратегиях.

Одним из основных элементов фармакологического лечения АБП являются глюкокортикостероиды (ГКС). С момента проведения первого рандомизированного контролируемого исследования эффективности ГКС при АБП в 1971 году [128], в мире было проведено 14 рандомизированных кли-

нических исследований (в 12 использовалось плацебо, в 1 – ГКС изучались при различных путях введения и в 1 исследовании их эффект сравнивался с антиоксидантным коктейлем). Результаты, полученные при их проведении, носят противоречивый характер, что сами авторы объясняют различием критериев включения и исключения, а также факультативностью использования биопсии печени для подтверждения диагноза АБП [128,129, 130-140].

Объединенное исследование с использованием индивидуальных данных пациентов, полученных из 5 наиболее крупных рандомизированных исследований [135-138, 141], показали, что кортикостероиды обеспечивали 28-дневную выживаемость у половины пациентов [142]. Крупнейшее рандомизированное плацебо-контролируемое мультицентровое исследование, проводимое в Великобритании (theSTeroidsOrPentoxifyllineforAlcoholicHepatitis (STOPAH) study), включавшее 1103 пациента с фульминантным алкогольным гепатитом, показало лишь тенденцию к 28-суточной выживаемости на фоне приема преднизолона по сравнению с группой пациентов, получавших плацебо. Мета-анализ перечисленных выше исследований, включая STOPAH, показало, что ГКС эффективны в сокращении летальности у 46% пациентов [143].

Преднизолон является более предпочтительным лекарственным средством из группы ГКС и, в частности, при сравнении с преднизолоном, поскольку не требует печеночной конверсии, которая может быть нарушена вследствие основного заболевания. Кроме того, именно при использовании преднизолона было показано увеличение продолжительности жизни [139]. Средне-терапевтическая доза препарата составляет 40 мг/сут внутрь в течение 4 недель. Метилпреднизолон может применяться в дозе 32 мг при внутривенном введении у лиц, у которых невозможно использовать пероральный путь введения лекарственных средств. Однако, следует отметить, что в мире не проводилось крупных исследований различных доз и режимов введения, а также длительности курсов препаратов ГКС при АБП.

Ответ на терапию ГКС как правило достигается к концу первой недели приема. У 50-60% пациентов не наблюдается положительной клинической и лабораторной динамики заболевания (по шкале Lille), что является свидетельством неэффективности препаратов и бессмысленности продолжения терапии ГКС [144]. В целом, говоря об использовании шкалы Lille, в настоящее время получены доказательства высокого предиктивного потенциала в отношении эффективности ГКС уже на 4 сутки после начала их курсового приема, однако эти сведения требуют дальнейшего подтверждения [143, 145]. Непредсказуемый ответ а терапию ГКС при АБП наряду с боязнью развития нежелательных эффектов, в том числе риском инфекции, ограничивают использование препаратов группы в рутинной клинической практике – по результатам 2 различных наблюдений лишь 25-45% специалистов применяют ГКС [146, 147]. Все это доказывает неудовлетворенность сообщества специалистов в современном арсенале эффективных средств для борьбы с АБП из группы ГКС наряду с потребностью в простых и информативных биомаркерах прогноза возможного ответа пациентов на ГКС терапию [147-149].

Активный вирусный гепатит В, активный туберкулез являются противопоказаниями для использования ГКС у пациентов с АБП [150]. Несмотря на то, что вирусный гепатит С потенциально может ухудшать исходы алкогольного гепатита [151-153], нет убедительных доказательств и того, что 4-недельная курсовая терапия ГКС может повысить репликацию вируса гепатита С или что вирусная инфекцию каким-то образом повлияет на ответ на ГКС. Активная инфекция, септический процесс, неконтролируемый СД, желудочно-кишечное кровотечение являются относительными противопоказаниями для назначения ГКС. В этой ситуации к лечению можно приступить незамедлительно после устранения противопоказания. Например, в исследовании Louveti соавт. (2009) было показано, что у пациентов с адекватным контролем инфекции эффект ГКС не отличался от такового в группе лиц без инфекционного процесса [154]. Несмотря на это, риск возникновения инфек-

ционного процесса вследствие ослабления иммунного ответа под действием ГКС является серьезным опасением у пациентов с АБП [155].

В объединенном анализе, включавшем 12 рандомизированных исследований, было показано, что риск инфекционных осложнений у пациентов при курсовом назначении ГКС, в том числе с формированием грибковых патологических процессов, составляет 20% [156]. В одном из исследований, включавших пациентов с высоким содержанием в крови бактериальной ДНК (более 18,5 пг/мл), профилактическое применение противомикробных лекарственных средств повышало выживаемость пациентов с АБП и терапией ГКС [157].

Ингибитор фосфодиэстеразы (ФДЭ) пентоксифиллин подавляет активность ФНО-альфа – одного из важнейших цитокинов, принимающих участие в патогенезе АБП [158, 159]. Как и в первом клиническом исследовании, включавшем использование препарата в дозе 400 мг 3 раза в сутки [160], последующие рандомизированные клинические исследования не показали влияния приема препарата на выживаемость пациентов с тяжелой АБП [161-164]. Однако у препарата доказано снижение риска поражения почек, а также вероятности смерти пациентов в результате гепаторенального синдрома [160, 165]. Несмотря на подавление активности ФНО-альфа у препарата не было доказано влияния на концентрацию цитокина в крови и его продукцию [160]. Преимущества пентоксифиллина перед ГКС не являются очевидными и существуют противоречивые сведения по результатам сравнительных исследований [166, 167, 168]. Препарат не продемонстрировал эффективности как альтернативное средство выбора при неэффективности ГКС у пациентов с фульминантным гепатитом [169, 170]. По данным мета-анализа, проведенного на основе 10 рандомизированных исследований, месячный курс пентоксифиллина не приводил к повышению выживаемости пациентов, однако частота развития гепаторенального синдрома снижалась до 53% [171], при этом механизм данного эффекта препарата остается невыясненным [172].

Перспективным направлением поиска эффективных гепатопротекторов при АБП являются вещества из группы ингибиторов ФНО-альфа. В экспериментальных исследованиях и пилотном клиническом исследовании высокую эффективность показали инфликсимаб и этанерцепт [173-176], однако проведение рандомизированных исследований у пациентов с алкогольным гепатитом было приостановлено ввиду большого числа смертельных исходов в основной группе в связи с развитием тяжелых инфекционных процессов [177-179].

Поскольку оксидативный стресс является ключевым патогенетическим звеном в формировании АБП, различные препараты антиоксидантной активностью исследовались на предмет выявления у них терапевтической активности при АБП. Так, в частности, антиоксидантный коктейль и витамин Е не показали высокой эффективности в лечении алкогольного гепатита [180-183]. Внутривенное введение ацетилцистеина продемонстрировало повышение месячной выживаемости у пациентов с тяжелой АБП в качестве адъювантной терапии с ГКС при проведении многоцентрового рандомизированного контролируемого исследования [184]. Однако, через 3 и 6 мес. после введения эффект препарата на продолжительность жизни пациентов полностью нивелировался.

Нарушение метаболизма метионина подтверждено многочисленными исследованиями при АБП. При этом, основной фермент, метаболизирующий данную аминокислоту до ее активного продукта S-аденозилметионина, метионин аденозилтрансфераза, высоко чувствителен к ингибирующему действию продуктов перекисного окисления липидов и дефициту глутатиона [185], а также гипоксии печени [185].

В экспериментальных исследованиях была показана высокая активность S-аденозилметионина при алкоголь-индуцированном, парацетамолом повреждении печени, галактозаминозом и тетрахлоркарбонным гепатитом [185-187]. Лабораторным путем было установлено, что препарат обладает мультицентрическим эффектом, обладая антиоксидантной активностью, высту-

пая как донатор метильных групп, ингибитор ФНО-альфа и донатор глутатиона [188]. В клинических исследованиях установлено, что назначение 1200 мг препарата приводит к повышению выживаемости пациентов, а также улучшением функции органа [189].

Регенеративный потенциал печеночной ткани, в основе которого лежит миграция стволовых клеток костного мозга и печеночных клеток-предшественников, является определяющим при обсуждении исходов у пациентов с фульминантным алкогольным гепатитом при АБП [190, 191]. К веществам, способным активировать данный процесс, относятся инсулин и глюкагон [192, 193], анаболические стероиды и оксандролон [194], пропилтиурацил [195, 196], однако в рамках проводимых исследований ни один из перечисленных фармакологических агентов не показал значимого терапевтического эффекта.

В проведенных недавно исследования были получены обнадеживающие результаты использования колониестимулирующих факторов, таких как препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и эритропоэтина. Препараты оказывали выраженное гепатопротекторное действие, снижали частоту инфекционных осложнений и повышали выживаемость пациентов с АБП [197, 198].

Таким образом, проблема фармакологической коррекции АБП далека от своего разрешения, как остаются не изученными молекулярно-биологические процессы, лежащие в основе формирования патологических процессов при алкоголь-ассоциированном поражении печени, что обуславливает актуальность выявления значимых морфофункциональных ассоциаций при разработке перспективных терапевтических стратегий при АБП.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Концепция представленной диссертационной работы построена на основе аргументированного предположения о способности органических, а также магнийсодержащих, солей природных метаболитов – аминокислот – предотвращать индуцированные этиловым алкоголем деструктивные процессы в ткани печени и ассоциированные с ними нарушения функциональной активности органа. При проведении теоретических построений, планировании исследования, проработке методологических и методических подходов к его выполнению основывались на таких принципах научного познания, как принципы адекватности, комплексности, целостности, внутреннего единства, необходимого и достаточного.

2.1 Дизайн исследования

Поскольку настоящий диссертационный проект выполнен на стыке морфологических и фармакологических наук, реализация принципа внутреннего единства требовала привлечения различных экспериментальных и лабораторных методов исследования. В этой связи работа выполнялась в несколько этапов. Схематизированный дизайн исследования иллюстрирован рисунком 2.5.

Первый этап работы был посвящен реферированию отечественных и зарубежных литературных источников для выработки концепции исследования, отвечающей современным достижениям медицинской науки в области экспериментальной и клинической гепатологии, понимания ключевых механизмов повреждающего действия этилового спирта на печень млекопитающих и человека. На данном этапе была проанализирована взаимосвязь между активацией или депрессией ключевых внутри- и межклеточных сигнальных систем и морфологическими изменениями печеночной паренхимы на различных уровнях организации материи – субклеточном, клеточном, тканевом и органном. Были также установлены и идентифицированы потенциальные

биомишени, воздействие на которые может эффективно предупреждать молекулярно-биологические изменения в печени, влекущие за собой нарушения её основных функций.



Рисунок 2.5 Дизайн исследования по изучению морфофункциональной характеристики печени при остром алкогольном поражении на фоне профилактического фармакологического воздействия

Также в рамках аналитического этапа настоящего исследования был проработан его план, составлены подробные экспериментальные протоколы с учетом описаний применяемых лабораторно-экспериментальных методов и требований национальных регулирующих органов к выполнению работ с использованием животных и биологического материала. На данном этапе осуществлена биоэтическая экспертиза протоколов диссертационного исследования и получено разрешение на его проведение.

Основной задачей второго этапа диссертационного проекта было обоснование использования как морфологических, так и функциональных – фармакологических и биохимических методов исследования, которые бы позволили достичь поставленных в работе цели и задач.

Кроме того, важнейшим вопросом, требовавшим разрешения на втором этапе, был выбор оптимальной модели острого алкогольного поражения печени. Сложность выбора была продиктована сохраняющейся до настоящего времени дискуссией в мировой и отечественной литературе по вопросу об адекватности моделирования острого алкогольного гепатита условиям реальной клинической практики. В связи с этим за основу нами были взяты два фундаментальных источника – статью «Invivoand invitromodelsof acutealcohol exposure» DolganiucandSzabo, увидевшую свет в 2009 [13] и «Методические рекомендации по изучению гепатопротективной активности лекарственных средств» А.И. Венгеровского и соавт. (2012) [14].

Эксперимент включал моделирование алкогольного поражения печени, забор у экспериментальных животных, выведенных из опыта под наркозом, печени для проведения морфологического, ИГХ исследования и ИФА, определения активности тканевого ПОЛ, а также крови для биохимических исследований.

На третьем этапе исследования проведено комплексное морфологическое исследование печени животных с острым алкогольным поражением органа. Оценена макроструктура, измерена и рассчитана абсолютная и относительная масса печени животных опытных и контрольных групп. Проведена

сравнительная оценка микроструктурных изменений ткани печени в зависимости от вида профилактического фармакологического воздействия. На данном этапе работы было чрезвычайно важно установить молекулярно-клеточные механизмы, вовлеченные как в патологический процесс, так и в механизм гепатозащитного действия фармакологических агентов, в связи с чем были использованы иммуногистохимические методы исследования ключевых биологических маркеров программируемой гибели клеток и их пролиферации, а также методы иммуноферментного анализа для оценки вовлеченности сигнальных путей с участием ФНО-альфа, ИЛ-10 и ФРГ в патологический процесс.

На четвертом этапе диссертационного исследования были изучены биохимические маркеры алкогольного поражения печени наряду с некоторыми показателями, определяющими функциональную активность органа. Также в рамках этапа был изучен один из важнейших механизмов, участвующих в реализации алкогольного повреждения печени – свободнорадикальная липопероксидация и антиокислительный потенциал ткани методами определения ТБК-зависимых продуктов ПОЛ, активности антиоксидантных ферментов в плазме и ткани, а также методом индуцированной хемилюминисценции в модельной системе.

На пятом – завершающем – этапе работы была проведена математико-статистическая обработка полученных экспериментально-лабораторных данных, с использованием функциональных возможностей методов логистической регрессии и отношения шансов были проанализированы взаимосвязи полученных морфологических и функциональных изменений, а также вклад отдельных факторов в реализацию гепатопротекторной активности исследуемых веществ при остром алкогольном поражении печени.

2.2 Следование биоэтическим процедурам и нормативным актам

На заседании Локального этического комитета при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования

«Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» от 13 ноября 2017 года, протокол №56 были рассмотрены материалы настоящего диссертационного проекта и дано заключение об их соответствии с нижеследующими законодательными и иными нормативно-правовыми актами Российской Федерации, а также международных организаций, осуществляющих контроль за исследованиями в области биологии и медицины с использованием позвоночных теплокровных животных и биологического материала:

1. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 г. №61-ФЗ (действующая редакция);

2. «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или иных научных целях», Страсбург, 1986 (с изменениями в соответствии с положениями Протокола Совета Европы (СЕД №170) от 05.12.2005;

3. Директива Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. о сближении Законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ ЕЕС);

4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»;

5. ГОСТ 33044-2014«Принципы надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт Российской Федерации);

6. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, соответствующий «Guidelinesforaccommodationandcareofanimals.Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits»)от 01.07.2016 г.;

7. Методические рекомендации по изучению гепатопротективной активности лекарственных средств / А.И. Венгеровский, В.В. Удут, Д.В. Рей-

харт, А.М. Дыгай. – В кн. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и Ко, 2012. – С. 710-719.

В соответствие с принятыми стандартами экспериментальные и лабораторные исследования выполнялись в соответствие с СОП лабораторий экспериментальной морфологии и специфической активности лекарственных средств Центра перспективных исследований инновационных лекарственных средств университета.

2.3 Материал исследования

2.3.1 Характеристика лабораторных животных и условий их содержания, 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. На всех животных были получены ветеринарные сертификаты. Крысы, включенные в исследование, прошли двойной ветеринарный контроль: при отгрузке из питомника и при поступлении в экспериментально-биологическую клинику Мордовского университета. Для реализации поставленных в работе задач животные были разделены на несколько групп (рис. 2.6).

Поскольку одним из требований, предъявляемых к результатам научного исследования, является требование получения репрезентативных данных, при определении объема экспериментальных групп исходили из положений медико-биологической статистики, а также многолетнего опыта проведения исследований на животных в нашей стране и за рубежом. Каждая группа включала по 20 крыс: в каждой группе было 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. Так, при



Рисунок 2.6 Формирование контрольных и опытных групп в исследовании

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 микроморфологического 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, второй – для изучения системных свободнорадикальных процессов.

При поступлении из питомника каждое животное партии было осмотрено ветеринарным врачом и помещено в карантинное отделение вивария университета, где содержалось в группе с животными только своей партии. Длительность карантинизации при постоянном контроле внешнего вида и поведенческих реакций грызунов составляла не менее 14 суток. Фактов внеэкспериментальной гибели животных до их включения в контрольные или опытные группы не фиксировали.

Для создания комфортных условий в соответствие с требованиями соответствующего ГОСТ животным устанавливались следующие характеристики микроклимата: температура воздуха в помещении с клетками животных – в диапазоне от 20 до 24⁰С при относительной влажности воздуха 51-56%. Лабораторные грызуны содержались при групповом типе размещения в соответствие с их включением в определенную контрольную или опытную серию, при котором в полиуретановых клетках (типа R₁) можно содержать от 5 до 10 животных с учетом их половой принадлежности. Клетки были сконструированы таким образом, что их верхняя – решетчатая – часть, изготовленная из нержавеющей стали, оборудована специальными приспособлениями из недеградируемых полимерных материалов для обеспечения свободного и бесперебойного доступа к питьевой воде и твердому экструдированному корму.

Через 3-5 дней в каждой клетке проводили смену подстила, в качестве которых применяли среднего размера стружку из твердых лиственных пород древесины (производства ООО «Лабораторкорм», Москва). В той же организации приобретали сухой твердый экструдированный универсальный корм для мышей и крыс, изготовленный в соответствии с прописью ПК-120-1. Поили животных в режиме свободного доступа (за исключением периодов выведения животных из эксперимента) водопроводной водой с помощью специальных полимерных поилок с насадками из нержавеющей стали. Термическую обработку металлических элементов клеток и оборудование, а также их мытье проводили не реже 1 раза в 14 суток.

Вывод лабораторных крыс из эксперимента проводили гильотинным способом под общей анестезией после прижизненного получения образцов крови из полости левого желудочка. Анестезиологическое пособие включало ингаляционное введение галотана с помощью наркозной приставки к аппарату ИВЛ для мелких лабораторных грызунов «ТОРО» производства KentScientific(США).

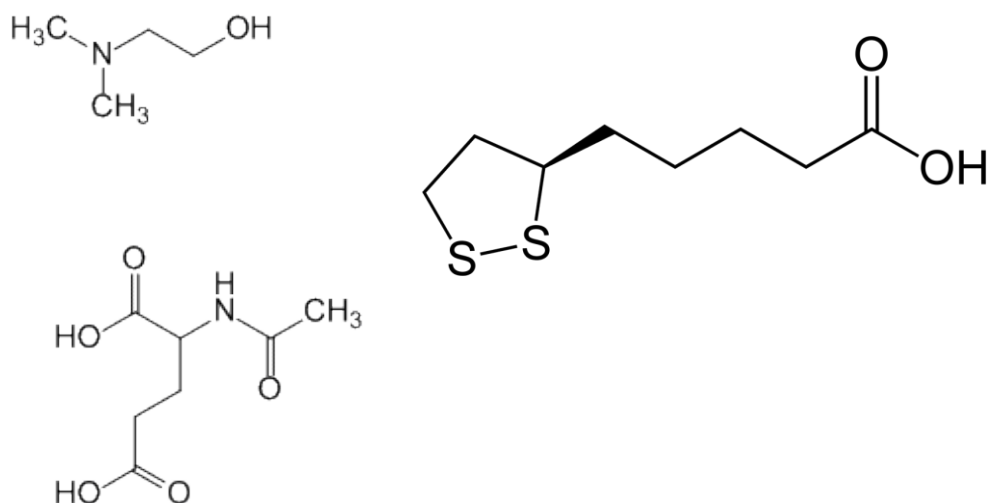
2.3.2 Используемые в работе лекарственные вещества, реактивы, диагностические наборы и антитела

В работе изучили гепатопротекторное действие двух оригинальных лекарственных веществ в виде фармацевтических субстанций (рис. 2.7), разработанных в отделе химии и технологии синтетических лекарственных средств АО «ВНЦ БАВ» (Россия) и предоставленных нам для исследования¹.

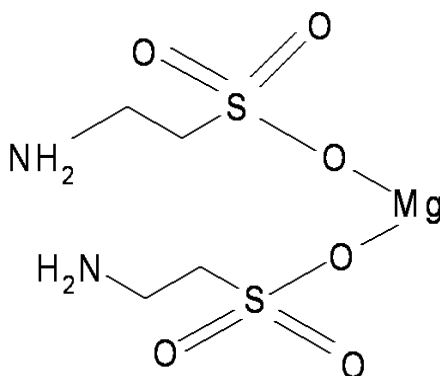
Первое вещество – представляет собой магнийсодержащую соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты, заключенную в циклическую структуру – магния бис-ацетаминоэтансульфонат (лабораторный шифр – ЛБК-527). Второе вещество является стабильной фармацевтической композицией деанола ацеглумата с альфа-липоевой кислотой (лабораторный шифр разработчика

¹Выражаем искреннюю благодарность лауреату Государственной премии РФ, д.х.н., профессору С.Я. Скачиловой за предоставленные для исследования субстанции веществ

ЛХТ-8-16), в 1 г которой содержится по 250 мг каждого из действующих веществ.



Фармацевтическая композиция деанола ацеглумата и липоевой кислоты
(лабораторный шифр ЛХТ-8-16)



Магния бис-ацетаминэтансульфоноат
(лабораторный шифр ЛБК-527)

**Рисунок 2.7 Химические структуры лекарственных веществ,
включенных в исследование**

Включенные в диссертационную работу соединения и композиции использовались в виде фармацевтических субстанций. Они представляли собой белый мелкокристаллический порошок без запаха (или, в случае с ЛБК-527, с легким запахом сероводорода), хорошо растворимые в воде. Поскольку во

всех экспериментальных группах использовался внутрижелудочный путь введения, необходимое количество вещества смешивали с 2% крахмальным клейстером *extempore*.

Поскольку использование в качестве объекта исследования фармакологически активных веществ с ранее неустановленной активностью на исследуемой модели требует сравнения с эталоном, на всех этапах настоящего диссертационного проекта использовали препараты сравнения.

Разделы работы по изучению морфофункциональных изменений печени крыс выполнены с использованием в качестве препарата сравнения гепатопротектора S-аденозил-L-метионина 1,4-бутандисульфат, выпускающееся зарубежной фармацевтической промышленностью под коммерческим названием «Гептрал»[®], проявляющее гепатопротекторное действие при лекарственном, токсическом и алкогольном гепатите [200-203]. В работе использовали официальную лекарственную форму препарата 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.

Исследуемое соединение, фармацевтическую композицию и препараты сравнения 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 S-аденозил-метионина в течение недели. Как уже упоминалось ранее все лекарственные формы вводились через специальный зонд в 2% крахмальном геле в общем объеме 0,8-1,0 мл, допустимом для внутрижелудочного введения данному виду животных [204, 205]. Для воспроизведения острого алкогольного гепатита использовали спирт этиловый ректификованный 96% и дважды дистиллированную воду, приготовляемую с использованием дистиллятора "Liston-1210".

Таблица 2.1

Характеристика диагностических систем и наборов антител, использующихся при проведении морфологических и биохимических исследований

№ п/п	Название диагностической системы	Страна-производитель	Каталожный номер	Объем / Количество определений
1	2	3	4	5
<i>Иммуногистохимическое исследование</i>				
1.	Mouse Monoclonal Anti-Ki-67 (Clone MM1) (K-2), IgG ₁ , Novo Castra	Великобритания	ACK02	100 мкл
2.	Rabbit Polyclonal IgG Bcl-2 Antibody (C21) Santa Cruz	США	sc-783	50 мкл
3.	Rabbit Polyclonal Anti-Caspase 3 (dilution 1:100) clone ES87 Genetex	Германия	MS-1123-R1	1 мл
4.	Mouse Monoclonal Proliferating Cells Nuclear Antigen (PCNA) клон PC100 Dako	Дания	MS-1123-R1	1 мл

Таблица 2.1 (продолжение)				
1	2	3	4	5
<i>Иммуноферментный анализ</i>				
5.	RatTNF-aELISAKIT, CUSABIOBIOTECH-Co., LTD	США	J29153487	96
6.	Rat Interleukin 10 (IL10) ELISA KIT, CUSABIOBIOTECHCo., LTD	США	N06153483	96
<i>Биохимические исследования</i>				
7.	Rat Hepatocyte Growth Factor (HGF) ELISA KIT, CUSABIOBIOTECHCo., LTD	США	L06153486	96
8.	Щелочная фосфатаза – ALP-PIII, FUJIGRI-CHEM	Япония	120208	20
9.	Общий билирубин – TBIL-PIII, FUJIGRI-CHEM	Япония	407412	20
10.	ГГТП – GGT-PIII, FUJI GRI-CHEM	Япония	133611	20
11.	АСТ – GOT/AST-PIII, FUJI GRI-CHEM	Япония	450111	20
12.	АЛТ – GPT/ALT-PIII, FUJI GRI-CHEM	Япония	465011	20
13.	Общий белок – ALB-P, FUJIGRI-CHEM	Япония	113913	20

При изучении концентрации ферментов цитолиза – аланиновой и аспарагиновой трансаминаз, гамма-глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, общего белка, общего билирубина в сыворотке крови лабораторных животных использовали диагностические наборы «FUJI-FILM» (Япония), краткая характеристика которых представлена в таблице 2.1.

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных антител мыши производства «NovoCastra» (Великобритания) и поликлональных кроличьих антител производства компании «SantaCruz» (США), в качестве первичных антител использовали кроличьи антитела к каспазе 3 и мышинные антитела к PCNA (Dako, Дания). Для определения концентрации цитокинов – интерлейкина-10, фактора некроза опухолей-альфа и фактора роста гепатоцитов использовали наборы диагностикумов, разработанных для исследовательских целей CUSABIOBIOTECHCo., LTD(США).

2.4 Модель острого алкогольного поражения печени

Для воспроизведения острого алкогольного повреждения печени использовали метод, описанный DolganiucandSzabo (2009) и А.И. Венгеровским и соавт. (2012).

ПРОТОКОЛ ЭКСПЕРИМЕНТА. Половозрелую особь белой нелинейной крысы самца или самки исходным весом 180-220 г маркировали с помощью специального маркера. С помощью зонда G24, введенного на глубину 3,5-4,0 см через ротовую полость внутрижелудочно вводили 40% водный раствор спирта этилового ректифицированного, приготовленный *extempore* 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). Животные разного пола содержались изолированно. Крыс не ограничивали в доступе к корму и воде в течение всего наблюдения. Животным интактного контроля в указанное время вводили

внутрижелудочно 3 мл 0,9% изотонического раствора хлорида натрия. Исследуемое вещество ЛБК-527, фармацевтическую композицию ЛХТ-8-16 или референтное лекарственное средство вводили внутрижелудочно через зонд за 1 час до введения раствора этилового алкоголя в общем объеме, не превышающем 1,5 мл, на протяжении всего эксперимента. На восьмые сутки алкоголь и лекарственное вещество не вводили; животное после взвешивания на электронных весах «ACCULAB» (США) иммобилизовывали на подогреваемой площадке от аппарата неинвазивной регистрации АД «CODA», под легким эфирным наркозом проводили интубацию трахеи, переводили на искусственную вентиляцию. Под галотановым наркозом вскрывали грудную клетку и забирали 3,5-4 мл артериальной крови из полости левого желудочка для проведения иммуноферментного и биохимического раздела работы. После чего животное выводили из эксперимента, печень извлекали, взвешивали, фотографировали и осуществляли подготовку для гистологического исследования (см. параграф 2.6).

