

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.36-002.001+616.36-018/615.015

© Коллектив авторов

ТОРМОЖЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО ГЕПАТО-ПРОТЕКТОРНОГО ПРЕПАРАТА «ФОСФОЛИВ» РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА У КРЫС.

**О.М.ИПАТОВА, Т.И.ТОРХОВСКАЯ, В.А.КНЯЖЕВ, И.И.КАРУЗИНА,
Г.И.БАЧМАНОВА, М.К.ГУСЕВА, А.И.АРЧАКОВ.**

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская, 10;
факс: (095) 245-08-57.

Исследовали защитное действие нового фосфолипидного препарата «Фосфолив» на модели экспериментального хронического гепатита. В течение 45 дней животным вводили внутривенно CCl_4 на фоне внутривенного введения или Фосфолива, или - для сравнения - другого известного фосфолипидного гепатопротектора Эссенциале. После окончания эксперимента оценивали морфологические изменения печени, а также интенсивность биосинтеза белка и РНК - по включению, соответственно, C^{14} - лейцина и C^{14} -оротовой кислоты в субклеточные фракции гепатоцитов. Оба фосфолипидных препарата тормозили развитие дистрофических изменений печени, причем эффект Фосфолива был более выражен. Оба препарата препятствовали вызванному CCl_4 ингибированию включения метки в белки субклеточных фракций, но при этом только Фосфолив способствовал сохранению на уровне нормы включения радиоактивности в белки цитозоля и в РНК гепатоцитов. Полученные результаты, подтверждают определенный защитный эффект Эссенциале, свидетельствуют о более выраженном гепатопротекторном действии нового препарата Фосфолив (включающего полиненасыщенный фосфатидилхолин и соль глицирризиновой кислоты), а также о потенциальной возможности его использования для лечения хронических гепатитов.

Ключевые слова: фосфолипиды, глицирризиновая кислота, хронический гепатит, биосинтез РНК, биосинтез белка, морфология печени.

ВВЕДЕНИЕ. Гепатопротекторная терапия по-прежнему остается одним из актуальных направлений медицины. Используемый гепатопротекторный препарат Эссенциале [1], на основе фосфатидилхолина соевых бобов, хоть и обладающий эффективностью при печеночных патологиях [1,2], все же не может полностью решить эту проблему - как из-за высокой стоимости препарата, так и из-за отдельных, хотя и немногочисленных, сообщений о его негативном действии [3].

В Институте Биомедхимии РАМН разработан новый гепатопротекторный препарат с тем же основным действующим веществом, но использующий для его солбоилизации другой детергент - соль глицирризиновой кислоты, гликозида из корня солодки [4]. Целью данной работы было исследование действия Фосфолива на модели хронического гепатита у крыс, развивающегося при длительном введении четыреххлористого углерода (CCl_4). Именно на этой модели было показано в свое

время защитное действие Эссенциале от морфологических повреждений ткани печени [5] и изменений мембран гепатоцитов [6]. В настоящей работе также исследовалось влияние Фосфолива - в сравнении с Эссенциале - на формирование индуцированных CCl_4 морфологических повреждений, а также на процессы биосинтеза белка и РНК, затрагиваемые при развитии хронического гепатита в результате повреждения печеночных клеток [7].

МЕТОДИКА. Использовались белые беспородные крысы-самцы весом 100-150 г. Одну группу (6 животных) использовали в качестве контроля. Крысам других трех групп (по 4-6 в каждой) вводили два раза в неделю внутривенно CCl_4 в виде 50%-ного раствора в оливковом масле в дозе 0,1 мл на 100 г веса тела в течение 45 дней. К этому сроку у крыс развиваются выраженные дистрофические изменения печени, свойственные гепатиту, с элементами цирроза [7] - группа 2.