2.5 Методы исследования

2.5.1 Морфологические методы исследования

В рамках настоящего исследования проводили анализ макроскопических и микроскопических изменений печени животных. Материалом для морфологического исследования служила печень крыс исследуемых групп и разделенных на две подгруппы случайным образом, взятая на 8 сутки после выведения животных из эксперимента. Из печени каждого животного первой подгруппы получали по одному блоку для микроморфологического и иммуногистохимического исследования, у каждого животного второй подгруппы получали образцы свежей печени для гистохимического исследования. При макроморфологическом 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.

2.5.1.1 Гистологическое исследование печени

Фрагменты из центральных участков печени животных размером до 1 см³ забирали и фиксировали в нейтральном забуференном 10% растворе формалина на протяжении не менее, чем 24 и не более, чем 48 часов. 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 «ЕС350» (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, проводили наклеивание изна предметные стекла влажным способом и высушивание при температуре 37 °С не менее 48 часов в термостате. Для последующего гистологического окрашивания гематоксилином и эозином осуществляли депарафинирование и регидратацию препаратов в колонке реагентов в следующей последовательности:

Ксилол – 2 смены по 7 минут

Абсолютный этиловый спирт – 5 мин

Этиловый спирт 96% – 5 мин

Вода дистиллированная – от 5 до 10 мин

Окрашивание гематоксилином и эозином. Проводили окрашивание по Хеллендахелю, для чего депарафинированные предметные стекла с препаратами печени крыс помещали в емкость, содержащую квасцовый гематоксин Карацы (время экспозиции 1,5-2,0 мин) с последующей промывкой в проточной водопроводной воде. После проведения окрашивания эозином (время экспозиции – 0,5 мин) препараты промывали дважды дистиллированной водой, обезвоживали с использованием 96% этилового спирта (экспози-

ция 1 мин) и просветляли (использовали ксилол в течение 0,5 мин). После проведения описанных манипуляций препарата накрывали покровным стеклом с канадским бальзамом.

Окрашивание суданом-III. Проводили окрашивание по методу О.В. Волковой и Ю.К. Елецкому (1982). Замороженные срезы свежей нефиксированной печени крыс помещали в 50% этанол на 5-6 мин, затем в течение 5 минут выдерживали в щелочном растворе судана-III, ополаскивали в 50% растворе этилового спирта и промывали в дистиллированной воде. После этого производили окрашивание ядер гематоксилином Эрлиха и заключали в глицерин-желатин.

2.5.1.2 Морфометрический анализ

Визуализацию изображений осуществляли с использованием светового микроскопа марки «OLYMPUSBX51» (Япония). Морфометрию срезов печени анализировали с помощью программы анализа изображений «ImageScopeColor» и «cellSensStandart» (Россия). С этой целью проводили микrofотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой «OLYMPUSXCOLYMPUSXC-30» (Япония) на базе микроскопа «OLYMPUSBX51» (Япония) при увеличении окуляра SWHx10 и объективов UPLanFL 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 следующую оценочную шкалу[208]:

0 – отсутствуют признаки воспалительной реакции и дистрофических явлений гепатоцитов;

+ – воспалительный процесс и дистрофия охватывают не более 33% паренхимы печени;

++ – воспалительный процесс и дистрофические явления в гепатоцитах распространяются на площадь, равную 33-66% паренхимы органа;

+++ – более 66% площади паренхимы печени вовлечены в воспалительно-дистрофический процесс.

Для характеристики активности воспалительной реакции, вызванной воздействием токсических доз этилового алкоголя, пользовались шкалой Кноделя, согласно которой суммарный индекс формируется сложением баллов, получаемых по следующим категориям: 1) periportalный или мостовидный некроз (0 – 10 баллов); 2) некроз долей печени (0 – 4 балла); 3) портальное воспаление (0 – 4 балла); 3) фиброз (0 – 4 балла). Интерпретация суммарного индекса осуществлялась следующим образом:

0 – отсутствие воспаления;

1 – 4 – воспаление минимально;

5 – 8 – небольшое воспаление;

9 – 12 – умеренное воспаление;

13 – 18 – значительное воспаление.

2.5.1.3 Иммуногистохимический метод исследования

Основной задачей использования иммуногистохимического исследования в настоящей работе было определение экспрессии биологических маркеров программируемой гибели печеночных паренхиматозных клеток и активности пролиферативно-регенераторных процессов в органе. В качестве маркеров апоптоза применяли Bcl-2 и каспазу-3 [209], в качестве биомаркеров клеточной пролиферации и регенерации органа использовали Ki-67 и PCNA [221].

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. Демаскировку проводили в водяной бане с микропроцессором BioOptica (Милан, Италия): срезы были депарафинированы в ксилене, затем подвергались регидратации в серии спиртов различной концентрации и затем инкубированы в 3% перекиси водорода.

Все дальнейшие этапы проведения иммуногистохимической реакции для предотвращения высыхания срезов проводились во влажной камере SlideMaster (BioOptica, Милан, Италия). Для блокировки эндогенной пероксидазы стекла инкубировали в течение 15 минут с 3% раствором H_2O_2 , после чего срезы ополаскивали в фосфатном буфере (pH 7,0-7,6) и для блокирования неспецифических белковых взаимодействий инкубировали с Ultra-V-Block (LabVision, USA) в течение 30 минут.

По окончании инкубации излишки реагента аккуратно стряхивали со стекол и наносили первичные антитела. В качестве первичных антител использовали кроличьи антитела к каспазе 3 (клон E87) (Genetex, разведение 1:100) и Bcl-2 (клон C21) (SantaCruz, США), и мышинные антитела к Ki-67 (клон MM1) (NovoCastra, Великобритания) и PCNA (клон PC10) (Dako, разведение 1:100). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 30 минут согласно предусмотренной фирмой производителем спецификации к антителу.

После завершения инкубации срезы тщательно отмывали в фосфатном буфере (pH 7,0-7,6) от первичных антител, не связавшихся с эпитопами. Для выявления первичных антител, связавшихся с соответствующими антигенами, использовали универсальную полимерную систему Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Nichirei, Япония), содержащую декстрановый каркас с многократно присоединенными молекулами фермента пероксидазы хрена и вторичными антителами к антимышиным и антикроличьим иммуноглобулинам (Ig). Время инкубации срезов с полимерной системой детекции во влажной камере составляло 30 минут.

По окончании инкубации срезы ополаскивали в фосфатном буфере (pH 7,0-7,6). Для визуализации места связывания антитела с антигеном использовали реакцию окисления субстрата 3,3-диаминобензидина (ДАБ) пероксидазой хрена в присутствии перекиси водорода с образованием нерастворимого в органических растворителях конечного продукта реакции, который был виден в виде коричневого окрашивания специфических структур клеток (N-Histofine® DAB-2V, Nichirei, Япония).

В зависимости от необходимой (желаемой) интенсивности окрашивания срезы инкубировали с ДАБ в течение 5-10 минут. Далее стекла ополаскивали в дистиллированной воде и подкрашивали ядра гематоксилином в течение 2-3 минут. После этого стекла дегидратировали в ряде, состоящем из дистиллированной воды, спиртах восходящей концентрации (70%, 80%, 95%, абсолютный спирт) и 3-х ксилолов. После чего срезы покрывали покровными стеклами с использованием синтетической среды BioMount.

При постановке иммуногистохимических реакций в обязательном порядке ставили положительные и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей брали образцы исследуемых срезов, которые подвергались стандартной процедуре ИГХ исследования, но без добавления первичных антител. Положительные контроли для каждого антитела выбирали в соответствии со спецификациями от фирмы производителя.

Анализ иммуногистохимической реакции производили в 6 полях зрения (по 3 поля из центролобулярных и по 3 – из периферических отделов печеночной дольки) при увеличении $\times 400$. 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 об-

щему числу ядер в исследуемых областях, и полученное отношение выражали в процентах.

2.5.2 Биохимические методы исследования

В рамках исследования активности цитолитического и холестатического синдромов, белоксинтетической функции, а также состояния пигментного обмена на 8-е сутки эксперимента в плазме крови животных первой подгруппы 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 4000 производства компании FUJI-FILM (Япония) производительностью 77 тестов в час с использованием диагностических слайд-систем «FUJIDRI-CHEM» (Япония) (таблица 2.1).

Приготовление образцов сыворотки крови. 3,5-4,0 л крови, взятой из полости левого желудочка крыс, помещали в пластиковые гепаринизированные пробирки и после многократного перемешивания и выдерживания в холодильнике при 4⁰С в течение 1 часа центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливали и с помощью микропипетки заливали 0,1 мл в специальный одноразовый пластиковый контейнер от биохимического анализатора.

Диагностические тест-системы разработаны на основе следующих биохимических методов определения исследуемых веществ:

1) *Метод определения активности АЛТ в сыворотке крови унифицированным методом Reitman-Frankel [210].* Сущность метода заключается в образовании L-глутаминовой кислоты и пирувата в результате реакции трансминирования, протекающей между альфа-кетоглутаровой кислотой и L-аланином при участии АЛТ. Добавление 2,4-динитрофенилгидразина в реакционную среду приводит к образованию дающих окрашивание в щелочной среде гидразонов пирувата. Интенсивность цветового окрашивания прямо

пропорциональна уровню ферментативной активности АЛТ, выраженной в U/л, где 1 U/л соответствует 16,67 нмоль/(с х л).

2) *Метод определения активности АСТ в сыворотке крови унифицированным методом Reitman-Frankel [210].* Сущность метода заключается в образовании L-глутаминовой кислоты и оксалоуксусной кислоты в результате реакции трансаминирования, протекающей между альфа-кетоглутаровой кислотой и L-аспарагиновой кислотой при участии АСТ. Добавление 2,4-динитрофенилгидразина в реакционную среду приводит к образованию дающих окрашивание в щелочной среде гидразонов пирувата и оксалоуксусной кислоты. Интенсивность цветового окрашивания прямо пропорциональна уровню ферментативной активности АСТ, выраженной в U/л, где 1 U/л соответствует 16,67 нмоль/(с х л).

3) *Унифицированный колориметрический метод определения активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) в сыворотке крови [211].* Сущность метода основана на определении количества 4-нитроанилида, образующегося в результате каталитического – с помощью ГГТП – переноса с L-гамма-глутамилнитроанилида L-гамма-глутамилового остатка на глицилглицин. Интенсивность цветового окрашивания прямо пропорциональна уровню ферментативной активности ГГТП, выраженной в U/л, где 1 U/л соответствует 16,67 нмоль/(с х л).

4) *Унифицированный метод Bessey, Lowry and Brock [212] для определения активности ЩФ в сыворотке крови.* Результатом ферментативной деградации пара-нитрофенилфосфата является получение пара-нитрофенола, дающего желтое окрашивание в щелочной среде. Интенсивность цветового окрашивания прямо пропорциональна уровню ферментативной активности ГГТП, выраженной в U/л, где 1 U/л соответствует 16,67 нмоль/(с х л).

5) *Метод Ендрассика-Грофа [211] для определения сывороточной концентрации общего билирубина.* Сущность метода состоит в реакции общего билирубина, образованного при его диссоциации с участием кофеинового реагента, с сульфаниловой диазотированной кислотой.

6) Метод [211] количественного определения общего белка в сыворотке крови. Сущность метода заключается в фотоколориметрическом измерении интенсивности окрашивания продукта реакции связывания с белком оранжевого красителя G250 Кумассипри трансформации его в синий. Диапазон поглощения колеблется при этом от 465 до 595 нм. Показатель выражается в г общего белка на 1 л сыворотки крови.

2.5.3 Иммуноферментный метод исследования концентрации ФНО-альфа, ИЛ-10 и ФРГ

Для определения роли активации или подавления ключевых сигнальных систем в патологический процесс алкогольного поражения печени на фоне профилактического введения магния бис-ацетаминотансульфоноата (ЛБК-527) и фармацевтической комбинации деанола ацеглумата и альфа-липоевой кислоты (ЛХТ-8-16) изучили тканевые концентрации ведущего пускового фактора печеночного воспаления – фактора некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа), цитокина с противовоспалительной активностью – ИЛ-10, а также фактора роста гепатоцитов (ФРГ), ответственного за активацию регенераторных процессов и клеточной дифференцировки, с помощью метода иммуноферментного анализа.

ПРИНЦИП МЕТОДА. В основу теста положен количественный твердофазный иммуноферментный анализа типа «сэндвич». Микропланшет на 96 измерений, входящий в составе набора, покрыт специфическими моноклональными антителами к ФНО- α , ИЛ-10 или ФРГ крысы. В ходе реакции в отдельные лунки микропланшета вносили стандарты и образцы. ФНО- α , ИЛ-10 или ФРГ, присутствующие в пробах стандартов и образцов, связываются с иммобилизованными антителами. После промывки несвязавшиеся компоненты удаляли, и в каждую лунку микропланшета вносили конъюгат поликлональных антител к ФНО- α , ИЛ-10 или ФРГ с биотином. После промывки в каждую лунку вносили комплекс авидин – пероксидаза хрена (HRP). После промывки и удаления несвязанного авидин-ферментного комплекса, в лунки

вносили хромогенный субстрат. Интенсивность окраски была прямо пропорциональна количеству ФНО- α образца, ИЛ-10 или ФРГ. Цветную реакцию останавливали и измеряли интенсивность окраски.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ. Приготовление тканевого гомогената. 100 мг ткани печени крысы промывали однократно буфером PBS, гомогенизировали в 1 мл 1х PBS и хранили в течение ночи при -20°C в морозильной камере «SANYO» (Корея). После двух циклов размораживания и повторного замораживания и размораживания происходило разрушение клеточных мембран, и гомогенаты центрифугировали в течение 5 минут при 5000 g и температуре 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Супернатант отделяли немедленно и исследовали. Аликвоты хранили при температуре -80°C в морозильной камере того же производителя. Избегали повторного размораживания образцов. При необходимости, перед исследованием размороженных образцов их центрифугировали.

Использовали исследовательский диагностический набор производства CUSABIOBIOTECH Co., LTD (США), более детальная информация о котором, представлена в таблице 2.1. Предельный диапазон обнаружения и единицы измерения – ФНО- α - 6,25 – 400,0 пг/мл, ИЛ-10 – 3,12 – 200,0 пг/мл, ФРГ – 0,12 – 5,0 пг/мл.

Для исследования использовали автоматический микропланшетный ридер StatFax 4200 (США).

2.5.4 Методы исследования активности свободнорадикальных процессов в печени и крови

О состоянии перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по уровню малонового диальдегида (МДА), железо-индуцированного малонового диальдегида (Fe-МДА) и активности каталазы в крови, а в гомогенатах тканей печени крыс определяли еще и активность фермента супероксиддисмутазы (СОД). Кровь забирали на 8 сутки эксперимента из левого желудочка наркотизированных крыс второй подгруппы каждой исследуемой группы. Печень для гомогенизирования также забирали у крыс второй подгруппы

животных в каждой исследуемой группе.

Определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови и гомогенатах печени крыс проводили путем измерения содержания малонового диальдегида (МДА) и Fe-индуцированного МДА (с добавлением FeSO_4) в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с использованием набора реактивов для определения ТБК-активных продуктов фирмы «Агат-Мед» (Москва) по стандартной методике, включающей в себя инкубацию с ТБК исследуемой пробы, экстракцию продуктов реакции бутанолом и спектрофотометрическое измерение их содержания.

Методика определения активности каталазы в изучаемой среде по М.А. Королюк (1988). Сущность метода заключается в химической реакции между перексидом водорода и молибденово-кислым аммонием в неокрашенных или слабо-окрашенных растворах.

Активность супероксиддисмутазы определяли по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия супероксидом, образующимся при взаимодействии феназинметасульфата и восстановленного никотинамидаденин фосфата.

Метод исследования антиокислительной активности ткани печени крыс. Определение интенсивности ПОЛ и антиокислительной активности (АОА) в гомогенате ткани печени крыс хемилюминесцентным методом [213]. Метод индуцирования хемилюминесценции перекисью водорода с сульфатом железа основан на том, что в представленной системе происходит каталитическое разложение перекиси ионами металла переходной валентности (2-х валентный катион железа). Образующиеся при этом свободные радикалы вступают в процесс инициации ПОЛ в исследуемом биологическом субстрате. Интенсивность ПОЛ определяется по значению светосуммы за 60 сек на приборе «Emilite»-EL 1105 (США). Величина, обратная этому объему представляет собой АОА пробы. Степень подавления люминесценции свидетельствует о суммарной АОА, включающей в себя антирадикальную, антиперекисную активность, а также активность ферментов-антиоксидантов, белко-

вых антиоксидантных систем и наличие ионов металлов, разлагающих перекисные и гидроперекисные соединения.

2.5.5 Методы статистической обработки результатов исследования

На заключительном – аналитическом – этапе работы проводили статистическую сводку первичных данных, заносили их в статистические таблицы, формировали электронные балы данных. На последующем этапе анализа полученных результатов осуществляли расчет средних абсолютных и относительных величин, коэффициентов, ошибок репрезентативности, среднеквадратических отклонений. В зависимости от используемого метода, объема исследуемых групп, а также математического вида регистрируемого показателя использовали различные методы вариационной статистики, рекомендованные для анализа результатов экспериментальных исследований [214, 215].

При сравнении количественных признаков проводили дисперсионный анализ для оценки нормальности распределения с последующим использованием критерия t Стьюдента или, в случае сравнения более двух совокупностей, после осуществления одномерного дисперсионного анализа применяли функциональные возможности 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.

Для изучения патогенетического потенциала отдельных факторов в формировании исходов применения фармакологически активного агента использовали метод линейной логистической регрессии, в форме его частного приложения «ROC-анализ» и метод отношения шансов.

Вычисления осуществляли на персональном компьютере AppleiMacc использованием лицензионного программного продукта «BioStat»[®], «SPSS»[®], версия 16.0.

3. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ КРЫС С ОСТРЫМ АЛКОГОЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

В соответствии с протоколом исследования после выведения животных из эксперимента печень крыс извлекалась, осуществлялся ее осмотр, взвешивание, после чего проводили секцию органа, фиксацию его фрагментов с последующей гистологической проводкой для проведения микроморфологического и иммуногистохимического исследования. Рассчитывали абсолютную и относительную массу органа у животных всех включенных в исследование групп.

3.1 Макроскопические изменения печени животных с острым алкогольным повреждением на фоне внутрижелудочного введения ЛБК-527 и ЛХТ-8-16

Печень животных интактной группы была красно-коричневого цвета, с острыми краями, гладкой, блестящей поверхностью и гомогенной на срезе (рис. 3.8 а). Крысы с острым алкогольным повреждением имели увеличенную, плотную, ярко-желтую как на поверхности, так и на разрезе, с красноватыми или окрашенными желчью участками печень, края органы были закруглены (рис. 3.8 б). Печень животных, получавших ЛБК-527 в дозах 100 и 50 мг/кг не отличалась по своим размерам от интактной группы (рис. 3.8 г). Подобная макроскопическая картина была обнаружена у крыс, находившихся под экспериментальным воздействием препарата сравнения S-аденозил-L-метионина.

Макроскопическая картина органа животных, на фоне профилактического внутрижелудочного введения ЛХТ-8-16 в дозах 120 и 60 мг/кг, была близка к нормальной, однако наблюдались единичные зоны просветления паренхимы печени (рис. 3.8 в).

г) Алкогольный гепатит + ЛБК-527, 100 мг/кг/сут

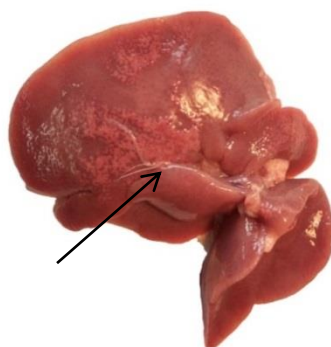
в) Профилактическое введение ЛХТ-8-16, 120 мг/кг/сут

б) Острое алкогольное повреждение

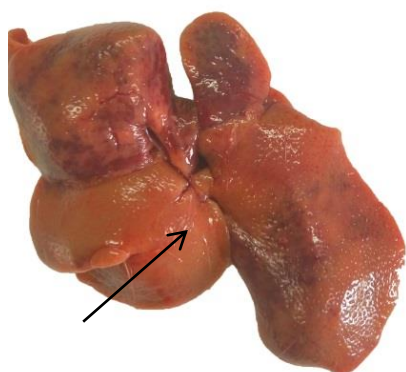
а) Интактная группа



Печень красно-коричневого цвета, с острыми краями, гладкой, блестящей поверхностью и гомогенной на срезе



Печень красно-коричневого цвета, с острыми краями, гладкой, блестящей поверхностью и гомогенной на срезе, единичные зоны просветления



Увеличенная, плотная, с закругленными краями печень, ярко-желтая как на поверхности, так и на разрезе, с красноватыми или окрашенными желчью участками



Печень красно-коричневого цвета, с острыми краями, гладкой, блестящей поверхностью и гомогенная на срезе

Рисунок 3.8 Внешний вид печени при остром алкогольном повреждении на фоне введения исследуемых соединений ЛБК-527 и ЛХТ-8-16 (стрелками указаны очаги просветления)

При анализе абсолютной и относительной масс органа животных исследуемых групп, установили статистически значимые различия по обоим изучаемым показателям в зависимости, как от формирующегося патологического процесса, так и примененного метода фармакологического воздействия (табл. 3.2). В частности, у крыс-самцов контрольной группы к моменту завершения эксперимента наблюдалось увеличение массы тела, достигшее статистической значимости при сравнении с интактными животными. В подгруппе самок, хотя и отмечали рост данного показателя, однако он сохранялся в рамках тенденции. При этом, как у самцов, так и 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.

Профилактическое введение фармацевтической композиции с шифром ЛХТ-8-16 в высшей терапевтической дозе сопровождалось предотвращением увеличения размера печени у самцов и самок, однако, не влияло на набор ими массы тела, что, в конечном счете отражалось на значении относительного индекса: он был меньшим, чем в контрольной группе и воспроизводил соотношение масс, наблюдаемое у интактных крыс. У животных, получавших в качестве фармакологического средства фармацевтическую комбинацию в дозе 60 мг/кг, увеличение печени сохранялась, при этом она была менее выражена, чем в группе контроля. А, поскольку, у самок в описываемой группе общая масса тела не изменялась при сравнении с интактными животными и животными контрольной группы, показатель относительной массы органа принимал статистическую значимость при его сопоставлении как с группой животных без патологии, так и с крысами с острым алкогольным гепатитом.

В группе животных, получавших магнийсодержащую соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг, не наблюдали значимых отличий в общей массе тела крыс-самцов и самок.

Таблица 3.2

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

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

Примечание: ОАП – острое алкогольное повреждение печени; 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 $p < 0,05$ (одномерный дисперсионный анализ, критерий Даннета)

При взвешивании масса печени, хотя и проявляла тенденцию к некоторому росту, не достигала статистической значимости при сравнении с интактными крысами, но была достоверно меньше, чем у крыс контрольной группы. Вследствие этого, относительная масса печени также была значимо ниже, чем у животных с острым гепатитом без фармакологического сопровождения. Снижение вводимой дозы ЛБК-527 вдвое сказывалось и на массе тела и печени животных: в большей степени в подгруппе самцов наблюдали увеличение как абсолютной, так и относительной массы органа, в то же время, имевшей статистические отличия и от группы контроля.

У крыс, получавших в качестве гепатопротектора S-аденозил-L-метионин, наблюдали дозозависимые изменения, воспроизводившие закономерности вещества ЛБК-527.

Следовательно, обобщая результаты макроскопического исследования, можно отметить, что формирование острого алкогольного поражения печени проявляется абсолютной и относительной гипертрофией органа, изменением его внешнего вида, окраски, формы краев, появлением обширных очагов просветления паренхимы, видимых как на поверхности, так и на разрезе. Внутривенное введение фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 и ЛБК-527 в высших терапевтических дозах курсами продолжительностью 7 суток позволяет предотвращать как увеличения массы печени, так и другие макроскопические изменения. Снижение вводимой суточной дозы веществ вдвое ведет к уменьшению наблюдаемого эффекта со стороны макроскопических характеристик. Наиболее заметным эффектом при этом обладает магнийсодержащее соединение ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг.

3.2 Гистологические изменения печени крыс с острым алкогольным повреждением при курсовом введении ЛХТ-8-16 и ЛБК-527

При исследовании микропрепаратов органа интактных животных, окрашенных гематоксилин-эозином и суданом-III, не отмечали половых различий в гистологической структуре ткани (рис. 3.9 а, б, 3.10 а, б). Ткань пе-

чени умеренного кровенаполнения, в просвете сосудов отсутствуют явления эритроцитарной агрегации и сладжа, а также их гемолиза. Дольковая структура, а также балочное строение печеночной паренхимы четко выражено. Гепатоциты полигональной формы с четкими ядрами и контурами, эозинофильной цитоплазмой. Встречаются двухъядерные гепатоциты. Портальные тракты умеренно выражены, стенки сосудов четкие, тонкие.

При исследовании микропрепаратов печени самцов животных через 7 суток после курсового внутрижелудочного введения раствора этилового спирта (группа контроля, рис. 3.11 а, б, в), окрашенных гематоксилин-эозином и суданом-III, отмечали полнокровие ткани с расширением сосудов и синусоид, явлением агрегации, сладжа эритроцитов и частичным внутрисосудистым гемолизом эритроцитов. Дольчатое строение печеночной ткани размыто, печеночные балки дисконтактированы. Наблюдаются центролобулярные некрозы гепатоцитов и явления жировой дистрофии. Гепатоциты центра дольки с явлениями кариопикноза, кариолизиса, вакуолизации и лизиса цитоплазмы, свидетельствуют о формировании явлений цитолиза. На периферии дольки встречаются бесструктурные гепатоциты в виде мелкозернистых слабобазофильных масс, между которыми видны явления слабой или умеренной лейко- и лимфоцитарной инфильтрации.

Дольковая структура прослеживается с трудом, печеночные балки очагово деконтактированы с явлениями фокальных некрозов гепатоцитов. Наблюдается пролиферация желчных протоков, неравномерная, умеренная или слабо выраженная лейко- и лимфогистиоцитарная инфильтрация с формированием мостовидных некрозов. Мелковезикулярная и крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов.

На микропрепаратах печени крыс, наряду с этанолом получавшие курсовое внутрижелудочное введение препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в дозе 60 мг/кг (рис. 3.12 а), отмечали умеренное полнокровие сосудов с незначительными явлениями агрегации эритроцитов в их просветах. Сохранялась дольковая структура и балочное строение печеночной дольки.

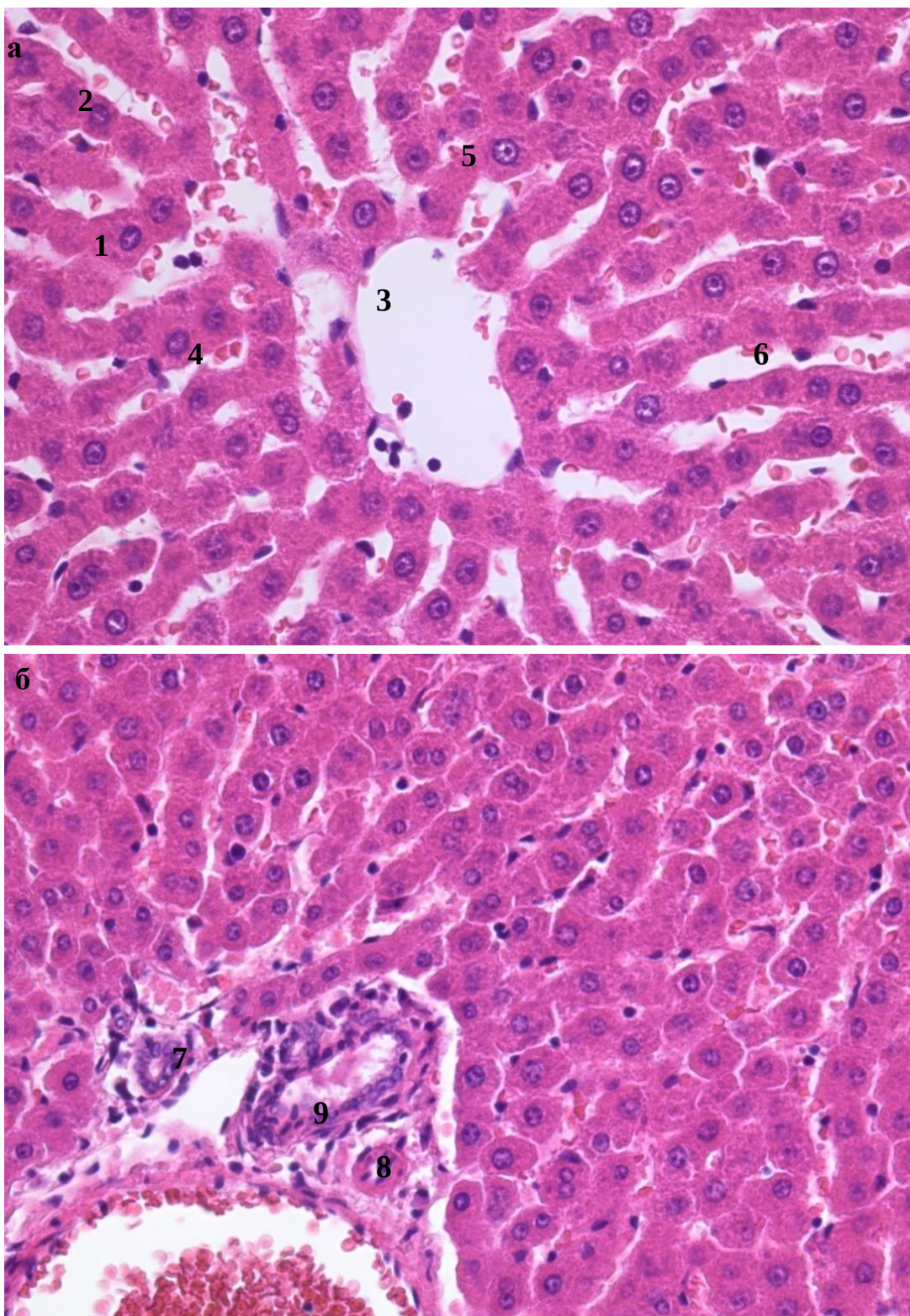


Рисунок 3.9 – Микропрепарат печени интактной крысы-самца центр дольки (а) и периферия дольки (б) (гематоксилин-эозин, ув. 400)
1 – гепатоцит, 2 – печеночная балка, 3 – центральная вена, 4 – синусоиды, 5 – клетка Купфера, 6 – эритроциты, 7 – дольковый желчный проток, 8 – дольковая артерия, 9 – дольковая вена

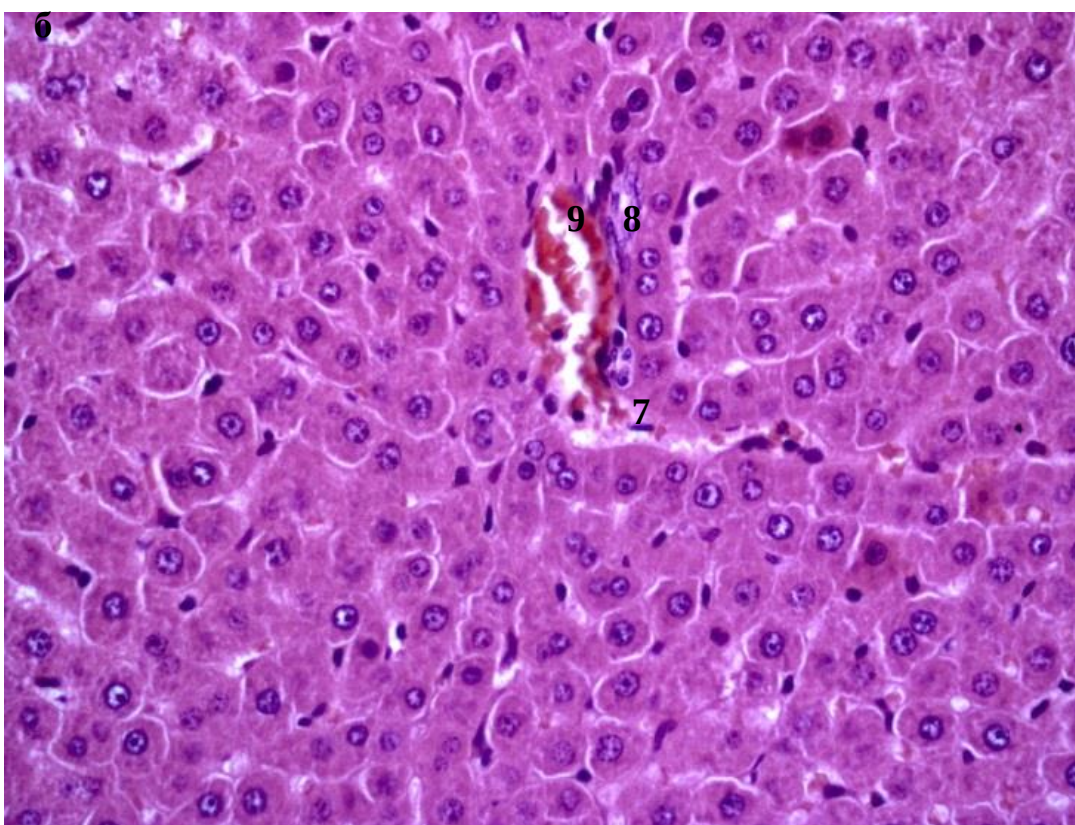
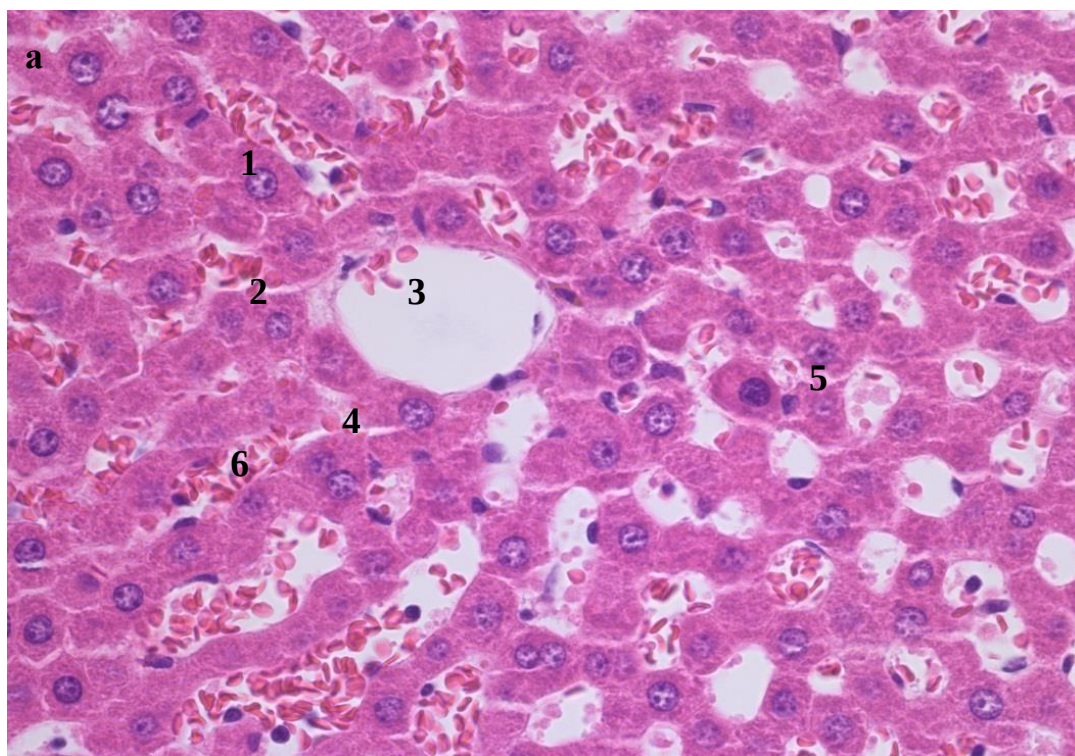


Рисунок 3.10 – Микропрепарат печени самки крысы (гематоксилин-эозин, ув. 400): центр дольки (а) и периферия дольки (б)

1 –гепатоцит, 2 – печеночная балка, 3 – центральная вена, 4 – синусоиды, 5 – клетка Купфера, 6 – эритроциты, 7 – дольковый желчный проток, 8 - дольковая артерия, 9 – дольковая вена

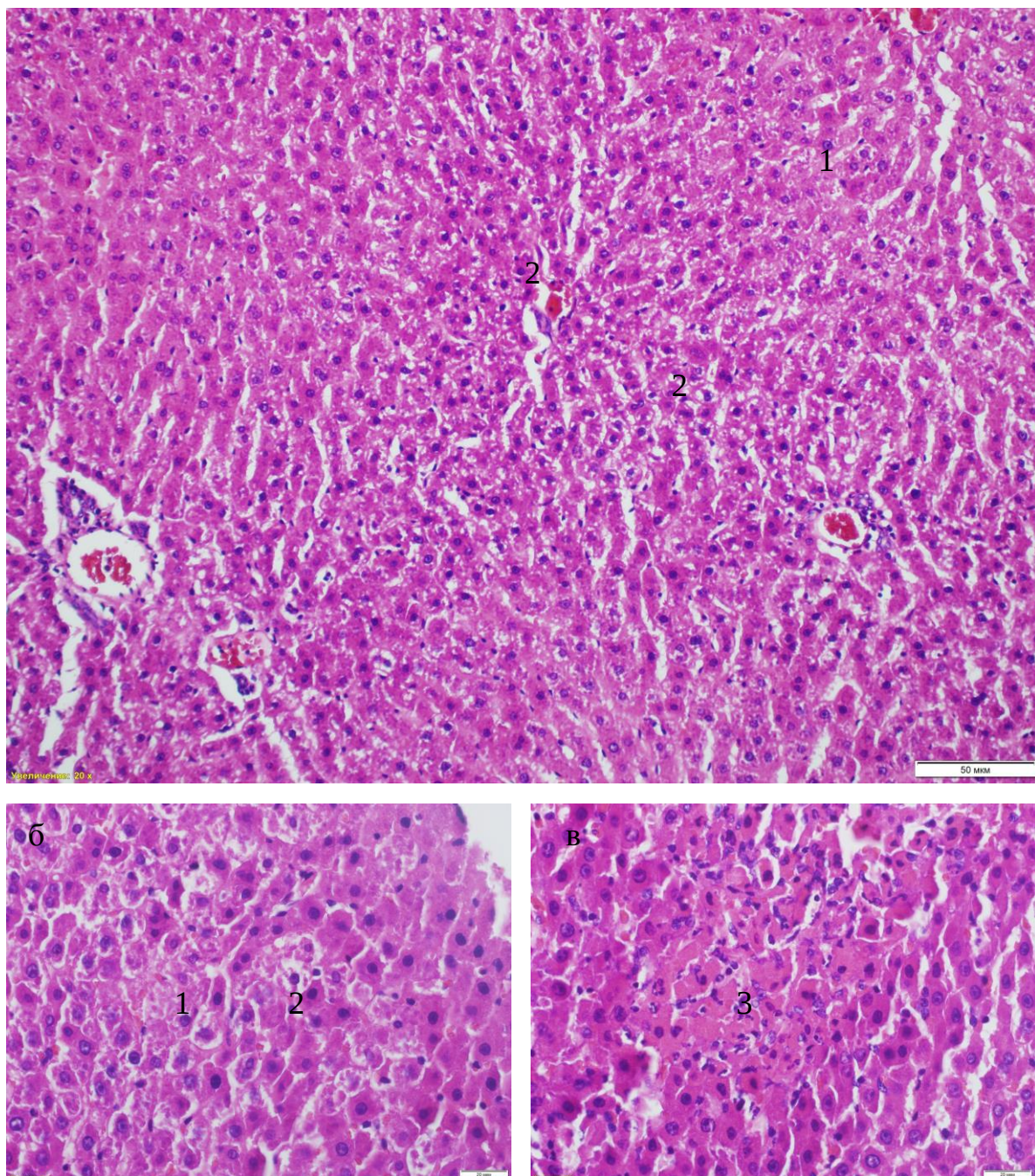


Рисунок 3.11 – Микропрепарат печени самца крысы на фоне 7-суточного введения алкоголя из группы контроля с ОАП (гематоксилин-эозин, а –ув. 100; б,в – ув. 400)

1 –зона очаговой декомплексация печеночных балок с явлениями фокальных некрозы гепатоцитов, 2 – мелко- и крупновезикулярная жировая дистрофия гепатоцитов, 3 – лейко- и лимфогистиоцитарная инфильтрация

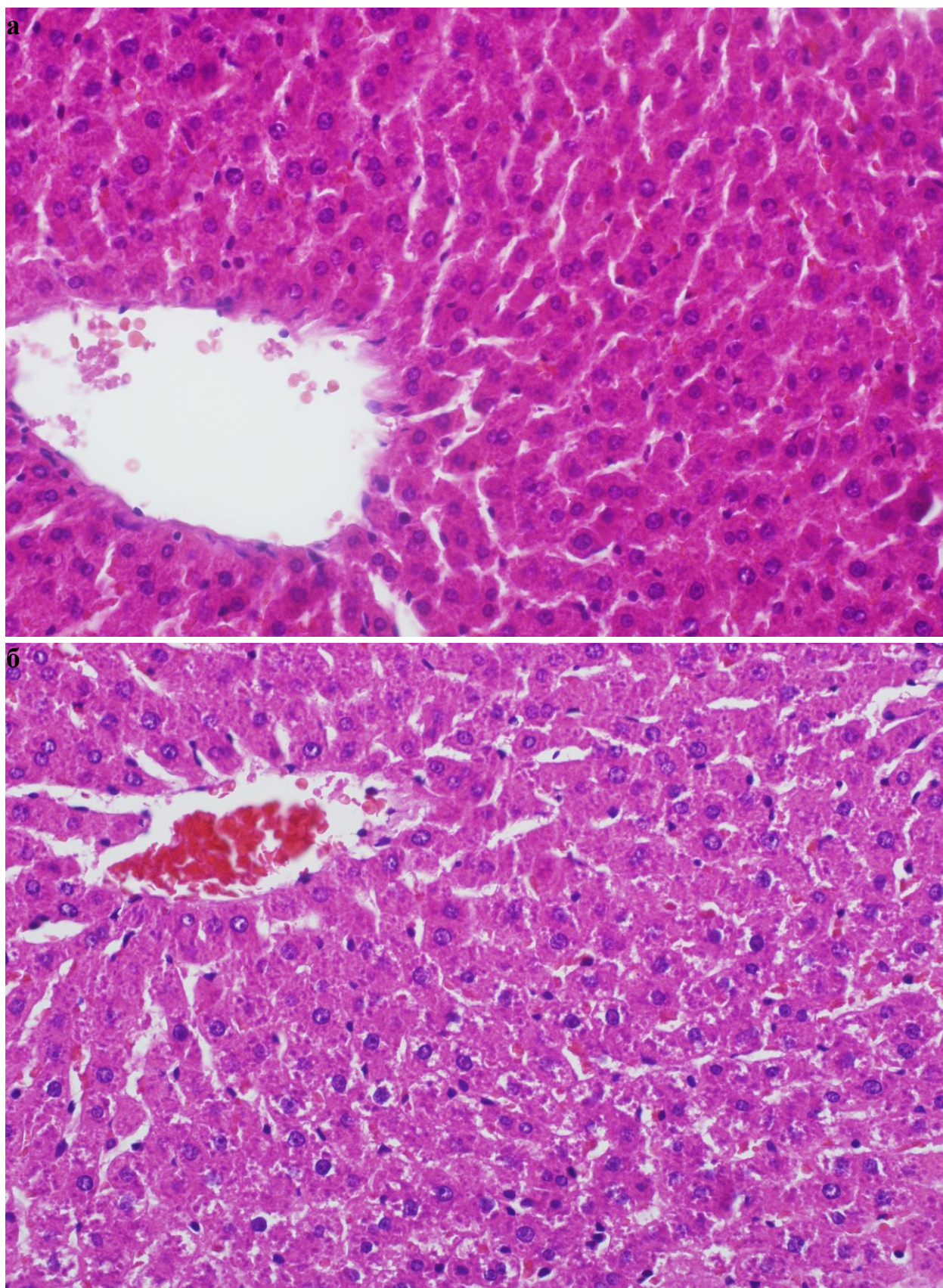


Рисунок 3.12 – Микропрепарат печени самца крысы, получавшей S-аденозил-L-метионин в дозе: а) 60 мг/кг и б) 30 мг/кг, через 7 суток после курсового введения этанола (гематоксилин-эозин, ув. 400)

Портальные тракты были не расширены со слабой очаговой лимфоидной инфильтрацией. Гепатоциты периферии долики в состоянии умеренной жировой дистрофии. Сохранялось умеренное количество двухъядерных гепатоцитов преимущественно также на периферии печеночной долики. Снижение вводимой дозы гепатопротектора в два раза – до 30 мг/кг – сопровождалось нарастанием дистрофических явлений в гепатоцитах периферической зоны, наряду с интенсификацией воспалительной тканевой реакции в виде лимфогистиоцитарной инфильтрации и появления единичных лейкоцитов (рис. 3.12 б). Половых особенностей в гистологической структуре печени в исследуемых группах не регистрировали.

Фармакологический эффект магнийсодержащего производного 2-аминоэтансульфоновой кислоты вещества ЛБК-527 при его 7-суточном внутрижелудочном курсовом введении животным в высшей терапевтической дозе 100 мг/кг за 1 час до введения раствора этанола на микроструктурном уровне (рис. 3.13 а) проявлялся тем, что на фоне умеренного кровенаполнения ткани печени наблюдали сохранение дольковой структуры и балочного строения паренхимы органа. Синусоиды центра долек расширены с небольшим количеством эритроцитов, в том числе с явлениями слабой агрегации. Гепатоциты во всех полях зрения полигональной формы с четкими контурами и ядрами, эозинофильной цитоплазмой. Наблюдается умеренное количество двухъядерных гепатоцитов преимущественно на периферии печеночной долики. В микропрепаратах печени животных, получавших соединение ЛБК-527 в дозе 50 мг/кг (рис. 3.13 б), не отмечали существенных изменений гистологической картины при сравнении с вышеописанными животными, как не отмечали и половых различий микроструктуры печени в обеих описываемых группах.

На фоне курсового внутрижелудочного введения фармацевтической композиции ЛХТ-8-16, содержащей деанола ацеглумат и липоевую кислоту в дозе 120 мг/кг в сутки в течение 7 суток параллельно с введением этилового алкоголя микроскопически в препаратах печени наблюдали слабое кровенаполнение с явлениями склеивания эритроцитов (рис. 3.14 а).

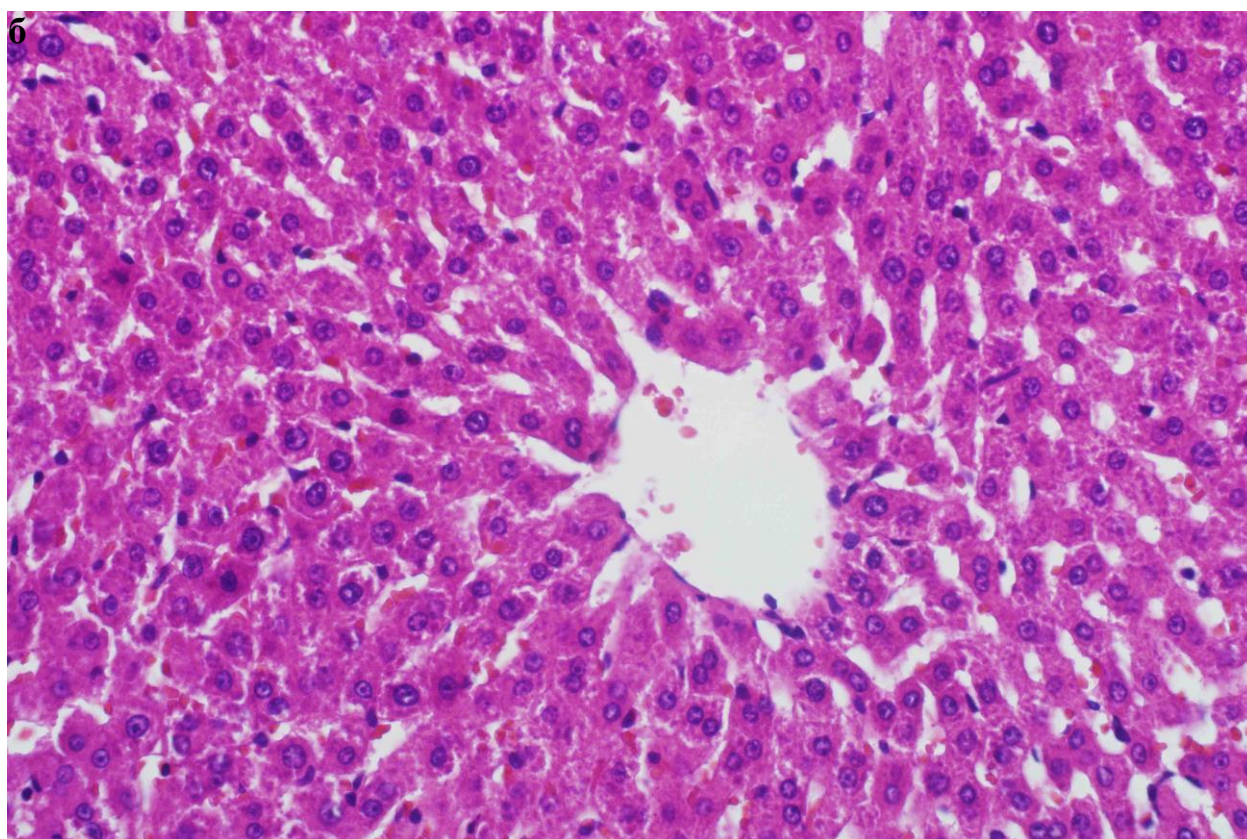
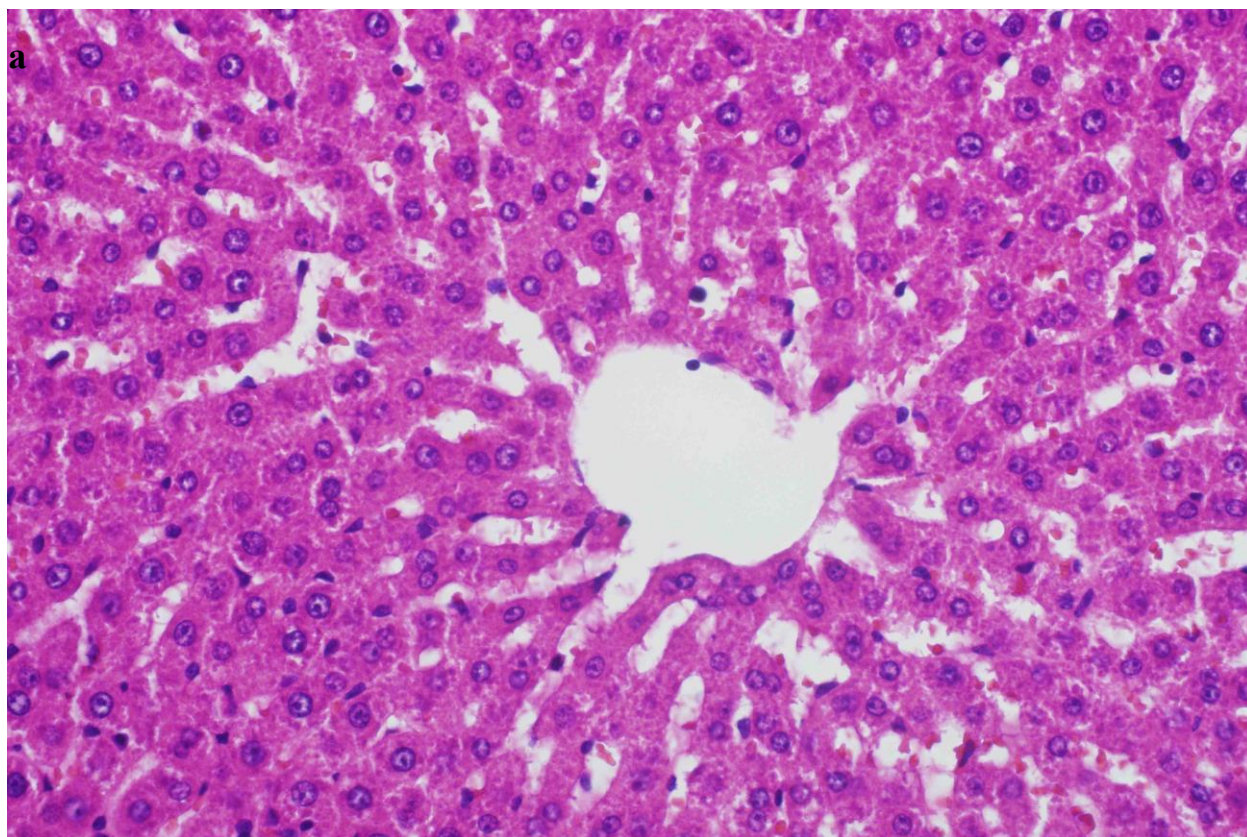


Рисунок 3.13 Микропрепарат печени самца крысы, получавшей соединение ЛБК-527 в дозе: а) 100 мг/кг и б) 50 мг/кг, через 7 суток после курсового введения этанола (гематоксилин-эозин, ув. 200)

Печеночные долилки и балки четко выражены. Гепатоциты полигональной правильной формы с четкими ядрами и контурами, слабыми явлениями жировой дистрофии, на периферии долилки – встречаются преимущественно многоядерные паренхиматозные клетки.