Животным двух групп через сутки после первого введения CCl_4 начинали, на фоне его продолжения, вводить внутривенно через зонд один из сравниваемых фосфолипидных препаратов - Фосфолив (группа 3) или Эссенциале (группа 4) в течение всего срока эксперимента (45 дней). Препараты вводили в количестве 20 мг/100 г три раза в неделю. Фосфолив приготавливали из фосфатидилхолина сои в виде водной эмульсии с концентрацией 50 мг/мл [4]. Эссенциале («Босналиск», Югославия, ФРГ) использовали в виде препарата в ампулах для внутривенных инъекций. Для исследования синтеза РНК и белка крысам внутривенно вводили в дозе 50 мкКи/100 г массы тела C^{14} -лейцин - (80 мкКи/ммоль, Чехия) и C^{14} -оротовую кислоту (40 мкКи/ммоль, Венгрия) - за час и за 10 минут до декапитации, соответственно.

Печень сразу же после взятия замораживали в жидком азоте и хранили при $-70^{\circ}C$. Печень гомогенизировали, фракции цитозоля, ядер и митохондрий получали методом дифференциального центрифугирования и определяли в них количество РНК и белка [8]. Радиоактивность анализировали при помощи жидкостного сцинтилляционного радиометра «Rack-beta» при эффективности счета по углероду 80%.

Оценку морфологических изменений ткани печени проводили гистохимически с использованием традиционных методов фиксации материала и окраски срезов [9]. При этом оценивали - по 4-балльной системе - суммарные дистрофические изменения, а также в отдельности интенсивность некроза, макрофагальную и фибробластическую реакции.

Количество гепатоцитов в состоянии митоза и двуядерных клеток рассчитывали - в процентах - на 500 клеток.

Статистический анализ проводили с использованием критерия t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. По окончании эксперимента оценивали степень развития хронического гепатита путем выяснения наиболее активных признаков репаративного процесса [10] - изменений в синтезе белка и РНК. Для этого определяли включение меченных предшественников в субклеточные фракции клеток печени (таблицы 1 и 2). В таблице 1 приведены данные по включению C^{14} -лейцина в белки субклеточных фракций клеток печени.

Из таблицы 1 видно, что в результате длительного введения CCl_4 содержание новосинтезированных белков (т.е. включение C^{14} -лейцина) снижается (2 группа) во всех исследованных субфракциях клеток печени более чем в 3 раза по сравнению с контрольными животными. Введение Фосфолива (3 группа) полностью восстанавливает включение метки в белки цитозоля и митохондрий, а также увеличивает в 3 раза ее включение в ядра, почти возвращая эту величину до исходного уровня.

В отношении Эссенциале имеются данные о его стимулирующем действии на включение C^{14} -лейцина в культуру клеток гепатоцитов [11]. В наших экспериментах, в условиях *in vivo*, Эссенциале также восстанавливал включение метки в белки ядер и митохондрий, но оказался менее эффективным, чем Фосфолив, в отношении цитозольной фракции. Включение радиоактивности в эту фракцию -

хоть и возросло по сравнению с нелечеными животными - однако все же осталось на 20% ниже, чем в группе интактных животных. В свете преобладающего вклада цитозольной фракции (>80%) в общую белок-синтезирующую активность гепатоцитов, ее неполное восстановление в присутствии Эссенциале является существенным для клетки в целом. Оно свидетельствует о том, что, несмотря на определенный защитный эффект, некоторая часть клеток печени - в отличие от группы Фосфолива - все же осталась поврежденной.