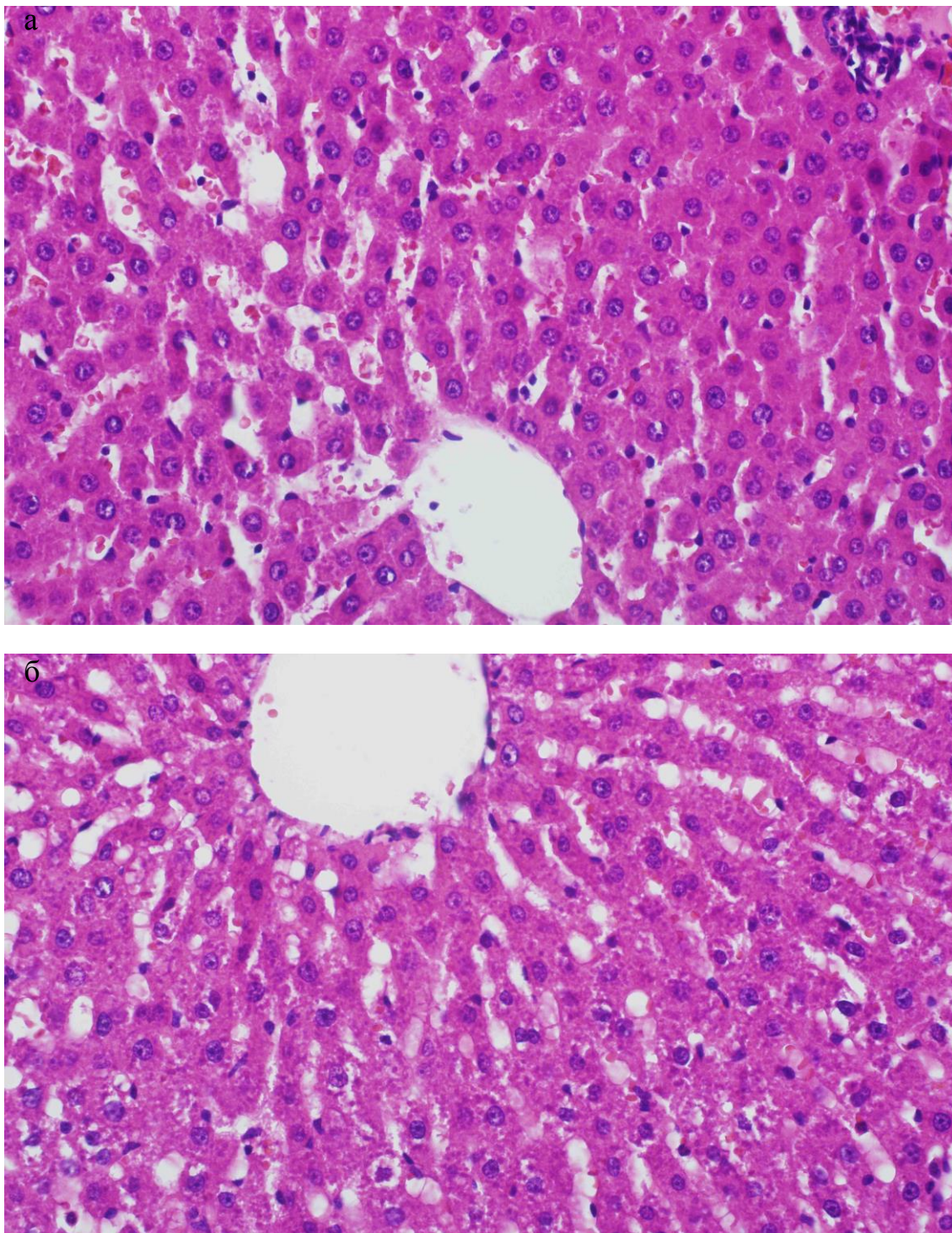


Рисунок 3.14 Микропрепарат печени самца крысы, получавшей соединение ЛХТ-8-16 в дозе: а) 120 мг/кг и б) 60 мг/кг, через 7 суток после курсового введения этанола (гематоксилин-эозин, ув. 400) центр долилки

При снижении курсовой дозы вводимого соединения до 60 мг/кг/сут микроскопически на фоне умеренной мелковакуольной дистрофии гепатоцитов наблюдали единичные участки некроза гепатоцитов с явлениями нейтрофильной лейкоцитарной инфильтрации в области центральной вены (рис. 3.14 б).

В группе крыс самок с алкогольной острой нагрузкой курсовое внутривенное введение исследуемых веществ в максимальной терапевтической дозе сопровождалось смягчением гистологической картины повреждения печеночной ткани. Так, наблюдалось умеренное полнокровие ткани органа с незначительными явлениями внутрисосудистой агрегации эритроцитов, сохранялась дольковое строение и балочная структура организации печеночной паренхимы. Гепатоциты центра дольки и на периферии сохраняли полигональную правильную форму, были в основном представлены двухъядерными формами с четкими ядрами и эозинофильно окрашенной цитоплазмой. Слабая воспалительная реакция была представлена слабо выраженной лимфоидной инфильтрацией перипортальных зон.

При проведении полуколичественного анализа распространенности воспалительного процесса и дистрофических изменений в паренхиме печени животных исследуемых групп (табл. 3.3) установлена высокая интенсивность патологических изменений ткани у животных контрольной группы. Наибольшим протективным воздействием при полуколичественной оценке обладают ЛБК-572 в дозе 100 мг/кг и препарат сравнения в высшей вводимой дозе. У фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 противовоспалительный и антидистрофический потенциал был существенно ниже (табл. 3.3).

Активность гепатита также изучили при использовании гистологической шкалы Кноделя (табл. 3.4). На препаратах печени интактной группы признаков пери- и внутрипортальных некрозов, воспаления и фиброза закономерно не регистрировали. Формирование острого алкогольного гепатита проявлялось умеренно выраженными явлениями перипортального и внут-

ридолькового некроза, небольшой по интенсивности воспалительной реакцией.

Таблица 3.3

Распределение животных в исследуемых группах по выраженности воспалительных и дистрофических изменений печени крыс с острым алкогольным поражением под действием исследуемых соединений по шкале Zhao et al., 2017

Исследуемая группа	Интенсивность в баллах			
	0	+	++	+++
Интактные животные	10	0	0	0
Контроль с ОАГ	0*	0	3	7*
ОАП, АМ в дозе 60 мг/кг	0*	8 ^{A*}	2	0 ^A
ОАП, АМ в дозе 30 мг/кг	0*	6 ^{A*}	4	0 ^A
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг	0*	6 ^{A*}	3	1 ^A
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 60 мг/кг	0*	4	4	2
ОАП, ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг	0*	7 ^{A*}	3	0 ^A
ОАП, ЛБК-527 в дозе 50 мг/кг	0*	6 ^{A*}	4	0 ^A

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

Курсовое внутрижелудочное введение препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в высшей терапевтической дозе 60 мг/кг/сут на мик-

роскопическом уровне снижало активность воспалительной реакции до пограничного – между минимально выраженным и небольшим, причем отмечали дозозависимость протекторного эффекта, при снижении вводимой дозы активность воспалительной реакции снижалась (табл. 3.4)

Таблица 3.4

Значение индекса гистологической активности гепатита по Кноделюв группам крыс с острым алкогольным поражением под действием исследуемых соединений

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

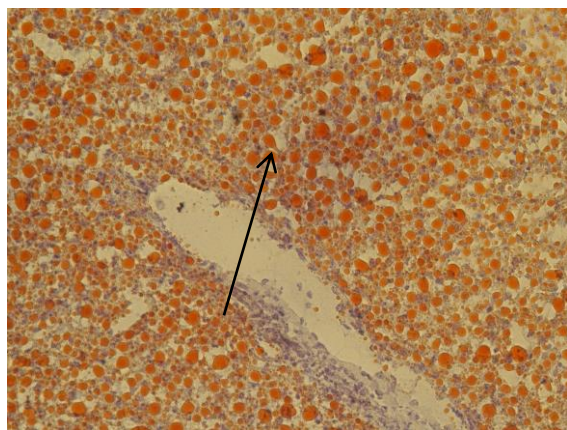
Примечание: * - различия при сравнении с интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^A – различия при сравнении с группой контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (точный критерий Фишера)

Исследуемое соединение из группы магнийсодержащих гепатопротекторов ЛБК-527 демонстрировало заметные протекторные свойства также наиболее ярко выраженные в высшей терапевтической дозе. При этом значение индекса Кноделя у всех животных группы не превышало 1, что позволяет нам говорить об отсутствии признаков активного воспаления. При снижении дозы в два раза значение индекса повышалось за счет преимущественно преобладания перипортального воспалительного компонента и появления очагов некроза гепатоцитов (табл. 3.4).

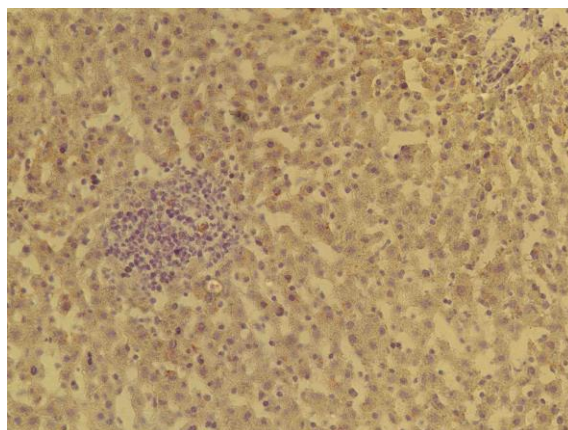
Фармацевтическая композиция деанола ацеглумата и липоевой кислоты ЛХТ-8-16, также исследуемая в двух дозах, также проявляла гепатопротекторные свойства по результатам анализа индекса Кноделя, однако несколько уступала веществу ЛБК-527. В дозе 100 мг/кг/сут активность воспалительного процесса в препаратах печени крыс характеризовалась как минимальная, что также наблюдали и при двукратном снижении вводимой суточной дозы вещества (табл. 3.4).

В препаратах органа животных с острым алкогольным поражением печени, окрашенных суданом-III, наблюдали разитие стеатоза, характеризующегося появлением в гепатоцитах преимущественно центрлобулярных отделов дольки смешанной (крупно и мелкокапельной) жировой дистрофии (рис. 3.15). Исследуемые вещества оказывали протекторный эффект, проявляющийся в снижении количества гепатоцитов с явлениями жировой дистрофии, а также уменьшении площади жировых капель в цитоплазме в пересчете на 1 гепатоцит (рис. 3.15, рис. 3.16).

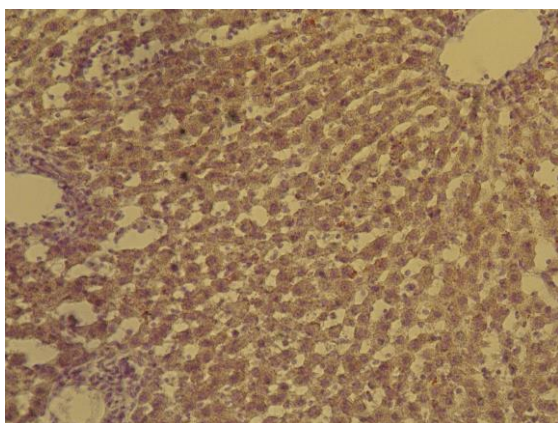
При этом, наиболее контрастными были изменения количества гепатоцитов с явлениями жировой дистрофии: если на фоне препарата сравнения их доля снижалась до 28% от общего числа гепатоцитов в исследуемых полях зрения, то профилактическое введение ЛХТ-8-16 снижало показатель лишь до 56%, что, однако обладало статистической значимостью при сравнении с контролем. Эффект ЛБК-527 был сопоставим с эффектом препарата сравнения.



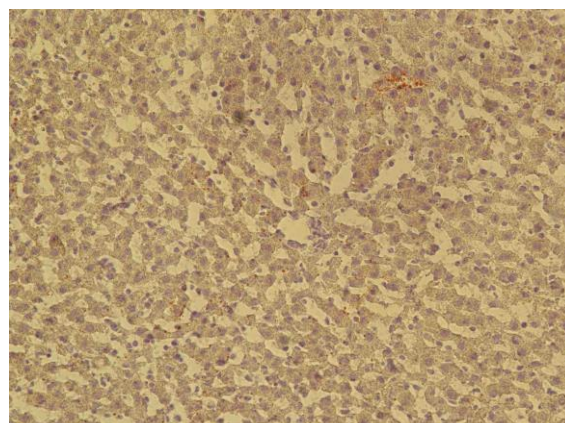
а



б



в



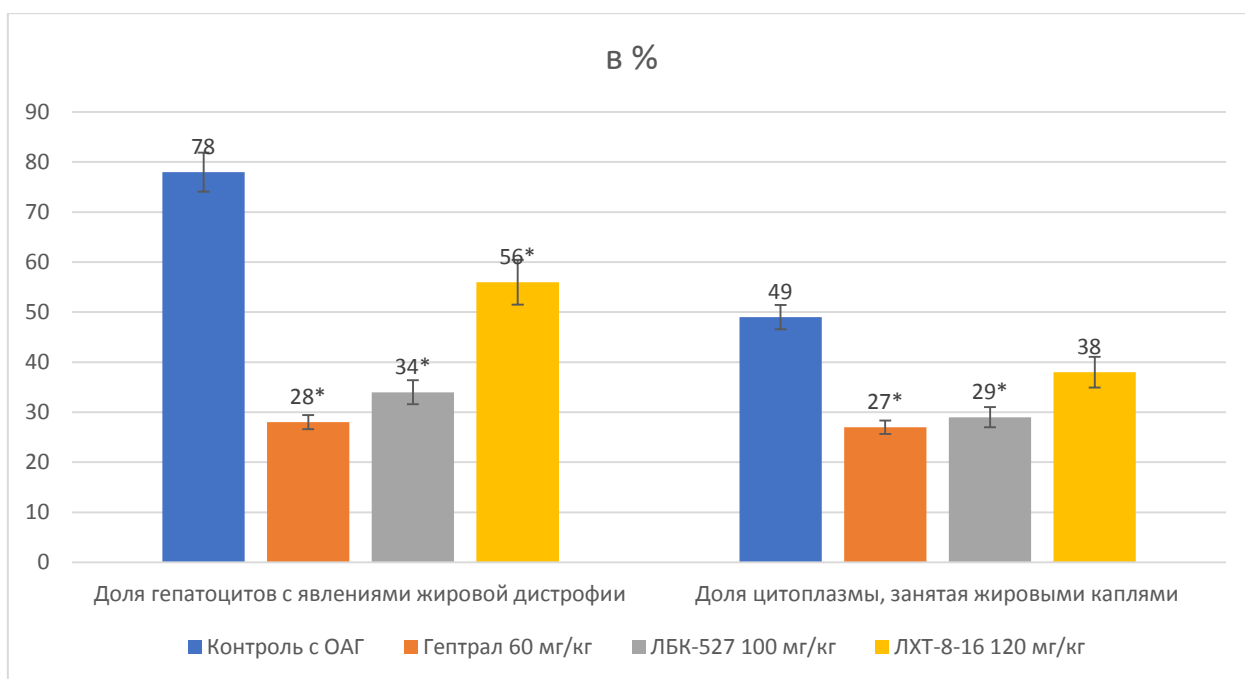
г

Рисунок 3.15 – Препарат печени (окраска суданом-III, ув. 400): а) крысы с ОАП (контроль); б) крысы с алкогольным процессом на фоне введения АМ в дозе 60 мг/кг/сут; в) ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут; г) ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут; стрелками указаны капли жира

При морфометрическом исследовании срезов печенинами были получены следующие результаты, суммированные в таблице 3.5. У животных контрольной группы наблюдали гипертрофию гепатоцитов, снижение площади ядра с пропорциональным уменьшением ядерно-цитоплазматического коэффициента, а также снижением доли многоядерных паренхимных клеток (рис. 3.17).

Курсовое внутрижелудочное введение фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 в дозах 120 и 60 мг/кг/сут не снижало формирования гипертрофии гепатоцитов, однако сдерживало явления кариопикноза в группе животных,

получающих вещество в высшей дозе. Соотношение одно- и многоядерных гепатоцитов не отличалось от такового животных контрольной группы. Воздействие магнийсодержащего соединения ЛБК-527 в высшей вводимой дозе 100 мг/кг/сут вызывало сопоставимый с препаратом сравнения S-аденозил-L-метионином профилактический эффект в отношении формирования гипертрофии гепатоцитов, а также уменьшения размеров ядра. В совокупности с описываемыми феноменами статистически значимое при сравнении с контролем увеличение доли двухъядерных гепатоцитов свидетельствовало об активации регенераторных механизмов в ткани органа. Снижение вводимой дозы вдвое сопровождалось минимизацией отличий от животных контрольной группы.



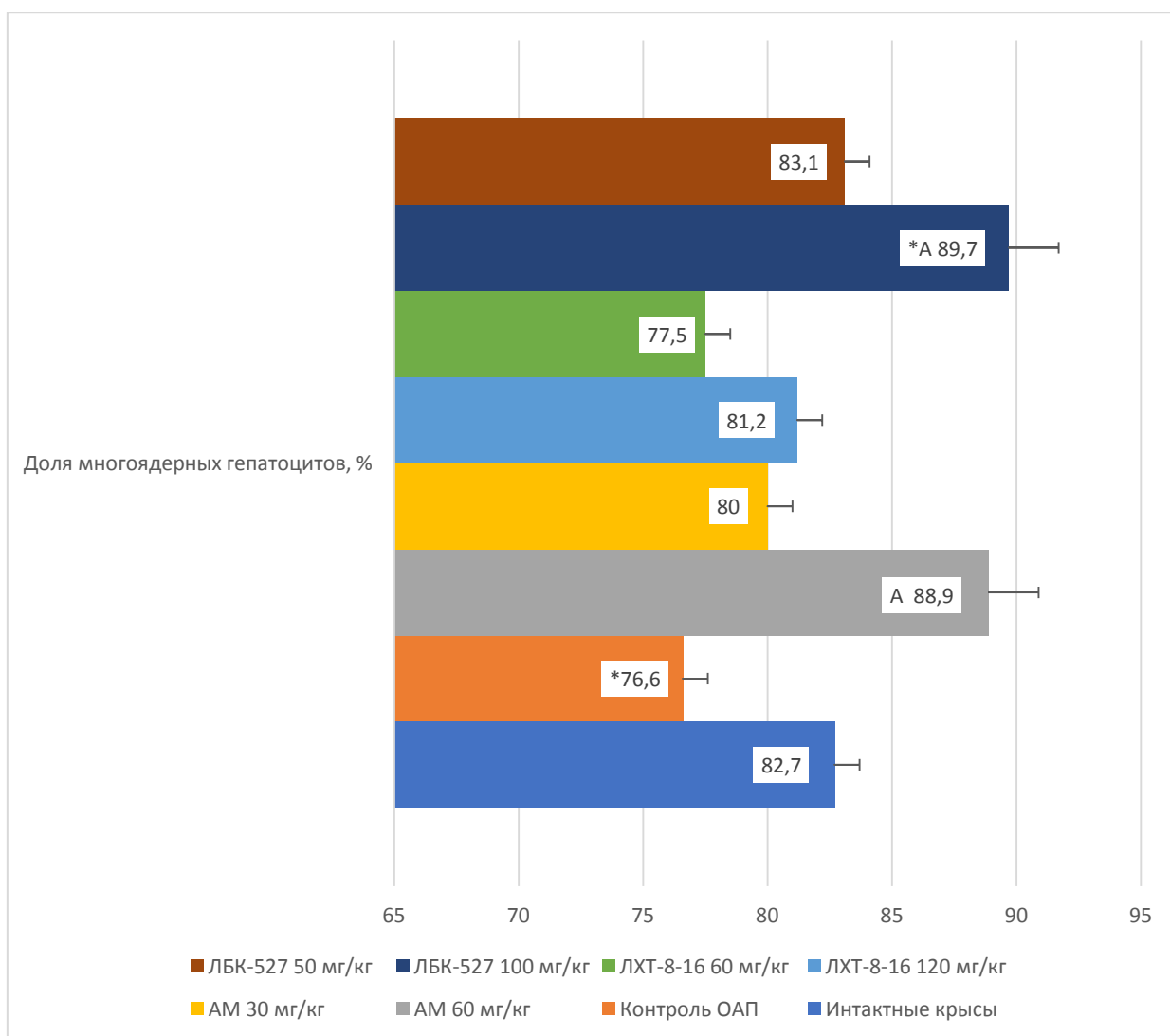
Примечание: * - различия при сравнении с контролем с ОАГ статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Даннета)

Рисунок 3.16 Морфометрическая характеристика явлений жировой дистрофии печени крыс при остром алкогольном повреждении и действии ЛБК-527 и ЛХТ-8-16 (пояснения в тексте)

**Значения некоторых морфологических показателей гепатоцитов крыс
($M \pm SD$) с острым алкогольным поражением печени под действием ис-
следуемых соединений**

Исследуемая группа	Площадь цитоплазмы, мкм^2	Площадь ядра, мкм^2	Коэффициент Я / Ц
Интактные Животные	$205,2 \pm 8,4$	$48,3 \pm 1,6$	$0,23 \pm 0,02$
Контроль с ОАП	$349,6 \pm 7,9^*$	$34,9 \pm 2,1^*$	$0,10 \pm 0,01^*$
ОАП, АМ в дозе 60 мг/кг	$244,4 \pm 10,2^{*A}$	$45,8 \pm 1,8^A$	$0,18 \pm 0,02^A$
ОАП, АМ в дозе 30 мг/кг	$289,3 \pm 9,3^{*A}$	$41,3 \pm 2,5^A$	$0,14 \pm 0,03^*$
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг	$317,6 \pm 7,1^*$	$40,4 \pm 1,5^{*A}$	$0,12 \pm 0,01^*$
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 60 мг/кг	$335,8 \pm 8,6^*$	$37,3 \pm 1,4^*$	$0,11 \pm 0,01^*$
ОАП, ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг	$259,3 \pm 9,0^{*A}$	$44,8 \pm 1,4^A$	$0,17 \pm 0,02^A$
ОАП, ЛБК-527 в дозе 50 мг/кг	$300,6 \pm 9,9^*$	$39,6 \pm 2,0^*$	$0,13 \pm 0,02^*$

Примечание: ОАП – острое алкогольное повреждение печени; 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 $p < 0,05$ (одномерный дисперсионный анализ, критерий Даннета)



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

Рисунок 3.17 – Доля многоядерных гепатоцитов в структуре паренхимных клеток печени крыс с ОАП

**4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ И
СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ
ОСТРОМ АЛКОГОЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ И ВОЗДЕЙСТВИИ
ЛБК-527 И ЛХТ-8-16**

Воздействие токсических доз этилового спирта на печень сопровождается формированием сложного каскада структурно-функциональных изменений, которые, в конечном счете, влекут формирование специфической морфологической и функциональной картины алкогольного стеатогепатоза и / или стеатогепатита. В настоящем разделе работы изучены некоторые биохимические показатели, отражающие функциональное состояние органа, а также проанализирована активность процессов, характеризующих уровень тканевых и системных оксидативных реакций при алкогольном поражении печени, а также на фоне профилактического введения веществ с потенциальной гепатопротекторной активностью.

4.1 Функциональные изменения печени при остром алкогольном поражении и воздействии исследуемых веществ

В группе животных с острым алкогольным поражением регистрировали значительный рост сывороточной концентрации АСТ и АЛТ – в среднем до 281,7 и 69,1 U/л соответственно с одновременной элевацией ферментативной активности ГГТП в среднем до 7,1 U/л, что свидетельствовало о формировании активного алкогольного гепатита с выраженным цитолитическим синдромом (табл. 4.6). Концентрация общего билирубина в плазме периферической крови повышалась до 25,7 мкмоль/л, что на фоне роста активности щелочной фосфатазы до 293,1U/л в среднем являлось подтверждением наличия холестатического синдрома. Отличия описываемых показателей от группы интактных животных находилось в пределах статистической значимости. В то же время, уровень общего белка в крови не изменялся на фоне острого

алкогольного поражения печени животных.

Таблица 4.6

Значения некоторых биохимических показателей функции печени ($M \pm SD$) 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
1	2	3	4	5	6	7
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 до- зе 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 до- зе 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

1	2	3	4	5	6	7
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)

Препарат сравнения S-аденозил-L-метионин в обеих дозах – 60 и 30 мг/кг, вводимых внутривенно одновременно с введением раствора этилового спирта оказывал положительное воздействие на показатели, отражающие функциональную активность печени и целостность гепатоцитов (табл. 4.6): на фоне референтного препарата в высшей дозе снижалась плазменная концентрация АЛТ до $117,8 \pm 6,5$ U/л, АСТ – до $40,0 \pm 4,3$ U/л ($p < 0,05$ при сравнении с контрольной и интактной группой животных), а также ГГТП в среднем до 1,2 U/л. Описываемые изменения свидетельствовали о снижении активности цитолитического синдрома. При введении препарата в дозе 30 мг/кг сохранялась его профилактическая активность в отношении явлений гиперферментемии, однако значения ферментативной активности были несколько выше. В высшей вводимой дозе S-аденозил-L-метионин нормализовывал уровень общего билирубина, приводил к снижению концентрации ЩФ до уровня меньшего, чем у интактных животных, тем самым предотвращая развитие явлений холестаза. В дозе 30 мг/кг профилактический антихолестатический эффект препарата сохранялся. Белоксинтетическая функция на фоне введения препарата сравнения не страдала.

Профилактическое введение фармацевтической композиции деанола ацеглумата и липоевой кислоты (ЛХТ-8-16) также проявляло свойства гепатопротекторов преимущественно в дозе 120 мг/кг (табл. 4.6). В высшей исследуемой дозе вещество эффективно предотвращало формирование цитолитического синдрома, однако уступало по степени активности препарату сравнения. При этом, при снижении вводимой дозы до 60 мг/кг наблюдали сохраняющиеся высокие концентрации аланиновой аминотрансферазы, не отличающиеся от контрольных значений, а уровень АСТ в крови хотя и был достоверно ниже, чем в контроле, выходил далеко за рамки референсных значений показателя для данного биологического вида. Ни в одной из вводимых доз фармацевтическая композиция ЛХТ-8-16 не предотвращала формирование холестатического синдрома. Концентрация общего билирубина в

плазме крови была меньшей, чем в контроле, а уровень общего белка не изменялся.

Гепатопротекторные свойства магнийсодержащего производного 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛБК-527 были изучены в дозах 100 и 50 мг/кг при внутрижелудочном введении (табл. 4.6). В группе крыс, получавших высшую дозу вещества, наблюдали значительное при сравнении с контролем снижение уровней аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз на фоне заметного ослабления активности ГГТП. В этой же дозе соединение предотвращало рост ферментативной активности ЩФ, и плазменной концентрации общего билирубина. Профилактика холестаза и значимое снижение ферментемии внутриклеточных энзимов доказывало выраженный цитопротекторный эффект ЛБК-527 в указанной дозе в отношении паренхимных клеток печени. При снижении вводимой дозы до 50 мг/кг/сут практически не наблюдали заметных колебаний измеряемых биохимических показателей и сохранение описываемого гепатопротекторного эффекта вещества на том же уровне, что и при введении дозы 100 мг/кг. Полученные результаты могут являться обоснованием утверждения о большей широте терапевтического действия ЛБК-527 при сравнении с ЛХТ-8-16.

4.2 Состояние свободнорадикальных процессов при остром алкогольном повреждении печени и введении ЛБК-527 и ЛХТ-8-16

В настоящем исследовании мы использовали два методических приема для оценки роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) в формировании острого алкогольного повреждения печени и оценке эффективности некоторых перспективных веществ с цитопротекторной активностью: первый – позволил нам оценить интенсивность процессов свободно-радикальной липопероксидации в плазме крови на основе определения уровня так называемых ТБК-зависимых продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА), его железо-индуцированной формы (Fe-МДА), при этом активность антиоксидантной системы определяли по уровню каталазы (К) в плазме крови и супероксид-

дисмутазы (СОД) в печени. Второй методический прием не зависит от тиобарбитуровой кислоты и позволяет оценить общий прооксидантный потенциал и антирадикальную активность нормальной или патологически измененной ткани с помощью индукции хемилюминисценции.

Принимая во внимание роль перекисного окисления липидов в развитии дистрофических и воспалительных заболеваний печени, в том числе и алкогольной этиологии, было интересным исследовать состояние процессов липопероксидации у крыс с острым алкогольным поражением. Результаты исследования суммированы в таблице 4.7.

У нелинейных лабораторных крыс самцов и самок без признаков нарушения печеночной функции уровень продукта ПОЛ малонового диальдегида в крови составлял в среднем 4,12 мкмоль/л, в его железо-индуцированной формы – 4,84 мкмоль/л. Активность сывороточной каталазы определялась на уровне 0,433 мккат/л (таблица 4.7).

Иными были результаты изучения процессов ПОЛ в группе животных с формирующейся токсической острой патологией печени алкогольного происхождения: в плазме крови крыс данной группы установили рост концентрации как МДА до $18,56 \pm 1,52$ мкмоль/л, так и пропорциональное увеличение содержания его железо-индуцированной формы до $22,29 \pm 2,62$ мкмоль/л. В описываемой группе активность К уменьшалась даже ниже значений в группе интактных животных и составляла $0,162 \pm 0,033$ мккат/л (таблица 4.7). Мы расценили снижение активности каталазы на фоне значительного увеличения содержания продуктов ПОЛ в крови как состояние декомпенсации антиоксидантного потенциала в данной группе животных.

У крыс с формирующимся алкогольным процессом на фоне внутрижелудочного введения препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в обеих дозах – 60 и 30 мг/кг, отмечали статистически достоверное снижение активности гидроперекисных процессов по сравнению с животными контрольной группы, о чем судили по снижению концентрации МДА до $6,28 \pm 1,34$ мкмоль/л.

Таблица 4.7

Некоторые показатели ПОЛ сыворотки крови крыс с ОАП на фоне профилактического внутрижелудочного введения ЛХТ-8-16 и ЛБК-527

Исследуемая группа	Показатели, М±SD		
	МДА мкмоль/л	Fe-МДА мкмоль/л	Каталаза мккат/л
Интактные животные	4,12±1,31	4,84±1,26	0,433±0,019
Контроль с ОАП	18,56±1,52*	22,29±2,62*	0,162±0,033*
ОАП, АМ в дозе 60 мг/кг	6,28±1,34 ^B	4,89±1,52 ^B	0,724±0,038 ^B
ОАП, АМ в дозе 30 мг/кг	10,16±1,55 ^A	6,67±1,04 ^B	0,514±0,056 ^B
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг	13,07±1,15 ^A	15,47±2,13 ^A	0,398±0,042 ^B
ОАП, ЛХТ-8-16 в дозе 60 мг/кг	17,54±2,41*	14,98±1,66 ^A	0,226±0,063*
ОАП, ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг	8,16±2,43 ^B	9,24±2,73 ^B	0,638±0,045 ^B
ОАП, ЛБК-527 в дозе 50 мг/кг	9,54±3,72 ^B	12,51±2,15 ^A	0,406±0,054 ^B

Примечание: * - различия при сравнении с интактными крысами статистически достоверны при $p < 0,05$; ^A – различия при сравнении с группой контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (одномерный дисперсионный анализ, критерий Даннета)

При этом уровень Fe-МДА оставался практически без изменений. На фоне уменьшения концентрации МДА в группе животных, получавших референтный препарат в высшей дозе происходило статистически значимое по

сравнению с контрольнойповышение уровня каталазы до $0,724 \pm 0,038$ мккат/л (таблица 4.7), что свидетельствует о срабатывании компенсирующих резервов антиоксидантной системы.Снижение дозы препарата до 30 мг/кг сопровождалось сохранением оптимизирующего действия на баланс системных гидроперекисных процессов.

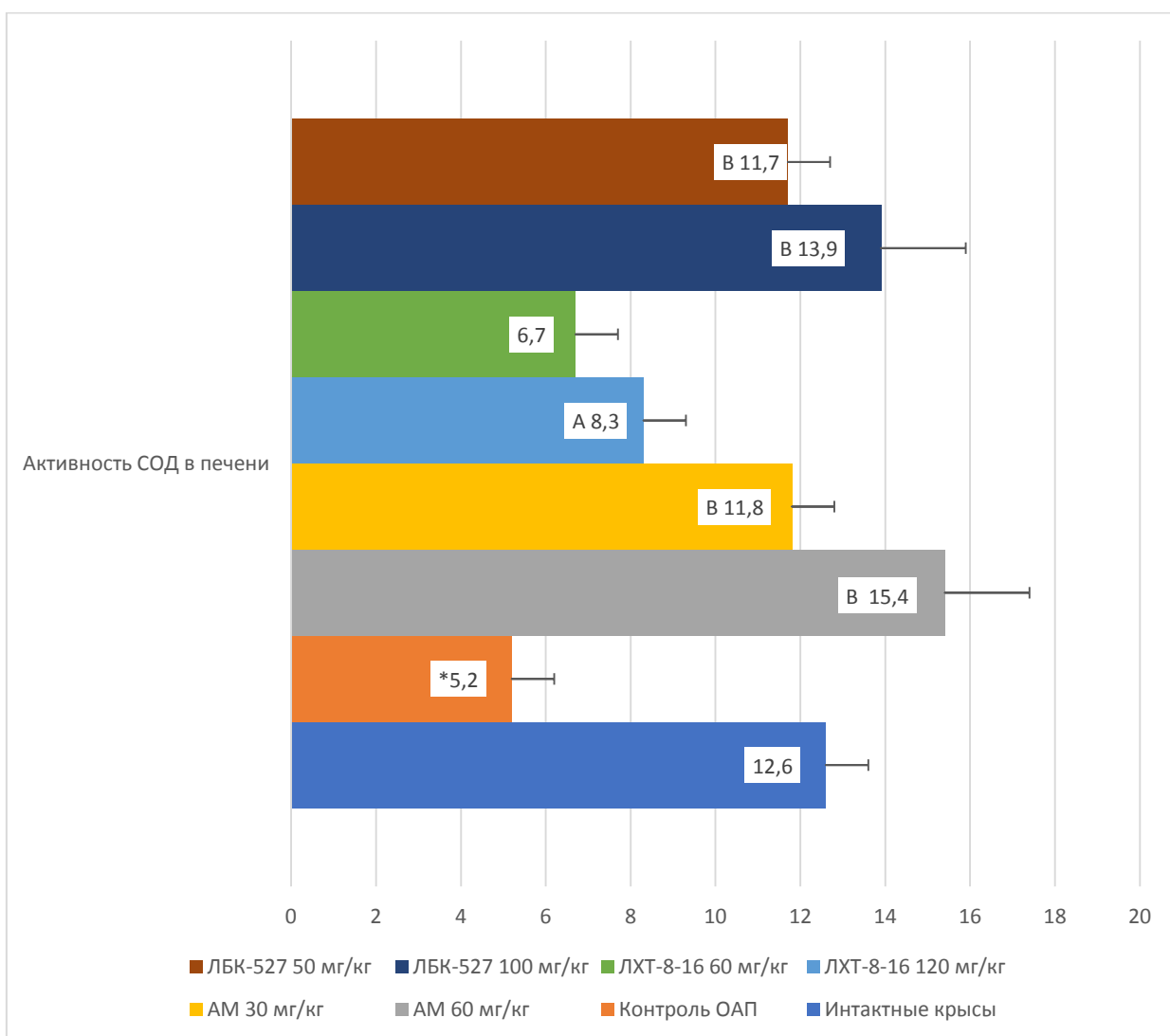
Использование в качестве гепатопротективного средства фармацевтической комбинации ЛХТ-8-16 приводило к предотвращению дисбаланса процессов оксидативного характера лишь в высшей терапевтической дозе – 120 мг/кг, при этом уровень формирующегося воздействия на системные показатели ПОЛ существенно уступал таковому препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в обеих изученных дозах (табл. 4.7).

Более обнадеживающие результаты были получены в группах животных с ОАП, получающих в качестве средства фармакологического сопровождения вещество ЛБК-527. В обоих изученных дозах – 100 и 50 мг/кг – введение соединения вызывало уменьшение уровня МДА и его индуцированной формы в пределах их изменений группы интактных животных, при этом рост активности каталазы крови, превышающий уровень интактных крыс, также как и в случае с препаратом сравнения указывал на стимулирующее воздействие вещества на антиокислительный компонент системы (табл. 4.7).

Ввиду того, что каталаза является ферментом второго звена в антиокислительной системе, кроме того, не совсем корректно лишь на основании активности этого фермента в плазме крови судить об антиоксидантном потенциале печени, в описываемых группах изучили также активность ключевого фермента системы естественных антиоксидантов – супероксиддисмутазы. На рисунке 4.18 представлены результаты наших измерений.

Активность фермента в паренхиме печениинтактных крыс составляет в среднем $12,5 \pm 0,6$ IU/г ткани (рисунок 4.18). У животных с нарушением функциональной активности печенина фоне формирующегося алкогольного стеатогепатита регистрировали подавление ферментативной активности СОД бо-

лее, чем в два с половиной раза, что было пропорционально снижению активности уровня каталазы в плазме крови животных.



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 $p < 0,05$ (одномерный дисперсионный анализ, критерий Ньюмена-Кейлса)

Рисунок 4.18 Активность фермента супероксиддисмутаза (СОД, IU/г) в печени крыс с ОАП

В группах животных с ОАП, получающим в качестве фармакологического сопровождения препарат сравнения наблюдали гиперактивацию тканевой СОД на фоне обеих исследуемых доз.

Внутрижелудочное введение фармацевтической композиции, содержащей деанола ацеглумат и альфа-липоевую кислоту, в дозе 120 мг/кг приводило к повышению активности фермента антиоксидантной защиты при сравнении с группой контроля, однако не достигало показателя интактных крыс. Снижение в два раза вводимой внутрь дозы вещества сопровождалось потерей активирующего влияния на уровень активности СОД (рисунок 4.18).

При введении животным с острым гепатитом алкогольного происхождения вещества ЛБК-527 мы установили более выраженный профилактический эффект, не уступавший по силе эффекту референтного гепатопротекторного лекарственного средства в сопоставимых дозах.

Исследование отдельных элементов системы ПОЛ хотя и позволяет сделать выводы о функциональном состоянии или преобладании того или иного ее звена, тем не менее не всегда отвечает запросам исследователя. Обозначенным условиям отвечают интегративные показатели – общая антирадикальная активность (ОАА) ткани и общая оксидативная активность (ООА) ткани – определяемые по интенсивности световспышки хемилюминисцентным методом в модельной системе, в которой индуктором процессов ПОЛ выступает железо – металл переменной валентности. Результаты исследования суммированы в таблице 4.8.

В ткани печени интактных животных определили сбалансированные не зависящие от пола показатели антирадикальной и оксидативной активности, составившие соответственно $15,96 \pm 2,13$ и $16,74 \pm 3,35$ имп/с.

На 8 сутки после начала курсового внутрижелудочного введения животным раствора этилового спирта отмечали значительный рост свободнорадикальной активности паренхимы органа – до $73,15 \pm 4,62$ имп/с, тогда как уровень антиоксидантных систем падал до $6,54 \pm 1,15$ имп/с. Полученные ре-

зультаты в целом соответствовали изменения системы ПОЛ на уровне плазмы крови.

Таблица 4.8

Показатели интенсивности световспышки ткани печени крыс с ОАП

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 $p < 0,05$ (одномерная дисперсия Шапиро-Уилка, критерий Ньюмена-Кейлса)

Внутрижелудочное введение в течение 7 суток препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в обеих изученных дозах способствовало восстановлению исходного баланса свободнорадикальной тканевой активности, что было наиболее заметно при введении препарата в высшей терапевтической дозе. В группе животных, получавших референтный гепатопротектор в дозе 30 мг/кг, антиоксидантная активность вещества сохранялась. Исследуемые цитопротекторы – ЛБК-527 и ЛХТ-8-16 – также обладали антирадикальной активностью. Наибольший антиоксидантный эффект в виде снижения активности ПОЛ и пропорционального роста антиокислительной активности мы регистрировали при введении магнийсодержащего деривата 2-аминоэтансульфоновой кислоты в дозе 100 мг/кг. Наименьшая способность к сдерживанию процессов оксидативного стресса отмечалась в группе крыс, получавших фармацевтическую композицию ЛХТ-8-16 в минимальной дозе.

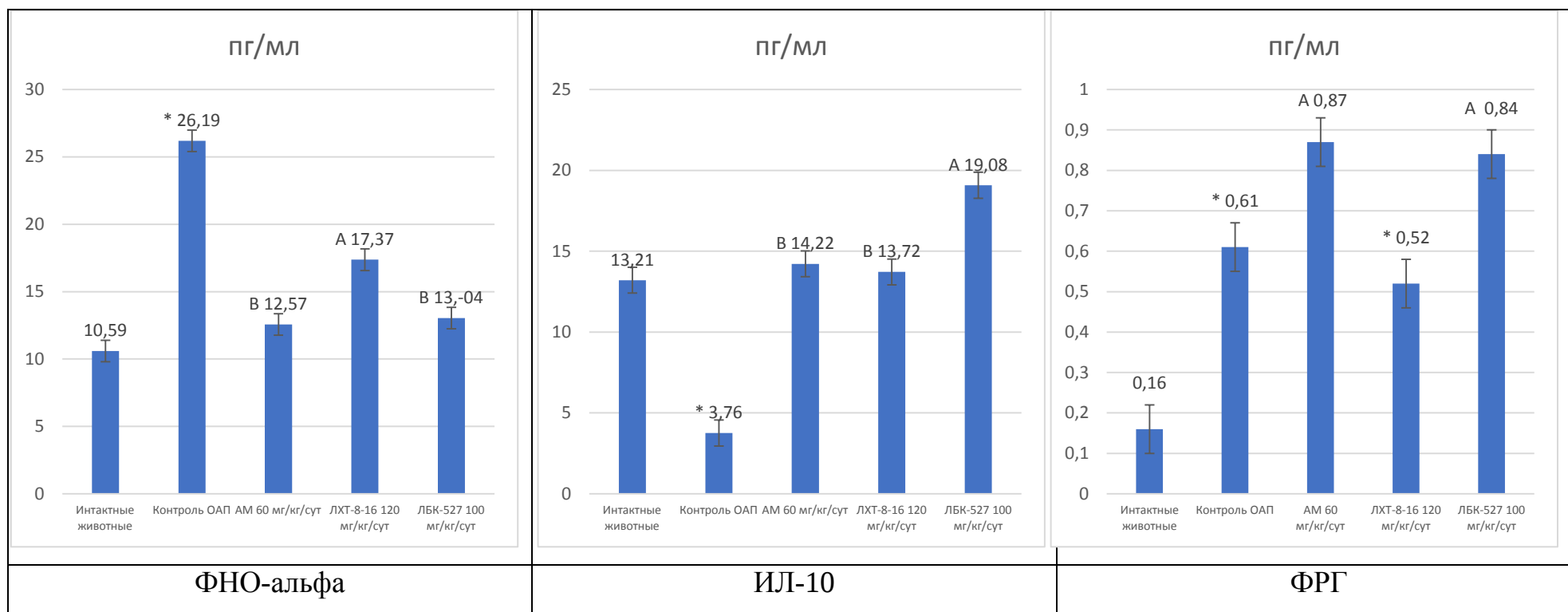
Таким образом, 7-суточное введение животным токсических доз этанола приводит к декомпенсации системной и локальной антирадикальной активности, проявляющейся подавлением активности ферментов-антиоксидантов каталазы и СОД и повышением плазменной концентрации ТБК-зависимых продуктов ПОЛ. Запуск тканевого оксидативного стресса, влекущего нарушение целостности клеточных мембран гепатоцитов, сопровождается формированием активного цитолитического и холестатического синдромов. Фармакологическое воздействие на печень животных веществами с цитопротекторной активностью ЛХТ-8-16 и ЛБК-527, осуществляемое параллельно с формированием патологического процесса позволяет сдерживать повреждающее действие этанола в отношении как свободнорадикальных реакций, так и биохимических проявлений печеночного повреждения. Наиболее эффективным гепатопротекторным эффектом при этом обладает соединение ЛБК-527, которое по изучаемым характеристикам не уступает гепатопротектору с доказанной активностью S-аденозил-L-метионину.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЁ АЛКОГОЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

Как мы уже отмечали в первой главе настоящего исследования в основе формирования острого алкогольного стеатогепатита лежит сложный каскад патологических процессов, включающий активацию внутриклеточных свободнорадикальных процессов, прямое повреждающее воздействие продуктов биodeградации этилового алкоголя на субклеточные структуры паренхимных клеток органа, ФНО-альфа опосредованный запуск воспалительных реакций и активация апоптоза гепатоцитов. Вместе с тем, в предшествующих разделах нашего исследования мы показали высокую гепатопротекторную активность отечественных перспективных соединений, одно из которых представляет собой фармацевтическую композицию деанола ацеглумата и альфа-липоевой кислоты, а другое является магнийсодержащим производным 2-аминоэтансульфоновой кислоты. Показанный эффект проявлялся как в предотвращении формирования морфологических – макро- и микроструктурных – изменений органа, свойственных острому алкогольному процессу, активации системных и локальных гидроперекисных процессов, так и в профилактике цитолитического и холестатического синдромов, нарушения пигментной функции печени. В этой связи представляло большой научный и практический интерес изучение роли некоторых ключевых молекулярно-биологических клеточных маркеров в реализации установленных эффектов.

5.1 Изучение уровня ФНО-альфа, ИЛ-10 и ФРГ при остром алкогольном повреждении и воздействии исследуемых веществ методом ИФА

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[12]. Результаты определения уровня ФНО-альфа, ИЛ-10 и ФРГ в гомогенате ткани органа животных представлены на рис. 5.19.



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 $p < 0,05$ (одномерная дисперсия Шапиро-Уилка, критерий Ньюмена-Кейлса)

Рисунок 5.19 Концентрация некоторых цитокинов в гомогенате печени при остром алкогольном повреждении на фоне соединений ЛБК-527 и ЛХТ-8-16

Концентрация изучаемых регуляторных молекул в гомогенате печени здоровых животных составила (рис. 5.19): ФНО- альфа $10,59 \pm 0,57$, ИЛ-10 – $13,21 \pm 2,45$ и ФРГ – $0,16 \pm 0,02$ пг/мл. Через 7 суток после курсового ежедневного внутрижелудочного введения животным раствора этилового спирта наблюдали повышение тканевой концентрации ФНО-альфа более, чем в два с половиной раза – в среднем до $26,19$ пг/мл ($p=0,001$ при сравнении с интактными животными) на фоне почти четырехкратного снижения уровня противовоспалительного цитокина – ИЛ-10 до $3,76$ пг/мл ($p=0,001$ при сравнении с интактными животными). При этом происходило пропорциональное (четырёхкратное) увеличение тканевой концентрации фактора роста гепатоцитов – до $0,61$ пг/мл ($p=0,001$ при сравнении с интактными животными), что мы расценили как компенсаторную реакцию, направленную на формирование гипертрофии гепатоцитов и их функциональное замещение в ответ на алкоголь-индуцированную гибель гепатоцитов.

Внутрижелудочное курсовое введение препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в дозе 60 мг/кг 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. Курсовое введение референтного лекарственного препарата приводило к еще большей активации гипертрофических процессов в органе, о чем свидетельствовало повышение содержания ФРГ до в среднем $0,87$ пг/мл, что было статистически достоверным при сравнении как с интактными, так и с контрольными животными (рис. 5.19).

Фармацевтическая композиция ЛХТ-8-16, состоящая из деанола ацеглумата и альфа-липоевой кислоты, при курсовом 7-суточном внутрижелудочном введении в дозе 120 мг/кг/сут также оказывала влияние на тканевые уровни исследуемых цитокинов (рис. 5.19): так, под действием композиции происходило снижение концентрации ФНО-альфа при сравнении с контрольными значениями, однако депрессия показателя не достигала уровня

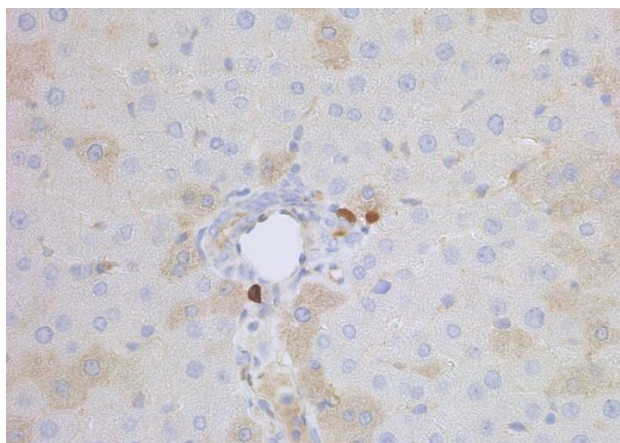
интактных животных. До интактных значений происходило восстановления концентрации в ткани печени ИЛ-10, тогда как содержание фактора роста гепатоцитов оставалось в рамках естественных компенсаторных реакций.

Магнийсодержащий дериват 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут также оказывал заметное влияние на тканевые концентрации цитокинов в печени животных с формирующимся острым алкогольным гепатитом (рис. 5.19): тканевая концентрация провоспалительного цитокина ФНО-альфа восстанавливалась до нормальной концентрации, наблюдаемой в печени интактных животных, на 50% выше, чем в интактной группе определялся уровень ИЛ-10. Что касается стимуляции клеточной гипертрофии и функции паренхимных клеток, то по этому показателю ЛБК-527 воспроизводил эффект препарата сравнения известного гепатопротектора S-аденозил-L-метионина.

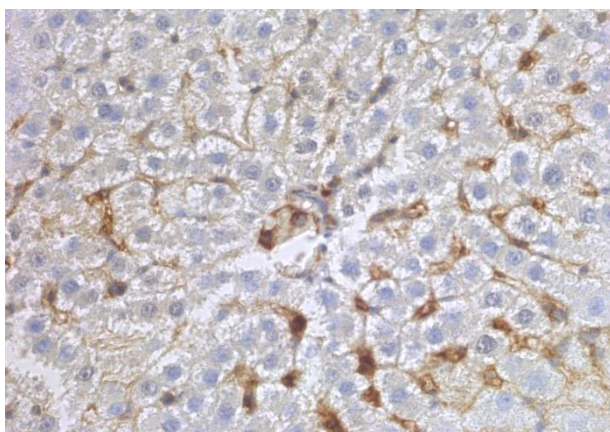
5.2 Изучение уровня экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации в печени крыс при остром алкогольном повреждении на фоне протекторного воздействия ЛБК-527 и ЛХТ-8-16

В качестве антиапоптотического маркера использовали регуляторный белок Bcl-2, который вовлечен в регуляцию апоптоза широкого спектра клеток человека и животных, и действует как ингибитор программируемой клеточной гибели [216]. Реализация биологической роли протеина осуществляется посредством формирования гетеродимеров между Bcl-2 и стимуляторами апоптоза – белками семейства Bax [217]. Экспрессия Bcl-2 на мембране клеток свидетельствует, кроме того, об их сенсibilизации к апоптотическим стимулам, таким как дефицит фактора роста нервов, радиоактивное излучение, некоторые химиотерапевтические лекарственные средства.

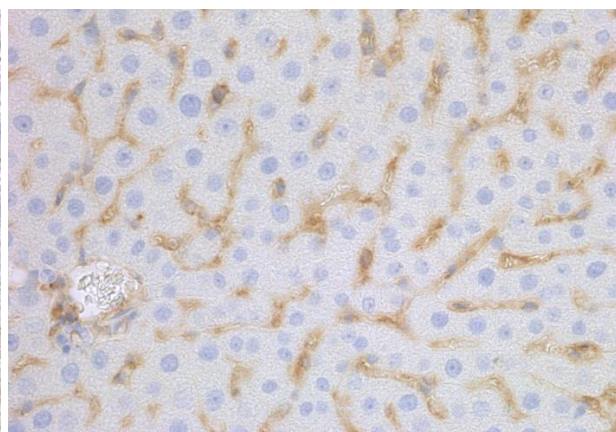
На рис. 5.20 представлены микропрепараты печени крыс, обработанные поликлональными кроличьими антителами анти-Bcl-2, группы интактных животных, на фоне формирования острого алкогольного повреждения, а также животных, наряду с воздействием токсических доз алкоголя получавших



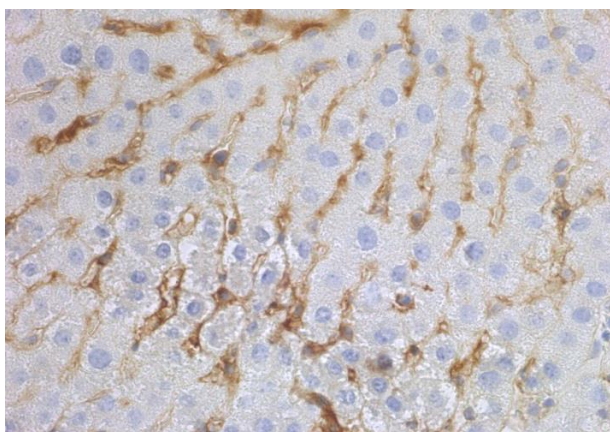
а



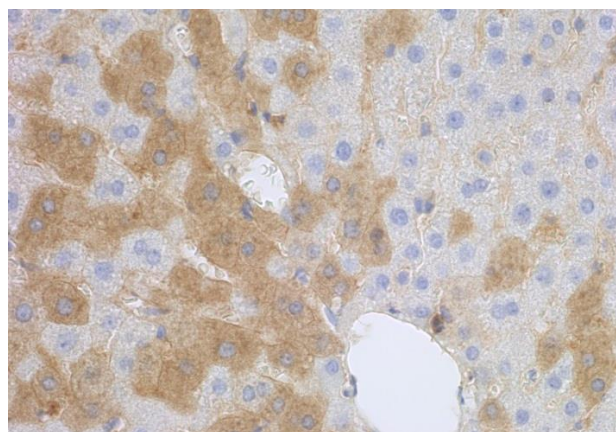
б



в



г



д

Рисунок 5.20 Bcl-2 в клетках печени (ув. 400): а) печень интактной крысы; б) печень крысы с ОАП (контроль); печень крысы с алкогольным процессом на фоне: в) АМ в дозе 60 мг/кг/сут; г) ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут; д) ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут; иммунопероксидазная реакция

гепатопротекторные лекарственные средства – препарат сравнения S-аденозил-L-метионин, вещества ЛБК-527 и ЛХТ-8-16 в дозах 60, 120 и 100 мг/кг/сут.

У интактных животных наблюдалась низкая экспрессия фактора-регулятора апоптоза, о чем судили по слабой интенсивности коричневого окрашивания гепатоцитов (рис. 5.20 а). Подобная иммуногистохимическая характеристика имело место как в центральной части, так и на периферии долики. На фоне формирования острого алкогольного гепатита в микропрепаратах печени животных происходило усиление экспрессии Bcl-2 (рис. 5.20б), что может свидетельствовать о компенсаторной активации защитных механизмов ткани на фоне формирующихся некрозов и воспалительной реакции: регистрировали умеренную иммуногистохимическую экспрессию маркера преимущественно в гепатоцитах центральных отделов долики.

Курсовое внутрижелудочное введение препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в дозе 60 мг/кг сопровождалось гиперэкспрессией Bcl-2 в цитоплазме гепатоцитов, при этом подавление апоптотического процесса распространялось равномерно и на гепатоциты центра, так и периферии печеночной долики (рис. 5.20 в). Фармацевтическая композиция деанола ацеглумата и липоевой кислоты ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг при 7-суточном внутрижелудочном введении способствовала повышению экспрессии Bcl-2 преимущественно в клетках центрального отдела долики печени (рис. 5.20г). Антиапоптотический эффект ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут был наибольшим и проявлялся окрашиванием наибольшей интенсивности мембран и цитоплазмы гепатоцитов преимущественно в центральном отделе долики печени (рис. 5.20д). Одним из наиболее чувствительных биологических маркеров апоптоза печеночных клеток является каспаза-3 [222]. Активация этого цитоплазматического фермента происходит в результате запуска сигнального внутриклеточного пути регуляции апоптоза под действием митохондриальных мессенджеров. Активированный регуляторной каспазой-9 фермент является ключевым фактором фрагментации ДНК, и, наряду с каспазами-6 и 7,

участвующими в демонтаже цитоскелета и сморщивании клетки, представляет собой ключевой производительный механизм апоптотического процесса.

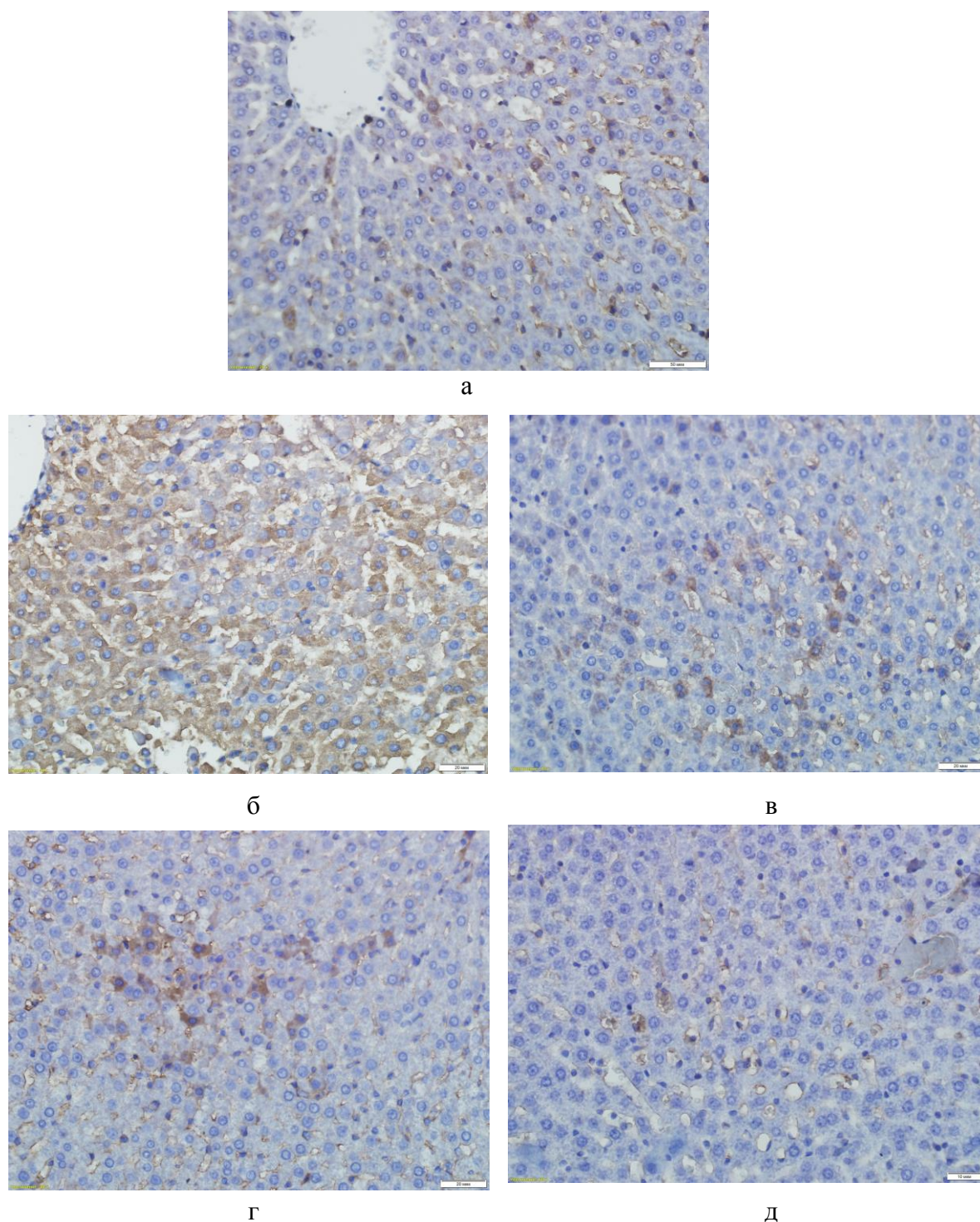
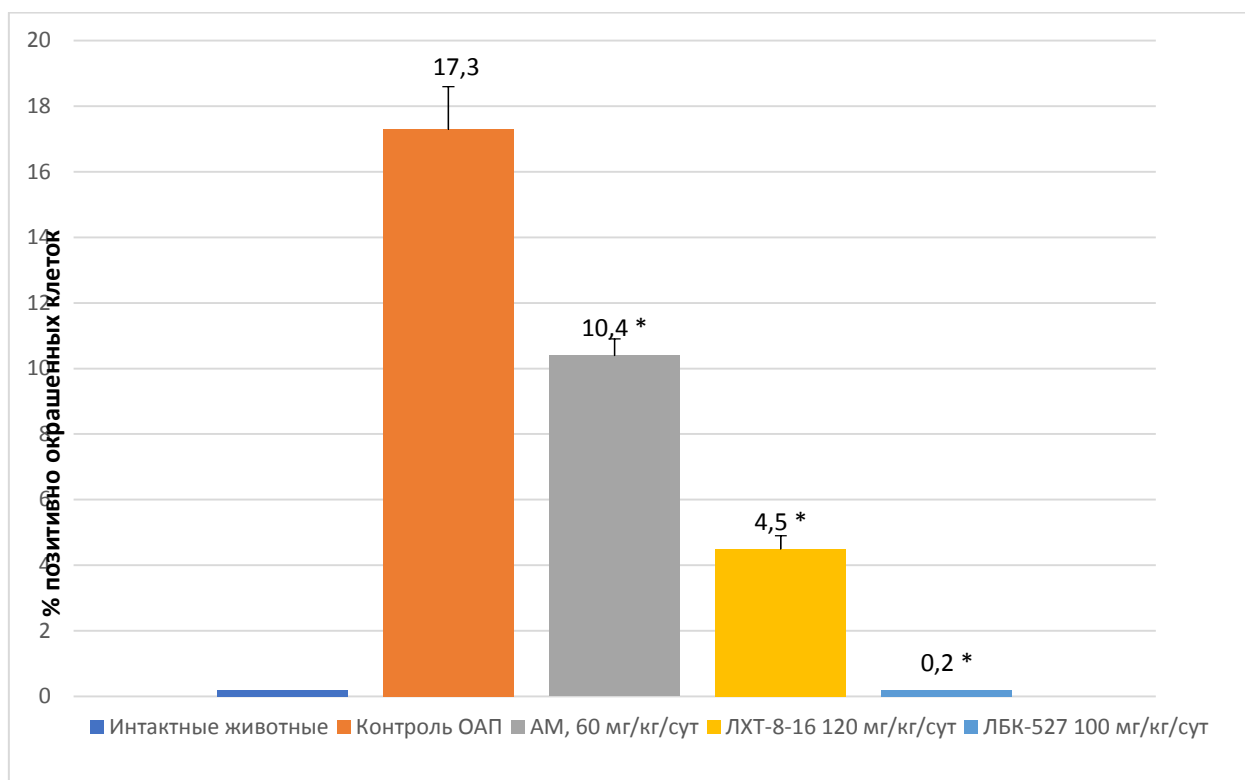


Рисунок 5.21 – Каспаза-3 в клетках печени (ув. 400): а) печень интактной крысы; б) печень крысы с ОАГ (контроль); печень крысы с алкогольным процессом на фоне: в) АМ в дозе 60 мг/кг/сут; г) ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут; д) ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут; иммунопероксидазная реакция

На рис. 5.21 и 5.22 представлены результаты исследования экспрессии каспазы 3 в цитоплазме гепатоцитов на фоне острого алкогольного поражения крыс и воздействия исследуемых соединений.

В печени крыс интактной группы не наблюдали положительного окрашивания цитоплазмы при их инкубировании с антителами к каспазе-3. В контрольной группе доля положительно окрашенных гепатоцитов в среднем составляла 17,3% (рис. 5.21 б, рис. 5.22). Исследуемые нами вещества при введении в высших терапевтических дозах, обладали антиапоптотическим эффектом, о чем говорило снижение доли позитивно-окрашенных клеток в препаратах печени животных на фоне курсового введения соединения ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут в среднем до 0,3%, а фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 – в среднем до 4,5%.



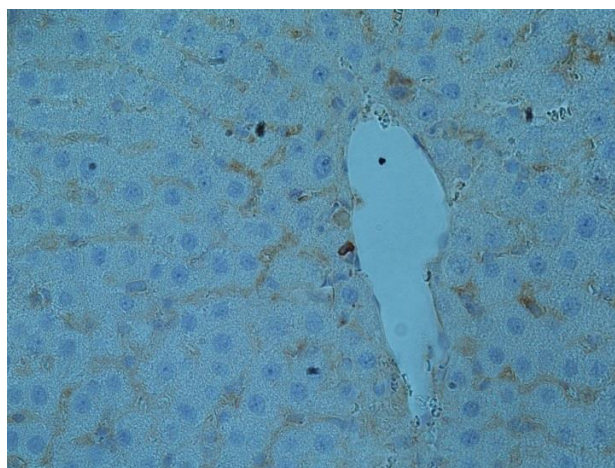
Примечание: * - различия достоверны при сравнении с контрольной группой при $p < 0,05$ (критерий Даннета)

Рисунок 5.22 Доля позитивно окрашенных клеток на каспазу-3 в препаратах печени крыс исследуемых групп

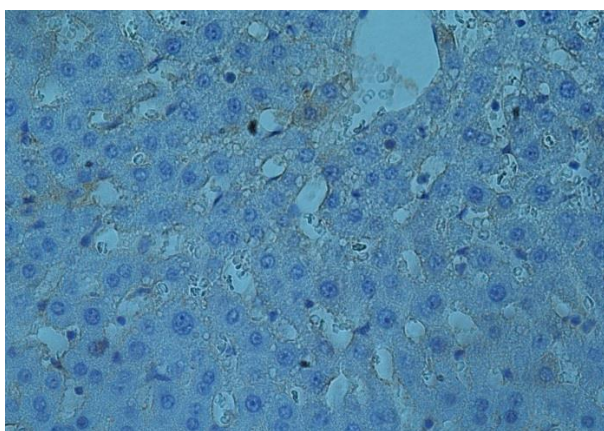
Ki-67 представляет собой высокочувствительный маркер клеточной пролиферации [219]. В исследованиях, проведенных коллективом авторов под руководством Gerder, было показано, что экспрессия маркера наблюдается во всех фазах клеточного цикла, за исключением G₀; в покоящихся клетках Ki-67 полностью перестает экспрессироваться при переходе клетки в фазу G₁[222].

На рис. 5.23 показаны окрашенные гематоксилином Мейера микропрепараты печени, инкубированные с моноклональными мышиными антителами к Ki-67. Паренхима печени интактных крыс представлена находящимися в состоянии покоя непролиферирующими гепатоцитами (рис. 5.23 а). На фоне острого алкогольного повреждения также не наблюдали экспрессию Ki-67 ни в центрлобулярных, ни в периферических отделах дольки печени (рис. 5.23 б). Фармакологическое воздействие в виде курсового внутрижелудочного введения препарата сравнения, а также исследуемых веществ в высших терапевтических дозах сопровождалось повышением экспрессии маркера пролиферации, причем на фоне S-аденозил-L-метионина в дозе 60 мг/кг наблюдали позитивное окрашивание ядер эндотелия синусоид, тогда как при использовании магнийсодержащего соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут положительная реакция наблюдалась преимущественно в ядрах гепатоцитов (рис. 5.23 в, г). Фармацевтическая композиция ЛХТ-8-16 не обладала способностью активировать пролиферацию гепатоцитов (рис. 5.23 д, рис. 5.24).

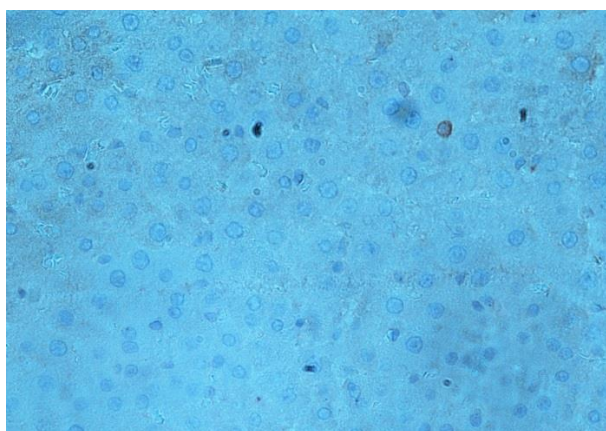
Также оценили уровень экспрессии такого специфического биологического маркера, как ядерный активатор клеточной пролиферации (PCNA) [222]. Мы установили, что на 8 сутки после курсового введения этилового алкоголя крысам экспрессии PCNA не происходит, что свидетельствует об отсутствии активно пролиферирующих клеток печени в этот момент. Подобная же картина наблюдается и в препаратах интактных животных – позитивно окрашенные ядра не определяются (рис. 5.25 а). Полученные результаты полностью коррелируют с таковыми для маркера Ki-67.



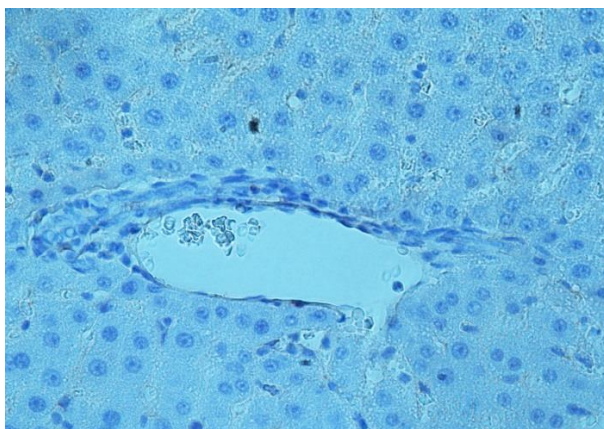
а



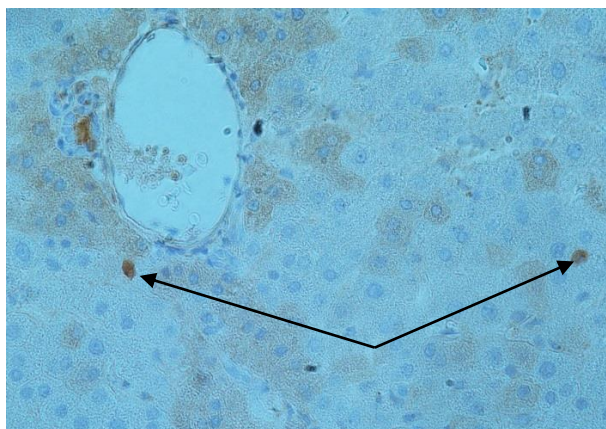
б



в



г



д

Рисунок 5.23 Ki-67 в ядрах гепатоцитов крыс (показано стрелкой, ув. 400): а) печень интактной крысы; б) печень крысы с ОАП (контроль); печень крысы с алкогольным процессом на фоне: в) АМ в дозе 60 мг/кг/сут; г) ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут; д) ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут; иммунопероксидазная реакция

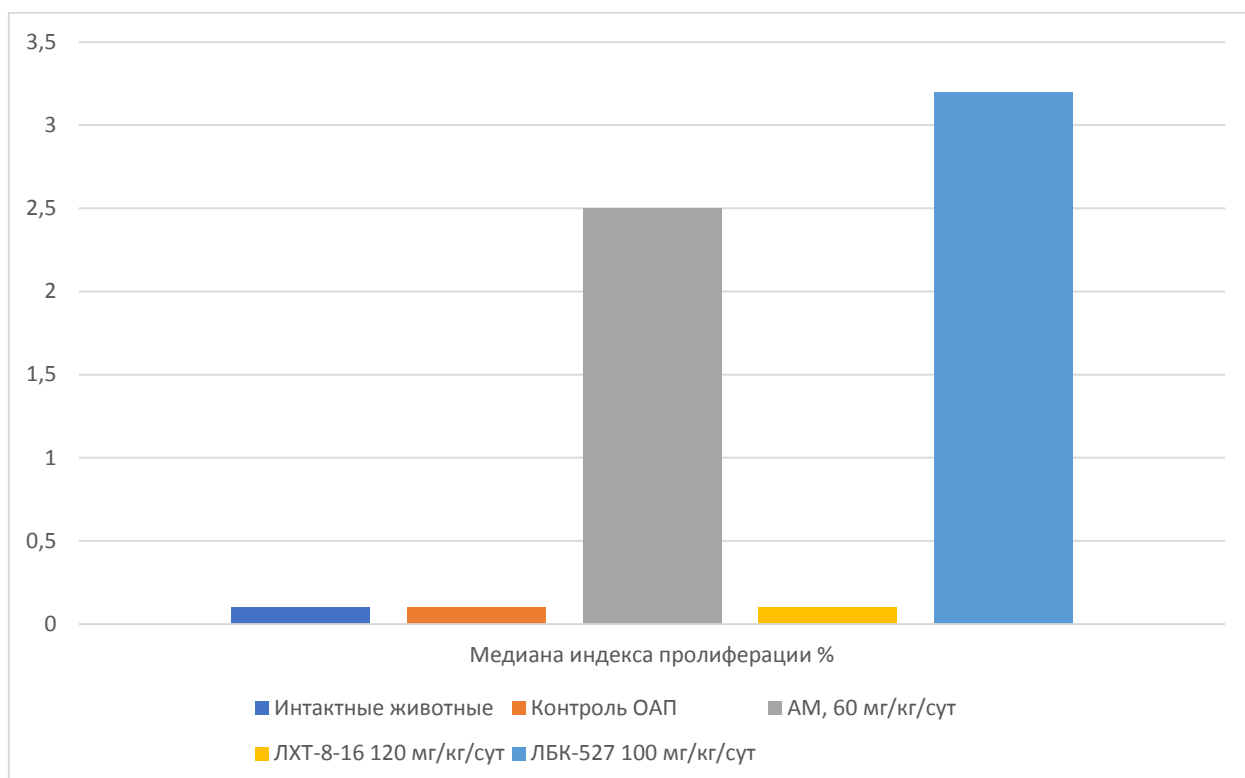
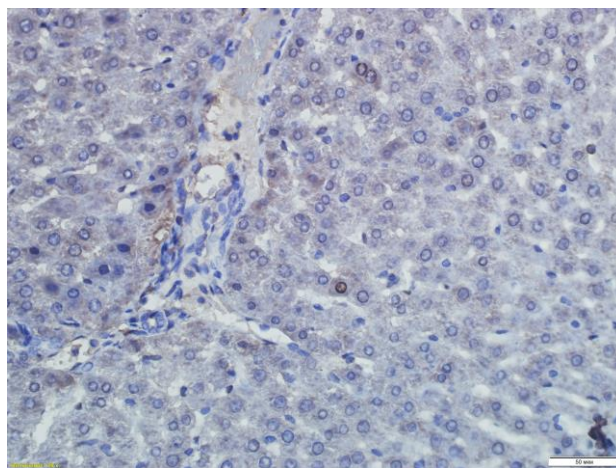


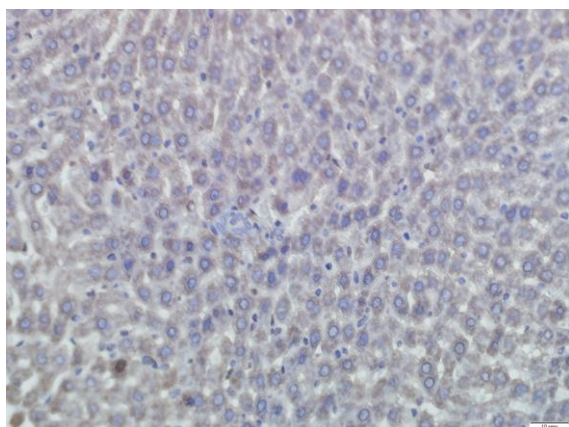
Рисунок 5.24 – Значение индекса пролиферации (по уровню экспрессии Ki-67) в печени крыс при ОАП

На фоне курсового введения препарата сравнения S-аденозил-L-метионина в дозе 60 мг/кг наблюдали незначительную активацию регенерации гепатоцитов, при этом количество регенерирующих клеток не превышало 2% от общего клеточного пула в полях зрения (рис. 5.25 б). Невысокая активность по стимуляции регенерации была подтверждена в том числе и значением предыдущего маркера.

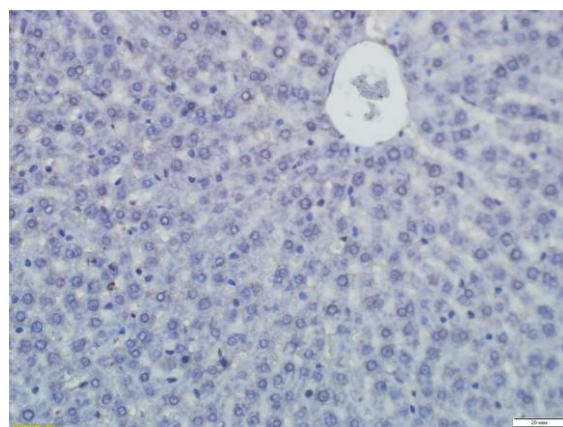
Исследуемые вещества более заметно стимулировали регенерацию гепатоцитов: на фоне магнийсодержащего соединения ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг и фармацевтической композиции ЛХТ-8-16 доля пролиферирующих гепатоцитов увеличивалась в среднем до 4,1 и 5,7% соответственно (рис. 5.25 г, д).



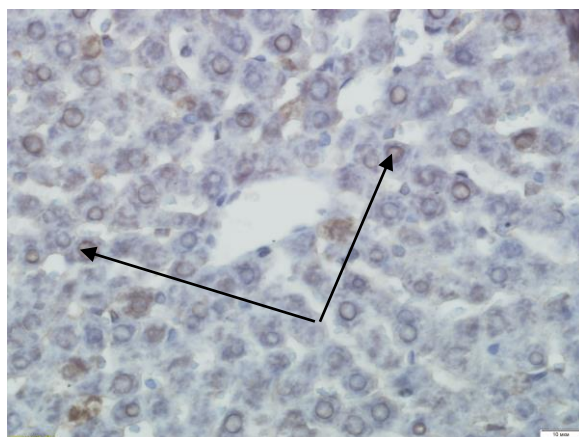
а



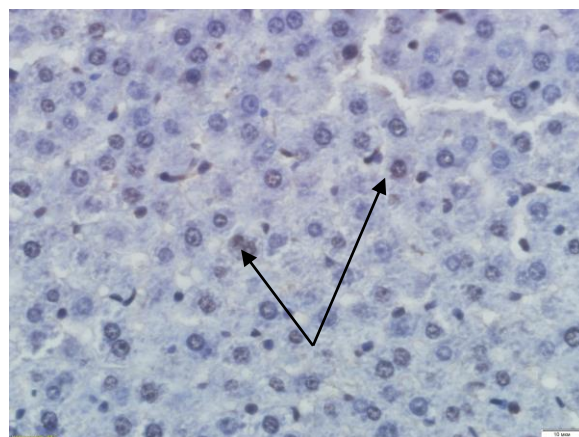
б



в



г



д

Рисунок 5.25 PCNA в ядрах гепатоцитов крыс (показано стрелкой, ув. 400): а) печень интактной крысы; б) печень крысы с ОАГ (контроль); печень крысы с алкогольным процессом на фоне: в) АМ в дозе 60 мг/кг/сут; г) ЛХТ-8-16 в дозе 120 мг/кг/сут; д) ЛБК-527 в дозе 100 мг/кг/сут; иммунопероксидазная реакция

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Избыточное употребление алкоголя вызывает целый спектр патологических процессов в печени, среди которых алкогольный стеатоз наблюдается практически у всех лиц, потребляющих в сутки 40 грамм и более чистого этилового алкоголя. Помимо стеатогепатоза алкогольная болезнь печени включает в себя такие патологические процессы, как воспаление различной степени выраженности, прогрессирующий фиброз у 10-35% алкоголиков и цирроз печени у 10-15% злоупотребляющих спиртным [33].

Большую озабоченность вызывает рост заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой лиц с АБП, у которых цирроз трансформируется в рак печени в 1-2% ежегодно [34]. 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 далеки от полного понимания, 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 в контексте продолжающегося патогенного воздействия алкоголя на организм. Ключевым компонентом эволюции клинических патологических форм АБП является прямое цитотоксическое действие основного метаболита, образующегося в процессе деградации алкоголя, – ацетальдегида [35].

Современный арсенал лекарственных средств, обладающих протективным воздействием на печень при ее повреждении различной этиологии, до-

вольно 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 обоснования молекулярных и клеточных мишеней потенциально эффективных новых фармакологических веществ чрезвычайно актуальной.

Целью настоящей работы явилось изучение гепатопротекторного действия соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты и фармацевтической композиции на его основе при остром алкогольном поражении 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.

Важнейшим вопросом, требовавшим разрешения при планировании исследования, был выбор оптимальной модели острого алкогольного поражения печени. Сложность выбора была продиктована сохраняющейся до настоящего времени дискуссией в мировой и отечественной литературе по вопросу об адекватности моделирования острого алкогольного гепатита условиям реальной клинической практики. В связи с этим за основу нами были взяты два фундаментальных 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 печени воспроизводили ежедневным внутрижелудочным введением 40% водного раствора этилового спирта в пересчете на 96% этанол в дозе 8 мл/кг веса животного в течение 7 суток.

Исследование выполнено на 160 белых нелинейных крысах самцах и самках исходным весом 180-220 г, полученных в филиалах «Андреевка» и «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. На всех животных были получены ветеринарные сертификаты. Крысы, включенные в исследование,

прошли двойной ветеринарный контроль: при отгрузке из питомника и при поступлении в экспериментально-биологическую клинику Мордовского университета. Для реализации поставленных в работе задач животные были разделены на несколько групп: крысы интактного контроля, крысы с острым алкогольным повреждением печени, животные с ОАП, получающие внутрижелудочно препарат сравнения в дозах 60 и 30 мг/кг, исследуемые вещества – ЛХТ-8-16 в дозе 120 и 60 мг/кг и ЛБК-527 – в дозе 100 и 50 мг/кг. Каждая группа включала по 20 крыс: в каждой группе было по 10 самцов и 10 самок. Включение большого числа животных в исследование было продиктовано необходимостью проведения масштабных исследований с привлечением широкого спектра методов, при том, что объектом выступали только печень и кровь животных. 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 приготовления блоков для микроморфологического исследования и ИГХ, у крыс второй подгруппы извлеченную печень использовали для окрашивания суданом-III и ИФА, а также определения активности ПОЛ. Кровь у животных первой подгруппы использовалась для биохимического исследования, в второй – для изучения системных свободнорадикальных процессов.

В работе были изучены морфологические и функциональные аспекты протекторного действия на печень двух оригинальных отечественных лекарственных веществ. Первое вещество – представляет собой магнийсодержащую соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты, заключенную в циклическую структуру – магния бис-ацетаминэтансульфонат (лабораторный шифр – ЛБК-527). Второе вещество является стабильной фармацевтической композицией деанола ацеглумата с альфа-липоевой кислотой (лабораторный шифр разработчика ЛХТ-8-16). Включенные в диссертационную работу соединения и композиции использовались в виде фармацевтических субстанций. Они представляли собой белый мелкокристаллический порошок без запаха (или, в

случае с ЛБК-527, с легким запахом сероводорода), хорошо растворимые в воде. Поскольку во всех экспериментальных группах использовался внутрижелудочный путь введения, необходимое количество вещества смешивали с 2% крахмальным гелем *ex tempore*.

При исследовании гепатопротекторного действия ЛБК-527 мы получили следующие результаты. Гистологическая картина алкогольного повреждения печени соответствовала явлениям гибели паренхиматозных клеток с формирующейся умеренной активностью воспалительного процесса по шкале Кноделя: отмечали полнокровие ткани с расширением сосудов и синусоид, явлением агрегации, сладжа эритроцитов и частичным внутрисосудистым гемолизом эритроцитов. Дольчатое строение печеночной ткани размыто, печеночные балки дискомплексированы. Наблюдались центролобулярные некрозы гепатоцитов. Гепатоциты центра доли с явлениями кариопикноза, кариолизиса, вакуолизации и лизиса цитоплазмы, свидетельствующие о формировании явлений дистрофии и цитолиза. Магниева соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты дозозависимо сдерживала развитие дистрофических и воспалительных явлений в органе (минимальное воспаление или отсутствие такового по Кноделю).

При проведении гистохимического исследования у крыс контрольной группы регистрировали формирование смешанного (крупно- и мелкокапельного) стеатоза, преимущественно затрагивающие портальные тракты и перипортальные зоны. Соединение ЛБК-527 в обеих исследуемых дозах заметно снижало выраженность явлений жировой дистрофии, что проявлялось как в снижении доли подверженных патологическим изменениям гепатоцитов, так и площади цитоплазмы паренхимных клеток, занятых каплями жира. В совокупности с описываемыми феноменами статистически значимое при сравнении с контролем увеличение доли двухъядерных гепатоцитов свидетельствовало об активации регенераторных механизмов в ткани органа.

Для наиболее объективного суждения об активности процессов программируемой гибели гепатоцитов и регенераторно-пролиферативного по-

тенциала паренхимы печени с использованием иммуногистохимического метода изучили уровень экспрессии активатора апоптоза каспазы-3, антиапоптотического фактора Bcl-2, ядерных маркеров пролиферации Ki-67 и PCNA в препаратах печени крыс. На фоне формирования острого повреждения в микропрепаратах печени животных происходило усиление экспрессии каспазы-3, свидетельствующее об активации апоптоза. Эффект ЛБК-527 проявлялся почти полным отсутствием окрашивания мембран и цитоплазмы гепатоцитов как в центральном отделе долики печени, так и на периферии.

При курсовом внутрижелудочном введении ЛБК-527 наблюдалась гиперэкспрессией антиапоптотического регуляторного маркера Bcl-2 в цитоплазме гепатоцитов.

Алкогольная интоксикация приводила к умеренной экспрессии Ki-67, что может говорить о компенсаторной активации защитных механизмов ткани на фоне формирующихся некрозов и воспалительной реакции. Экспрессию PCNA ни в центрлобулярных, ни в периферических отделах долики печени мы не регистрировали. Профилактическое введение ЛБК-527 сопровождалось повышением экспрессии маркера пролиферации в перипоральных зонах долики, что свидетельствует о наличии пролиферативного потенциала у данного соединения

Острое алкогольное поражение печени характеризовалось значительным ростом сывороточной концентрации АСТ и АЛТ с одновременной elevацией ферментативной активности ГГТП, что свидетельствовало о формировании активного алкогольного гепатита с выраженным цитолитическим синдромом и коррелировало с результатами морфологического исследования. Рост концентрации общего билирубина в плазме периферической крови на фоне повышения активности щелочной фосфатазы 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 соединения, преимущественно ЛБК-527, предотвраща-

ли рост ферментативной активности ЩФ, и плазменной концентрации общего билирубина. Профилактика холестаза и значимое снижение ферментемии внутриклеточных энзимов доказывало выраженный цитопротекторный эффект исследуемых веществ в отношении паренхимных 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, 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 L-аденозил-S-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. Также 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. 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. 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 паренхимных клеток 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 протективной 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 терапевтической дозе 120 мг/кг. 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). 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 видно, что композиция ЛХТ-8-16 в высшей дозе достоверно снижает долю гепатоцитов с жировыми включениями в цитоплазме и площадь цитоплазмы, занятой липидными каплями, тогда как на фоне введения ЛХТ-8-16 в дозе 60 мг/кг такого эффекта не наблюдали.

При проведении иммуногистохимического исследования было установлено незначительное влияние композиции на процессы апоптоза гепатоцитов и клеточной пролиферации: экспрессия каспазы-3 умеренно снижалась, тогда как площадь и интенсивность окрашивания микропрепаратов, обработанных антителами к Ki-67, Bcl-2 и PCNA не отличались от контроля.

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. Снижение активности цитолиза, наблюдаемое при введении композиции в высшей терапевтической дозе, протекает на фоне сохраняющегося холестаза.

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.

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 аденозилметионину. В частности, ЛБК-527 не уступает препарату сравнения по силе

противовоспалительного эффекта и способности предотвращать стеатоз гепатоцитов, в то время как у композиции ЛХТ-8-16 установлена лишь умеренная активность. Магнийсодержащее производное аминокислоты 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. Аденозил-метионин и ЛБК-527 односторонне подавляют апоптотическую готовность и пролиферативный потенциал печеночной ткани, что нельзя сказать о композиции ЛХТ-8-16.

6.1 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.

6.2 Перспективы дальнейшей разработки темы исследования

Основные результаты, полученные при проведении настоящего исследования, помимо ответов на вопросы теоретической и практической медицины, открывают и широкие перспективы для продолжения научного поиска в указанных направлениях. В теоретическом аспекте безусловно большой научный интерес представляют исследования молекулярно-биологических и клеточных реакций паренхимных клеток печени, их предшественников на пролиферативные триггеры при острых токсических повреждениях органа,

воздействие на которые могло бы способствовать восстановлению клеточного пула и структурной целостности органа. Идентификация внутриклеточных сигнальных путей и ассоциированных с ними процессов запуска клеточного деления и дифференцировки является новым горизонтом для обоснования перспективных лечебных технологий направленного – таргетного – действия. В этой связи дальнейшего изучения требует и роль внутриклеточных свободнорадикальных процессов, важнейшее значение в реализации которых принадлежит мембране митохондрий и регуляции ее проницаемости.

В практическом аспекте безусловно перспективным является продолжение исследований в области фармакологических эффектов, а также механизмов их развития, соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты и фармацевтических композиций на их основе, изучения фармакокинетики и биодоступности веществ, определения оптимальных путей и ритмов введения, разработки рациональных лекарственных форм.

ВЫВОДЫ

1. Внутривенное 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, получающих 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 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 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-глутамилтранспептидазы 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.

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 свободнорадикальной 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.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Королева, М.В. Экзогенно-токсический гепатит. Современный взгляд на этиологию, патогенез, клиническое течение [Текст] / М.В. Королева // Лекарственный вестник. – 2015. Т. 58, №2. – С.18-22
2. Лопаткина, Т.Н. Лекарственные поражения печени. /Т.Н.Лопаткина, Э.З. Бурневич. – В кн.«Практическая гепатология», под ред. Н.А. Мухина. – М., 2004. – С. 133–136.
3. Kafrouni, M.I. Hepatotoxichnost, obuslovlennaya primeneniem dieticheskikh dobavok, sodergashih anaboliticheskie steroid [Текст] / M.I. Kafrouni, R.A. Anders, S. Verma // Clinicheskaya Gastroenterologiya I gepatologiya. – 2009. – Т. 2(3). – Р. 163-167
4. Еремина, Е.Ю. Лекарственный гепатит [Текст] / Е.Ю. Еремина // Практическая медицина. – 2014. – Т. 1, №77. – С. 20-29
5. Massey, V.L. Acute alcohol-induced liver injury [Text] / V.L. Massey and G.E. Arteel // Front. Physio. – 2012. – Vol. 3. – P. 193. doi: 10.3389/fphys.2012.00193
6. Role of liver progenitors in acute liver injury [Text] / J. Best, L. Dollé, P. Manka et al. // Front. Physiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 258. doi: 10.3389/fphys.2013.00258
7. Dioscin Protects ANIT-Induced Intrahepatic Cholestasis Through Regulating Transporters, Apoptosis and Oxidative Stress [Text] / H. Yao, Y. Xu, L. Yin et al. // Front. Pharmacol. – 2017. – Vol. 8. – P. 116. doi: 10.3389/fphar.2017.00116
8. The importance of redox state in liver damage [Text] / L. Cesaratto, C. Vascotto, S. Calligaris and G. Tell // Ann. Hepatol. – 2004. – Vol. 3. – P. 86-92.
9. Гепатопротекторная активность деанолаацеглумата при экспериментальном стресс-индуцированном поражении печени и сахарном диабете [Текст] / Д.С. Блинов, Е.Д. Гогина, Т.С. Крупнова и др. // экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 74, №4. – С. 17-19.

10. Блинова, Е.В. Гепатопротекторная активность аминокетансульфоната магния у беременных крыс с экспериментальным парацетамоловым и этаноловым гепатитом [Текст] / Е.В. Блинова, М.С. Хальзова, Д.С. Блинов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – Т. 134, №10. – С. 50-53.
11. Морфологические аспекты применения некоторых цитопротекторов при острых гепатитах у беременных в эксперименте [Текст] / Е.В. Блинова, М.Х.С. Яхья, Д.С. Блинов и др. // Морфология. – 2016. – Т. 149, №3. – С. 36-37.
12. Alcohol effects on TNF- α and IL-10 production in an ex-vivo model of whole blood stimulated by LPS [Text] / A. Gavala, P. Myrianthefts, K. Venetsanou et al. // J. Psychiatry.– 2015. – Vol. 18. – P. 339 doi:10.4172/2378-5756.1000339
13. Dolganiuc, A. In vitro and in vivo models of acute alcohol exposure [Text] / A. Dolganiuc, G. Szabo //World J. Gastroenterol. – 2009. – Vol. 15. – P. 1168-1177.
14. Методические рекомендации по изучению гепатопротекторной активности лекарственных средств / А.И. Венгеровский, В.В. Удут, Д.В. Рейхарт, А.М. Дыгай. – В кн. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А.Н. Миронова. – М.: ГрифиКо, 2012. – С. 710-718.
15. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders [Text] / J. Rehm, C. Mathers, S. Popova, et al. // Lancet. – 2009. – Vol. 373. – P. 2223-2233.
16. World Health Organization. European status report on alcohol and health 2010 [Text]. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2010.
17. Modeling the impact of alcohol dependence on mortality burden and the effect of available treatment interventions in the European Union [Text] / J. Rehm, K.D. Shield, G. Gmel, et al. // Eur. Neuropsychopharmacol. – 2013. – Vol. 23. – P. 89-97.

18. Rehm, J. Global burden of alcoholic liver diseases [Text] / J. Rehm, A.V. Samokhvalov, K.D. Shield // J. Hepatol. – 2013. – Vol. 59. – P. 160-168.
19. Stikel, F. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: update 2016 [Text] / F. Stickel, C. Datz, J. Hampe, and R. Bataller // Gut and Liver. – 2017. – Vol. 11, No. 2. – P. 173-188.
20. Leon, D.A. Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data [Text] / D.A. Leon, J. McCambridge // Lancet. – 2006. – Vol. 367. – P. 52-56.
21. Case, A. Rising morbidity and mortality in midlife among white non-Hispanic Americans in the 21st century [Text] / A. Case, A. Deaton // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2015. – Vol. 112. – P. 15078-15083.
22. Yadav, D. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer [Text] / D. Yadav, A.B. Lowenfels // Gastroenterology. – 2013. – Vol. 144. – P. 1252-1261.
23. Comorbidity of fetal alcohol spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis [Text] / S. Popova, S. Lange, K. Shield, et al. // Lancet. – 2016. – Vol. 387. – P. 978-987.
24. Seitz, H.K. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis [Text] / H.K. Seitz, F. Stickel // Nat. Rev. Cancer. – 2007. – Vol. 7. – P. 599-612.
25. Fernández-Solà, J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption [Text] / J. Fernández-Solà // Nat. Rev. Cardiol. – 2015. – Vol. 12. – P. 576-587.
26. Depression in patients with alcohol use disorders: systematic review and meta-analysis of outcomes for independent and substance-induced disorders [Text] / J.A. Foulds, S.J. Adamson, J.M. Boden, et al. // J. Affect. Disord. – 2015. – Vol. 185. – P. 47-59.
27. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis [Text] / A.A. Mokdad, A.D. Lopez, S. Shahrzaz, et al. // BMC Med. – 2014. – Vol. 12. – P. 145.

28. World Health Organization. Global health estimates (GEHE) 2014: YLL by age, sex and cause [Text]. Geneva: World Health Organization, 2012.
29. World Health Organization. WHO mortality database: raw data files [Text]. Geneva: World Health Organization, 2015.
30. Sheron, N. Alcohol and liver disease in Europe: simple measures have the potential to prevent tens of thousands of premature deaths [Text] / N. Sheron // J. Hepatol. – 2016. – Vol. 64. – P. 957-967.
31. Liver transplantation for alcoholic liver disease in Europe: a study from the ELTR (European Liver Transplant Registry) [Text] / P. Burra, M. Senzolo, R. Adam, et al. // Am. J. Transplant. – 2010. – Vol. 10. – P. 138-148.
32. Sheron, N. Projections of alcohol deaths: a wake-up call [Text] / N. Sheron, C. Hawkey, I. Gilmore // Lancet. – 2011. – Vol. 377. – P. 1297-1299.
33. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver [Text] / M.R. Teli, C.P. Day, A.D. Burt et al. // Lancet. – 1995. – Vol. 346. – P. 987-990.
34. Stickel, F. Alcoholic cirrhosis and hepatocellular carcinoma [Text] / F. Stikel // Adv. Exp. Med. Biol. – 2015. – Vol. 815. – P. 113-130.
35. Konishi, M. Role of microsomal enzymes in development of alcoholic liver diseases [Text] / M. Konishi, H. Ishii // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol. 22, Suppl. 1. – S7-S10.
36. Dynamics of cytochrome P4502E1 activity in man: induction by ethanol and disappearance during withdrawal phase [Text] / C.M. Oneta, C.S. Lieber, J. Li, et al. // J. Hepatol. – 2002. – Vol. 36. – P. 47-52.
37. Alcoholic liver disease: clinical and translational research [Text] / M.G. Neuman, S. Malnick, Y. Maor, et al. // Exp. Mol. Pathol. – 2015. – Vol. 99. – P. 596-610.
38. Inhibition of ethanol-induced liver disease in the intragastric feeding rat model by chlormethiazole [Text] / Z. Gouillon, D. Lucas, J. Li, et al. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 2000. – Vol. 224. – P. 302-308.

39. Cytochrome P450 CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver [Text] / B.U. Bradford, H. Kono, F. Isayama, et al. // *Hepatology*. – 2005. – Vol. 41. – P. 336-344.
40. European Code against Cancer 4th Edition: alcohol drinking and cancer [Text] / C. Scoccianti, M. Cecchini, A.S. Anderson, et al. // *Cancer Epidemiol.* – 2015. – Vol. 39, Suppl. 1. – S67-S74.
41. Gao, B. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [Text] / B.Gao, R.Bataller // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 141. – P. 1572-1585.
42. Brunt, E.M. Fatty liver disease: alcoholic and non-alcoholic [Text] / E.M. Brunt, B.A. Neuschwander-Tetri, A.D. Burt // In: Burt A, Portmann B, Ferrell L, eds. *MacSween's pathology of the liver*. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2012. – P. 293-360.
43. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration [Text] / Y.S. Roh, B. Zhang, R. Loomba, E. Seki // *Am. J. Physiol. Gastrointest.Liver.Physiol.* – 2015. – Vol. 309. – G30-G41.
44. An, L. Cytokines in alcoholic liver disease [Text] / L. An, X. Wang, A.I. Cederbaum // *Arch. Toxicol.* – 2012. – Vol. 86. – P. 1337-1348.
45. Petrasek, J. Toll-like receptors in liver disease [Text] / J. Petrasek, T. Csak, G. Szabo // *Adv. Clin.Chem.* – 2013. – Vol. 59. – P. 155-201.
46. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease [Text] / A. Lemmers, C. Moreno, T. Gustot, et al. // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 49. – P. 646-657.
47. Szabo, G. Inflammasome activation and function in liver disease [Text] / G. Szabo, J. Petrasek // *Nat. Rev. Gastroenterol.Hepatol.* – 2015. – Vol. 12. – P. 387-400.

48. Schuppan, D. Liver fibrosis: common mechanisms and antifibrotic therapies [Text] / D. Schuppan// Clin. Res. Hepatol.Gastroenterol. – 2015. – Vol. 39, Suppl. 1. – S51-S59.

49. Early response of alpha-2(I) collagen to acetaldehyde in human hepatic stellate cells is TGF-beta independent [Text] / G. Svegliati-Baroni, Y. Inagaki, A.R. Rincon-Sanchez, et al. // Hepatology. – 2005. – Vol. 42. – P. 343-352.

50. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis [Text] / R. Bataller, R.F. Schwabe, Y.H. Choi, et al. // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112. – P. 1383-1394.

51. Competitive inhibition of leptin signaling results in amelioration of liver fibrosis through modulation of stellate cell function [Text] / E. Elinav, M. Ali, R. Bruck, et al. //Hepatology. – 2009. – Vol. 49. – P. 278-286.

52. Cannabinoid receptor type I modulates alcohol-induced liver fibrosis [Text] / E. Patsenker, M. Stoll, G. Millonig, et al. // Mol. Med. – 2011. – Vol. 17. – P. 1285-1294.

53. 4-Hydroxynonenal as a selective profibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells [Text] / E. Zamara, E. Novo, F. Marra, et al. // J. Hepatol. – 2004. – Vol. 40. – P. 60-68.

54. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors [Text] / G. Fattovich, T. Stroffolini, I. Zagni, F. Donato // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 127, Suppl. 1. – S35-S50.

55. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma [Text] / A. Villanueva, A. Portela, S. Sayols, et al. // Hepatology. – 2015. – Vol. 61. – P. 1945-1956.

56. Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis [Text] / L. Dubuquoy, A. Louvet, G. Lassaillly, et al. // Gut. – 2015. – Vol. 64. – P. 1949-1960.

57. Hepatic cell proliferation plays a pivotal role in the prognosis of alcoholic hepatitis [Text] / N. Lanthier, L. Rubbia-Brandt, N. Lin-Marq, et al. // J. Hepatol. – 2015. – Vol. 63. – P. 609-621.

58. Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis [Text] / P. Sancho-Bru, J. Altamirano, D. Rodrigo-Torres, et al. // Hepatology. – 2012. – Vol. 55. – P. 1931-1941.

59. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges [Text] / S. Mathews, M. Xu, H. Wang, A. Bertola, B. Gao// Am. J. Physiol. Gastrointest.Liver Physiol. – 2014. – Vol. 306. – G819-G823.

60. Alcoholic hepatitis: translational approaches to develop targeted therapies [Text] / P. Mandrekar, R. Bataller, H. Tsukamoto, B. Gao // Hepatology. – 2016. – Vol. 64. – P. 1343-1355.

61. Models of alcoholic liver disease in rodents: a critical evaluation [Text] / P. de la M Hall, C.S. Lieber, L.M. DeCarli, et al. // Alcohol.Clin. Exp. Res.– 2001. – Vol. 25, 5 Suppl. ISBRA. – 254S-261S.

62. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)[Text] / A. Bertola, S. Mathews, S.H. Ki, et al.// Natural Protoc. – 2013. – Vol. 8. – P. 627-637.

63. Shalem, O. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9 [Text] / O. Shalem, N.E. Sanjana, F. Zhang // Nat. Rev. Genet. – 2015. – Vol. 16. – P. 299-311.

64. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence [Text] / H. Zhu, Z. Jia, H. Misra,Y.R. Li // J. Dig.Dis. – 2012. – Vol. 13, No. 3. – P. 133–142.

65. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases [Text] / S.K. Mantena, A.L. King,

K.K. Andringa, H.B. Eccleston, S.M. Bailey // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – Vol. 44. – P. 1259-1272.

66. Beier, J.I. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease [Text] / J.I. Beier, C.J. McClain // Biol. Chem. – 2010. – Vol. 391. – P. 1249-1264.

67. Cederbaum, A.I. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury [Text] / A.I. Cederbaum, Y. Lu, D. Wu // Arch. Toxicol. – 2009. – Vol. 83. – P. 519-548.

68. Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition [Text] / M.J. Ronis, A. Butura, B.P. Sampey, et al. // Free Radic. Biol. Med. – 2005. – Vol. 39. – P. 619-630.

69. Combined effects of vitamin C, vitamin E, and sodium selenate supplementation on absolute ethanol-induced injury in various organs of rats [Text] / R. Yanardag, O. Ozsoy-Sacan, S. Ozdil, S.Bolkent // Int. J. Toxicol. – 2007. – Vol. 26. – P. 513-523.

70. Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats [Text] / H. Kono, G.E. Arteel, I. Rusyn, H. Sies, R.G. Thurman // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30. – P. 403-411.

71. S-adenosylmethionine (SAdMe) protects against acute alcohol induced hepatotoxicity in mice small star, filled [Text] / Z. Song, Z. Zhou, T. Chen, et al. // J. Nutr. Biochem. – 2003. – Vol. 14. – P. 591-597.

72. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice [Text] / J.M. Ajmo, X. Liang, C.Q. Rogers, B. Pennock, M. You // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2008. – Vol. 295. – G833-842.

73. Adiponectin and hemoxygenase-1 suppress TLR4/MyD88-independent signaling in rat Kupffer cells and in mice after chronic ethanol exposure [Text] / P. Mandal, S. Roychowdhury, P.H. Park, et al. // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185. – P. 4928-4937.

74. Curcumin alleviates ethanol-induced hepatocytes oxidative damage involving hemoxygenase-1 induction [Text] / W. Bao, K. Li, S. Rong, et al. // J. Ethnopharmacol. – 2010. – Vol. 128. – P. 549-553.

75. Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats [Text] / M.D. Wheeler, H. Kono, M. Yin, et al. // *Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 120. – P. 1241-1250.

76. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat [Text] / M.D. Wheeler, M. Nakagami, B.U. Bradford, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 36664-36672.

77. Zhou, Z. Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress [Text] / Z. Zhou, X. Sun, Y. James Kang // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. – 2002. – Vol. 227. – P. 214-222.

78. Exogenous thioredoxin prevents ethanol-induced oxidative damage and apoptosis in mouse liver [Text] / J.I. Cohen, S. Roychowdhury, P.M. DiBello, et al. // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 49. – P. 1709-1717.

79. Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase [Text] / I.G. Kessova, Y.S. Ho, S. Thung, A.I. Cederbaum // *Hepatology*. – 2003. – Vol. 38. – P. 1136-1145.

80. Chronic ethanol consumption results in atypical liver injury in copper/zinc superoxide dismutase deficient mice [Text] / T.V. Curry-McCoy, N.A. Osna, A.A. Nanji, T.M. Donohue Jr. // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2010. – Vol. 34. – P. 251-261.

81. Ethanol-induced liver injury and changes in sulfur amino acid metabolomics in glutathione peroxidase and catalase double knockout mice [Text] / S.J. Kim, J.W. Lee, Y.S. Jung, et al. // *J. Hepatology*. – 2009. – Vol. 50. – P. 1184-1191.

82. Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury [Text] / Z. Zhou, X. Sun, J.C. Lambert, et al. // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 160. – P. 2267-2274.

83. Concerted action of sulfiredoxin and peroxiredoxin I protects against alcohol-induced oxidative injury in mouse liver [Text] / S.H. Bae, S.H. Sung, E.J. Cho, et al. // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 53. – P. 945-953.

84. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury [Text] / J. Lamle, S. Marhenke, J. Borlak, et al. // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 134. – P. 1159-1168.
85. Klaassen, C.D. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver [Text] / C.D. Klaassen, S.A. Reisman // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 244. – P. 57-65.
86. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats [Text] / A. Boveris, C.G. Fraga, A.I. Varsavsky, O.R.Koch // *Arch. Biochem.Biophys.*– 1983. – Vol. 227. – P. 534-541.
87. Kukielka, E. Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment [Text] / E. Kukielka, E. Dicker, A.I. Cederbaum // *Arch. Biochem.Biophys.*– 1994. – Vol. 309. – P. 377-386.
88. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis [Text] / M. Giorgio, E. Migliaccio, F. Orsini, et al. // *Cell*. – 2005. – Vol. 122. – P. 221-233.
89. Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage [Text] / O.R. Koch, S. Fusco, S.C. Ranieri, et al. // *Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 88. – P. 750-760.
90. Chronic alcohol-induced liver injury and oxidant stress are decreased in cytochrome P4502E1 knockout mice and restored in humanized cytochrome P4502E1 knock-in mice [Text] / Y. Lu, D. Wu, X. Wang, et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 49. – P. 1406-1416.
91. De Minicis, S. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex [Text] / S. De Minicis, D.A. Brenner // *J. Gastroenterol.Hepatol.*– 2008. – Vol. 23, Suppl. 1. – S98-103.
92. Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo [Text] / J.A. Spitzer, M. Zheng, J.K. Kolls, et al. // *Front.Biosci.*– 2002. – Vol. 7. – 99–108.
93. Yang, E.S. Ethanol induces peroxynitrite-mediated toxicity through inactivation of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase and superoxide dis-

mutase[Text] / E.S. Yang, J.H. Lee, J.W. Park // Biochimie. – 2008. – Vol. 90. – P. 1316-1324.

94. Hepatic mitochondrial DNA depletion after an alcohol binge in mice: probable role of peroxynitrite and modulation by manganese superoxide dismutase [Text] / I. Larosche, P. Letteron, A. Berson, et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2010. – Vol. 332. – P. 886-897.

95. Alcohol and hepatocyte-Kupffer cell interaction (review) [Text] / M. Ajakaiye, A. Jacob, R. Wu, et al. // Mol. Med. Report. – 2011. – Vol. 4. – P. 597-602.

96. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol- induced liver disease [Text] / H. Kono, I. Rusyn, M. Yin, et al. // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 106. – P. 867-872.

97. Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice [Text] / S.E. McKim, E. Gabele, F. Isayama, et al. // Gastroenterology. – 2003. – Vol. 125. – P. 1834-1844.

98. The role of iNOS in alcohol-dependent hepatotoxicity and mitochondrial dysfunction in mice [Text] / A. Venkatraman, S. Shiva, A. Wigley, et al. // Hepatology. – 2004. – Vol. 40. – P. 565-573.

99. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells [Text] / N. Nieto, S.L. Friedman, P. Greenwel, A.I.Cederbaum // Hepatology. – 1999. – Vol. 30. – P. 987-996.

100. Acetaldehyde inhibits PPARgamma via H2O2-mediated c-Abl activation in human hepatic stellate cells [Text] / E. Ceni, D.W. Crabb, M. Foschi, et al. // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 131. – P. 1235-1252.

101. Dey, A. Alcohol and oxidative liver injury [Text] / A. Dey, A.I.Cederbaum // Hepatology. – 2006. – Vol. 43. – S63-74.

102. Sato, N. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology [Text] / N. Sato // J. Gastroenterol.Hepatol.– 2007. – Vol. 22, Suppl. 1. – S1-6.

103. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases [Text] / Y. Kohgo, T. Ohtake, K. Ikuta, et al. // J. Gastroenterol.Hepatol.– 2008. – Vol. 23, Suppl. 1. – S78-81.
104. Mitochondria-targeted ubiquinone (MitoQ) decreases ethanol-dependent micro and macro hepatosteatosis [Text] / B.K. Chacko, A. Srivastava, M.S. Johnson, et al. // Hepatology. – 2011. – Vol. 54. – P. 153-163.
105. Zima, T. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease [Text] / T. Zima, M. Kalousova // Alcohol.Clin. Exp. Res. – 2005. – Vol. 29. – 110S-115S.
106. Chronic alcohol consumption accelerates liver injury in T cell-mediated hepatitis: alcohol dysregulation of NF-kappaB and STAT3 signaling pathways [Text] / B. Jaruga, F. Hong, W.H. Kim, et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest.Liver Physiol. – 2004. – Vol. 287. – G471-479.
107. An essential role for MCP-1 in alcoholic liver injury: Regulation of pro-inflammatory cytokines and hepatic steatosis [Text] / P. Mandrekar, A. Ambade, A. Lim, et al. // Hepatology. – 2017.– Open access.
108. 4-Hydroxynonenal as a selective profibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells [Text] / E. Zamara, E. Novo, F. Marra, et al. // J. Hepatol. – 2004. – Vol. 40. – P. 60-68.
109. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function [Text] / G. Svineng, C. Ravuri, O. Rikardsen, et al. // Connect.Tissue Res. – 2008. – Vol. 49. – P. 197-202.
110. Cohen, J.I. Pathogenesis of alcoholic liver disease: interactions between parenchymal and non-parenchymal cells [Text] / J.I. Cohen, L.E. Nagy // J. Dig.Dis. – 2011. – Vol. 12. – P. 3-9.
111. Rushmore, T.HB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity [Text] / T.H. Rushmore, M.R. Morton, C.B.Pickett // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266. – P. 11632-11639.

112. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements [Text] / K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, et al. // *Biochem.Biophys. Res. Commun.* – 1997. – Vol. 236. – P. 313-322.
113. Generation of superoxide from reaction of 3H-1,2-dithiole-3-thione with thiols: implications for dithiolethione chemoprotection [Text] / Z. Jia, H. Zhu, M.A. Trush, et al. // *Mol. Cell.Biochem.*– 2008. – Vol. 307. – P. 185-191.
114. Maher, J. The rise of antioxidant signaling – the evolution and hormetic actions of Nrf2 [Text] / J. Maher, M. Yamamoto // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 244. – P. 4-15.
115. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress [Text] / H. Zhu, Z. Jia, B.R. Misra, et al. // *Cardiovasc.Toxicol.*– 2008. – Vol. 8. – P. 71-85.
116. Yeligar, S.M. Ethanol-induced HO-1 and NQO1 are differentially regulated by HIF-1alpha and Nrf2 to attenuate inflammatory cytokine expression [Text] / S.M. Yeligar, K. Machida, V.K.Kalra // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 35359-35373.
117. Gong, P. Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1 [Text] / P. Gong, A.I. Cederbaum // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 43. – P. 144-153.
118. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease [Text] / A. Tannapfel, H. Denk, H.P. Dienes, et al. // *Virchows Arch.*– 2011. – Vol.458. – P. 511-523 DOI: 10.1007/ s00428-011-1066-1
119. Yip, W.W. Alcoholic liver disease [Text] / W.W. Yip, A.D. Burt // *Semin.Diagn.Pathol.*– 2006. – Vol.23. – P. 149-160
120. Crawford, J.M. Histologic findings in alcoholic liver disease [Text] / J.M. Crawford // *Clin.Liver Dis.*– 2012. – Vol.16. – P. 699-716 DOI: 10.1016/j.cld.2012.08.004

121. Sachuja, P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? [Text] / P. Sakhuja // World J. Gastroenterol.– 2014. – Vol. 20, No. 44. – P. 16474-16479.
122. Feldstein, A.E. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis [Text] / A.E. Feldstein, G.J.Gores //Front Biosci.– 2005. – Vol.10. – P. 3093-3099.
123. Denk, H. Mallory bodies revisited [Text] / H. Denk, C. Stumptner, K. Zatloukal //J. Hepatol.– 2000. – Vol.32. – P. 689-702.
124. Lefkowitz, J.H. Morphology of alcoholic liver disease [Text] / J.H. Lefkowitz //Clin.Liver Dis.– 2005. – Vol.9. – P. 37-53.
125. Yeh, M.M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease [Text] / M.M. Yeh, E.M. Brunt // Am. J. Clin.Pathol.– 2007. – Vol.128. – P. 837-847.
126. Tiniakos, D.G. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients [Text] / D.G. Tiniakos //Gastroenterol.Clin.Biol.– 2009. – Vol.33. – P. 930-939. DOI: 10.1016/j.gcb.2009.05.009]
127. Theise, N.D. Histopathology of alcoholic liver disease [Text] / N.D. Theise //Clin.Liver Dis.– 2013. – Vol.2. – P. 64-67. DOI: 10.1002/cld.172
128. Alcoholic hepatitis. Natural history and evaluation of prednisolone therapy [Text] / R.A. Helman, M.H. Temko, S.W. Nye,et al. // Ann. Intern.Med.– 1971. – Vol. 74. – P. 311-321.
129. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis [Text] / W.C. Maddrey, J.K. Boitnott, M.S. Bedine,et al. // Gastroenterology. – 1978. – Vol. 75. – P. 193-199.
130. Adrenocorticosteroid therapy in alcoholic hepatitis. A prospective, double-blind randomized study [Text] / B.L. Blitzler, M.G. Mutchnick, P.H. Joshi et al. // Am. J. Dig.Dis.– 1977. – Vol. 22. – P. 477-484.
131. Lesesne, H.R. Treatment of alcoholic hepatitis with encephalopathy. Comparison of prednisolone with caloric supplements [Text] / H.R. Lesesne, E.M. Bozymski, H.J. Fallon // Gastroenterology. – 1978. – Vol. 74. – P. 169-173.

132. A controlled trial of 6-methylprednisolone in acute alcoholic hepatitis. With a note on published results in encephalopathic patients [Text] / J.B. Shumaker, R.H. Resnick, J.T. Galambos et al. // *Am. J. Gastroenterol.*– 1978. – Vol. 69. – P. 443-449.

133. Double-blind controlled trial of prednisolone therapy in patients with severe acute alcoholic hepatitis and spontaneous encephalopathy [Text] / W. Depew, T. Boyer, M. Omata et al. // *Gastroenterology.*– 1980. – Vol. 78. – P. 524-529.

134. Teodossi, A. Controlled trial of methylprednisolone therapy in severe acute alcoholic hepatitis [Text] / A. Teodossi, A.L. Eddleston, R. Williams // *Gut.* – 1982. – Vol. 23. – P. 75-79.

135. Methylprednisolone therapy in patients with severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial [Text] / R.L. Carithers Jr., H.F. Herlong, A.M. Diehl et al. // *Ann. Intern.Med.*– 1989. – Vol. 110. – P. 685-690.

136. A randomized trial of prednisolone in patients with severe alcoholic hepatitis [Text] / M.J. Ramond, T. Poynard, B. Rue et al. // *N. Engl. J. Med.*– 1992. – Vol. 326. – P. 507-512.

137. Short- and long-term outcome of severe alcohol-induced hepatitis treated with steroids or enteral nutrition: a multicenter randomized trial [Text] / E. Cabre, P. Rodriguez-Iglesias, J. Caballeria et al. // *Hepatology.*– 2000. – Vol. 32. – P. 36-42.

138. Antioxidants versus corticosteroids in the treatment of severe alcoholic hepatitis – a randomised clinical trial [Text] / M. Phillips, H. Curtis, B. Portmann et al. // *J. Hepatol.*– 2006. – P. 44. – P. 784-790.

139. Prednisone therapy of acute alcoholic hepatitis. Report of a controlled trial [Text] / J.L. Campra, E.M. Hamlin Jr., R.J. Kirshbaum et al. // *Ann. Intern.Med.*– 1973. – Vol. 79. – P. 625-631.

140. Prednisolone or pentoxifylline for alcoholic hepatitis [Text] / M.R. Thursz, P. Richardson, M. Allison et al. // *N. Engl. J. Med.*– 2015. – Vol. 372. – P. 1619-1628.

141. Short-term and long-term survival in patients with alcoholic hepatitis treated with oxandrolone and prednisolone [Text] / C.L. Mendenhall, S. Anderson, P. Garcia-Pont et al. // N. Engl. J. Med.– 1984. – Vol. 311. – P. 1464-1470.
142. Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis: meta-analysis of individual patient data [Text] / P. Mathurin, J. O'Grady, R.L. Carithers et al. // Gut. – 2011. – Vol. 60. – P. 255-260.
143. Treatment of alcoholic liver disease [Text] / A. Barve, R. Khan, L. Marsano, et al. // Ann. Hepatol. – 2008. – Vol. 7, No. 1. – P. 5-15.
144. MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis [Text] / W. Dunn, L.H. Jamil, L.S. Brown et al. // Hepatology. – 2005. – Vol. 41. – P. 353-358.
145. A day-4 Lille model predicts response to corticosteroids and mortality in severe alcoholic hepatitis [Text] / M. Garcia-Saenz-de-Sicilia, C. Duvoor, J. Altamirano et al. // Am. J. Gastroenterol.– 2016. – Open Access.
146. Management practices of hepatitis C virus infected alcoholic hepatitis patients: A survey of physicians [Text] / A.K. Singal, H. Salameh, A. Singal et al. // World J. Gastrointest.Pharmacol.– 2013. – Vol. 4. – P. 16-22.
147. Ahn, J.M.T. Evaluation and management of alcoholic hepatitis: A survey of current practices [Text] / J.M.T. Ahn, S.M. Cohen // Hepatology.– 2009. – Vol. 612A.
148. Alcoholic hepatitis: current challenges and future directions [Text] / A.K. Singal, P.S. Kamath, G.J. Gores et al. // Clin.Gastroenterol.Hepatol.– 2014. – Vol. 12. – P. 555-564.
149. Sanyal, A.J. Gaps in knowledge and research priorities for alcoholic hepatitis [Text] / A.J. Sanyal, B. Gao, G. Szabo // Gastroenterology.– 2015. – Vol. 149. – P. 4-9.
150. Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research [Text] / B.K. Chacko, P.A. Kramer, S. Ravi et al. // Clin.Sci. (Lond.). – 2014. – Vol. 127. – P. 367-373.

151. Corticosteroids and pentoxifylline for the treatment of alcoholic hepatitis: current status [Text] / A.K. Singal, I. Walia, A. Singal et al. // World J. Hepatol.– 2011. – Vol. 3. – P. 205-210.
152. Impact of hepatitis C virus infection on the course and outcome of patients with acute alcoholic hepatitis [Text] / A.K. Singal, S. Sagi, Y.F. Kuo et al. // Eur. J. Gastroenterol.Hepatol.– 2011. – Vol. 23. – P. 204-209.
153. Punzalan, C.S. Alcoholic hepatitis and HCV interactions in the modulation of liver disease [Text] / C.S. Punzalan, T.N. Bukong, G. Szabo // J. Viral.Hepat.– 2015. – Vol. 22. – P. 769-776.
154. Shoreibah, M. Alcoholic hepatitis and concomitant hepatitis C virus infection [Text] / M. Shoreibah, B.S. Anand, A.K.Singal // World J. Gastroenterol.– 2014. – Vol. 20. – P. 11929-11934.
155. Infection in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids: early response to therapy is the key factor [Text] / A. Louvet, F. Wartel, H. Castel et al. // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 137. – P. 541-548.
156. Franchimont, D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies [Text] / D. Franchimont // Ann. N. Y. Acad. Sci.– 2004. – Vol. 1024. – P. 124-137.
157. Corticosteroids and occurrence of and mortality from infections in severe alcoholic hepatitis: a meta-analysis of randomized trials [Text] / B.S. Hmoud, K. Patel, R. Bataller et al. // Liver Int.– 2015. – Vol. 36. – P. 721-728.
158. In patients with severe alcoholic hepatitis, prednisolone increases susceptibility to infection and infection-related mortality, and is associated with high circulating levels of bacterial DNA [Text] / N. Vergis, S.R. Atkinson, S. Knapp et al. // Gastroenterology. – 2017. – Vol. 152. – P. 1068-1077 e4.
159. Reuter, B.K. Phosphodiesterase inhibitors prevent NSAID enteropathy independently of effects on TNF-alpha release [Text] / B.K. Reuter, J.L. Wallace // Am. J. Physiol.– 1999. – Vol. 277. – G847-G854.

160. McClain, C.J. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis [Text] / C.J. McClain, D.A. Cohen // *Hepatology*.– 1989. – Vol. 9. – P. 349-351.

161. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial [Text] / E. Akriviadis, R. Botla, W. Briggs et al. // *Gastroenterology*.– 2000. – Vol. 119. – P. 1637-1648.

162. Role of pentoxifylline in treatment of severe alcoholic hepatitis – a randomized controlled trial [Text] / H. Paladugu, P. Spinelli, L. Dalvi et al.// *J. Gastroenterol.Hepatol.*– 2006. – Vol. 21. – P. 1-10.

163. Pentoxifylline may prevent renal impairment (hepatorenal syndrome) in severe acute alcoholic hepatitis [Text] / J.G. McHutchison, R. Barrett, J.O. Draguesku et al. // *Hepatology*. – 1991. – Vol. 14. – 96A.

164. Sidhu, S. Pentoxifylline reduces disease severity and prevents renal impairment in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind placebo-controlled trial [Text] / S. Sidhu, K. Bhatia // *Hepatology*.– 2006. – Vol. 44. – 373A.

165. Pentoxifylline for treatment of patients with advanced cirrhosis. A randomized placebo controlled double blind trial [Text] / D. Leebrec, D.Fabut, F. Oberti et al. // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 46. – A249-A250.

166. Pentoxifylline for alcoholic hepatitis [Text] / K. Whitfield, A. Rambaldi, J. Wetterslev et al. // *Cochrane Database Syst. Rev.*– 2009. – CD007339.

167. Pentoxifylline versus prednisolone for severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled trial [Text] / B.K. De, S. Gangopadhyay, D. Dutta et al. // *World. J. Gastroenterol.*– 2009. – Vol. 15. – P. 1613-1619.

168. Pentoxifylline vs. corticosteroid to treat severe alcoholic hepatitis: a randomised, non-inferiority, open trial [Text] / S.H. Park, D.J. Kim, Y.S. Kim et al. // *J. Hepatol.*– 2014. – Vol. 61. – P. 792-798.

169. Early switch to pentoxifylline in patients with severe alcoholic hepatitis is inefficient in non-responders to corticosteroids [Text] / A. Louvet, E. Diaz, S. Dharancy et al. // *J. Hepatol.*– 2008. – Vol. 48. – P. 465-470.

170. Corticosteroid plus pentoxifylline is not better than corticosteroid alone for improving survival in severe alcoholic hepatitis (COPE trial) [Text] / S.S. Sidhu, O. Goyal, P. Singla et al. // Dig. Dis. Sci.– 2012. – Vol. 57. – P. 1664-1671.

171. Prednisolone with vs without pentoxifylline and survival of patients with severe alcoholic hepatitis: a randomized clinical trial [Text] / P. Mathurin, A. Louvet, A. Duhamel et al. // JAMA.– 2013. – Vol. 310. – P. 1033-1041.

172. Systematic review: pentoxifylline for the treatment of severe alcoholic hepatitis [Text] / R. Parker, M.J. Armstrong, C. Corbett et al. // Aliment.Pharmacol.– 2013. – Vol. 37. – P. 845-854.

173. Comparative effectiveness of pharmacological interventions for severe alcoholic hepatitis: a systematic review and network meta-analysis [Text] / S. Singh, M.H. Murad, A.K. Chandar et al. // Gastroenterology.– 2015. – Vol. 149. – P. 958-970 e12.

174. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat [Text] / Y. Iimuro, R.M. Gallucci, M.I. Luster et al. // Hepatology.– 1997. – Vol. 26. – P. 1530-1537.

175. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis [Text] / H. Tilg, R. Jalan, A. Kaser et al. // J. Hepatol.– 2003. – Vol. 38. – P. 419-425.

176. Infliximab monotherapy for severe alcoholic hepatitis and predictors of survival: an open label trial [Text] / P. Sharma, A. Kumar, B.C. Sharma et al. // J. Hepatol.– 2009. – Vol. 50. – P. 584-591.

177. A pilot study of the safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis [Text] / K.V. Menon, L. Stadheim, P.S. Kamath et al. // Am. J. Gastro- enteral.– 2004. – Vol. 99. – P. 255-260.

178. A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis [Text] / S. Naveau, S. Chollet-Martin, S. Dharancy et al. // Hepatology.– 2004. – Vol. 39. – P. 1390-1397.

179. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of etanercept in the treatment of alcoholic hepatitis [Text] / N.C. Boetticher, C.J. Peine, P. Kwo et al. // *Gastroenterology*.– 2008. – Vol. 135. – P. 1953-1960.
180. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy [Text] / P. Akerman, P. Cote, S.Q. Yang et al. // *Am. J. Physiol.*– 1992. – Vol. 263. – G579–G585.
181. Loguercio, C. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis [Text] / C. Loguercio, A. Federico // *Free Radic. Biol. Med.*– 2003. – Vol. 34. – P. 1-10.
182. A randomized trial of antioxidant therapy alone or with corticosteroids in acute alcoholic hepatitis [Text] / S. Stewart, M. Prince, M. Bassendine et al. // *J. Hepatol.*– 2007. – Vol. 47. – P. 277-283.
183. A randomized placebo-controlled trial of vitamin E for alcoholic hepatitis [Text] / E. Mezey, J.J. Potter, L. Rennie-Tankersley et al. // *J. Hepatol.*– 2004. – Vol. 40. – P. 40-46.
184. Glucocorticoids plus N-acetylcysteine in severe alcoholic hepatitis [Text] / E. Nguyen-Khac, T. Fevenot, M.A. Piquet et al. // *N. Engl. J. Med.*– 2011. – Vol. 365. – P. 1781-1789.
185. Shah, V.H. Managing alcoholic liver disease [Text] / V.H. Shah // *Clin. Mol. Hepatol.* – 2015. – Vol. 21. – P. 212-219.
186. S-Adenosylmethionine, cytokines, and alcoholic liver disease[Text] / C.J. McClain, D.B. Hill, Z. Song, et al. // *Alcohol*.– 2002. – Vol. 27, No. 3. – P. 185-192.
187. Song, Z. S-Adenosylmethionine protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice[Text] / Z. Song, C.J. McClain, T. Chen // *Pharmacology*. – 2004. – Vol. 71, No. 4. – P. 199-208.
188. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial[Text] / J.M. Mato, J. Camara, D.P. Fernandez, et al. // *J. Hepatol.*– 1999. – Vol. 30, No. 6. – P. 1081-1089.

189. Craig, S.A. Betaine in human nutrition[Text] / S.A. Craig // Am. J. Clin.Nutr.– 2004. – Vol. 80. – P. 539-549.
190. Hepatocyte proliferation as an indicator of outcome in acute alcoholic hepatitis [Text] / J.W. Fang, G.L. Bird, T. Nakamura et al. // Lancet.– 1994. – Vol. 343. – P. 820-823.
191. Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis [Text] / L. Dubuquoy, A. Louvet, G. Las-sailly et al. // Gut. – 2015. – Vol. 64. – P. 1949-1960.
192. Treatment of severe alcoholic hepatitis by infusion of insulin and glucagon: a multicenter sequential trial [Text] / J.C. Trinchet, B. Balkau, R.E. Poupon et al. // Hepatology. – 1992. – Vol. 15. – P. 76-81.
193. Insulin and glucagon infusion in acute alcoholic hepatitis: a prospective randomized controlled trial [Text] / G. Bird, J.Y. Lau, J. Koskinas et al. // Hepatol-ogy.– 1991. – Vol. 14. – P. 1097-1101.
194. Rambaldi, A. Anabolic-androgenic steroids for alcoholic liver disease: a Cochrane review [Text] / A. Rambaldi, G. Iaquinto, C. Gluud // Am. J. Gastroen-terol.– 2002. – Vol. 97. – P. 1674-1681.
195. Orrego, H. Propylthiouracil treatment for alcoholic hepatitis: the case of the missing thirty [Text] / H. Orrego, Y. Israel // Gastroenterology. – 1982. – Vol. 83. – P. 945-956.
196. Double-blind, controlled trial of propylthiouracil in patients with severe acute alcoholic hepatitis [Text] / P. Halle, P. Pare, E. Kaptein et al. // Gastroenter-ology.– 1982. – Vol. 82. – P. 925-931.
197. Granulocyte colony-stimulating factor in severe alcoholic hepatitis: a randomized pilot study [Text] / V. Singh, A.K. Sharma, R.L. Narasimhan et al. // Am. J. Gastroenterol.– 2014. – Vol. 109. – P. 1417-1423.
198. Combination of granulocyte colony-stimulating factor and erythropoiet-in improves outcomes of patients with decompensated cirrhosis [Text] / C.K.

Kedarisetty, L. Anand, A. Bhardwaj et al. //Gastroenterology.– 2015. – Vol. 148. – P. 1362-1370 e7.

199. Cederbaum, A.I. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury [Text] / A.I. Cederbaum // World J. Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16 (11). – P. 1366–1376.

200. Lieber, C.S. S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders [Text] / C.S. Lieber // Am. J. Clin. Nutr. – 2002. – Vol. 76 (5). – P. 1183S–1187S.

201. Drug-induced liver injury in hospitalized patients with notably elevated alanine aminotransferase [Text] / N.-M. Xu, Y. Chen, J. Xu, Q. Zhu // World J. Gastroenterol. – 2012. – Vol. 18 (41). – P. 5972–5978.

202. Иванян, А.Н. Беременность и заболевания печени [Текст] / А.Н. Иванян, Р.Р. Абузяров, Е.Н. Абузяров. – Смоленск, 2003.

203. Кузьмин, В.Н. Варианты клинического течения, диагностика и лечебная тактика острого жирового гепатоза беременных [Текст] / В.Н. Кузьмин, Л.В. Адамян // Акушерство и гинекология. – 2009. – № 1. – С. 25-29.

204. Гуськова, Т.А. Токсикология лекарственных средств [Текст] / Т.А. Гуськова. – Москва, 2008. – 196 с.

205. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств [Текст] / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская, О.Л. Верстакова и др. / Руководство по доклиническому изучению лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и Ко, 2012. – С. 13-51.

206. Лабораторные животные. Разведение, содержание и использование [Текст] / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. Изд. 3, перераб. и доп. – Киев: «Вища школа», 1983. – 383 с.

207. Staples, R.E. Detection of visceral alterations in mammalian fetuses [Text] / R.E. Staples // Teratology. – 1974. – Vol. 9. – P. 37.

208. Pien Tze Huang Gan Bao attenuates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in rats, associated with suppression of p53 activation and ox-

oxidative stress [Text] / J. Zhao, Y. Zhang, Y. Wan, H. Hu, Z. Hong // Mol. Med. Rep. – 2017. – Vol. 16, Issue 3. – P. 2611-2619.

209. Chakraborty, J. Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis [Text] / J. Chakraborty, F. Oakley, M. Walsh // Int. J. Hepatol. – 2012. – Vol. 64. – P. 915.

210. Reitman, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases [Text] / S. Reitman, S. Frankel // Amer. J. Clin. Path. – 1957. – Vol. 28. – P. 56.

211. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник[Текст] /В.В. Меньшиков. –М.:Медицина, 1987. – 368 с.

212. Bessey, O.A. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum [Text] / O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J. Brock // J.Biol.Chem. -1946. – Vol. 164. – P. 321.

213. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты [Текст] / Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. – 1998. – №7. – С. 43-51.

214. Сергиенко, В.И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева, Е.И. Маевский / Руководство по доклиническому изучению лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и Ко, 2012. – С. 889-994.

215. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц. – М.: «Практика», 1999. – 467 с.

216. Red, J.C.Bcl-2andtheregulationofprogramedcell death [Text] / J.C. Red // J. Cel.Biol. – 1994. – Vol. 124. – P. 1-6.

217. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus [Text] / J. Husnan, M.I. Yusof, T.D. Damitri et al. // Singapore Med. J. – 2010. – Vol. 51, No. 1. – P. 50-55.

218.Москвичев, Е.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика вилочковой железы при экспериментальном канцерогенезе в

условиях вторичной иммунной недостаточности: дис. ... д-ра.мед. наук: 03.03.04 / Евгений Васильевич Москвичев. – Оренбург, 2013. – 340 с.

219. Role of Ki-67 as a proliferative marker in lesions of thyroid [Text] / M. Pujani, B. Arora, M. Pujani et al. // Indian J. Cancer. – 2010. – Vol. 47, No. 3. – P. 304-307.

220. Cellcycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 [Text] / J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, et al. // J. Immunol.– 1984. – Vol. 133. – P. 1710-1715.

221. Gucciardi, M.E. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury [Text] / M.E. Guicciardi, G.J. Gores // Gut. – 2005. – Vol. 54, No. 7. – P. 1-12.

222. Oroxylin A accelerates liver regeneration in CCl4-induced liver injury in mice [Text] / R. Zhu, G. Zeng, Y. Chen et al. // PLoS. – 2013. – Vol. 8, No. 8. – e71612.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АА	Ацетальдегид
ААД	Ацетальдегиддегидрогеназа
АБП	алкогольная болезни печени
АлД	Алкогольдегидрогеназа
АЛТ	аланиновая аминотрансфераза
АСТ	аспарагиновая аминотрансфераза
АОА	антиокислительная активность
ГГТП	гамма-глутамилтранспептидаза
ОАП	острое алкогольное поражение
ИГХ	Иммуногистохимия
ИЛ-10	интерлейкин-10 (IL-10)
ИФА	иммуноферментный анализ
К	Каталаза
ПОЛ	перекисное окисление липидов
СОД	Супероксиддисмутаза
ФНО-альфа	фактор некроза опухолей альфа (TNF-а)
ФРГ	фактор роста гепатоцитов (HGF)
ЩФ	щелочная фосфатаза