Таблица 1. Включение C^{14} -лейцина в белки субклеточных фракций клеток печени крыс после лечения Фосфолином и Эссенциале на фоне одновременного введения CCl_4 .

| Группы животных | Радиоактивность, имп./мин.,мг РНК | | |
|-------------------------|--|---|---|
| | Цитозоль | Ядра | Митохондрии |
| 1. Контроль | 72320 \pm 1750 | 12170 \pm 550 | 2830 \pm 260 |
| 2. Получившие CCl_4 | 20300 \pm 1740 $p_1 < 0.01$ | 3000 \pm 350 $p_1 < 0.01$ | 1020 \pm 140 $p_1 < 0.01$ |
| 3. CCl_4 + Фосфолив | 69470 \pm 4740 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.01$ | 9340 \pm 170 $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$ | 3070 \pm 190 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.01$ |
| 4. CCl_4 + Эссенциале | 59280 \pm 3850 $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ | 11780 \pm 1200 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.01$ | 3070 \pm 390 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.01$ |

Крысам вводили внутривенно CCl_4 (0.1 мл 50% раствора/100г веса) 45 дней 2 раза в неделю. Параллельно вводили Фосфолив или Эссенциале - по 20 мг/100 г 3 раза в неделю. За 10 мин. до декапитации вводили C^{14} -лейцин, печень гомогенизировали и выделяли субклеточные фракции дифференциальным центрифугированием. Определяли количество C^{14} -лейцина в аликвотах гомогенатов и фракций цитозоля, ядер и митохондрий.

Таблица 2. Включение C^{14} -оротовой кислоты в белки субклеточных фракций клеток печени крыс после лечения Фосфолином и Эссенциале на фоне одновременного введения CCl_4 .

| Группы животных | Радиоактивность, имп./мин.,мг РНК | | |
|----------------------|--|--|---|
| | Цитозоль | Ядра | Митохондрии |
| Контроль | 63650 \pm 3060 | 40180 \pm 4700 | 4830 \pm 510 |
| Получившие CCl_4 | 32150 \pm 4140 $p_1 < 0.01$ | 47110 \pm 4970 $p_1 < 0.1$ | 3820 \pm 570 $p_1 < 0.1$ |
| CCl_4 + Фосфолив | 60470 \pm 4740 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.01$ | 33750 \pm 4380 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.1$ | 6030 \pm 1000 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.1$ |
| CCl_4 + Эссенциале | 100060 \pm 11800 $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ | 40190 \pm 3110 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.1$ | 3190 \pm 210 $p_1 < 0.1$ $p_2 < 0.01$ |

Введение CCl_4 и фосфолипидных препаратов и выделение субклеточных фракций проводили как указано в подписи к табл.1. C^{14} -оротовую кислоту вводили за час до декапитации и определяли ее содержание в аликвотах выделенных субклеточных фракций.

Более мощное протекторное действие Фосфолива по сравнению с Эссенциале проявилось и при анализе включения радиоактивности в РНК (таблица 2). Содержание C^{14} -оротовой кислоты в РНК оказалось сниженным в цитозоле гепатоцитов крыс, получавших CCl_4 в 2 раза по сравнению с контрольной группой. В ядрах снижения не наблюдалось, что, повидимому, можно объяснить либо нарушением транспорта вновь синтезированной РНК из ядра в цитоплазму под влиянием длительного отравления, либо ускорением распада РНК в цитоплазме. Синтез митохондриальной РНК тоже не изменяется в этих условиях.

Протекторное введение Фосфолива полностью снимает действие СС14 на синтез РНК в цитозоле - включение метки не отличается от такового у контрольных животных. В группе же, получавшей Эссенциале, наблюдался более сложный эффект: повышение включения метки в РНК цитозоля оказалось настолько резким, что - в отличие от Фосфолива, вернувшего этот показатель к норме, - оно даже превысило контрольный уровень на 60%. Это может свидетельствовать о продолжающихся активных процессах регенерации ткани печени [12], как бы пытающихся «противостоять» действию токсина, в то время как в случае Фосфолива нормализация этого параметра - как и синтеза белка - указывает на завершение большей части регенеративных процессов, т.е. на то, что клетка в основном «справляется» с интоксикацией.

Это подтверждается данными гистологических исследований, результаты которых - в баллах - суммированы в таблице 3.

Таблица 3. Оценка морфологических признаков состояния ткани печени крыс после интоксикации СС14 и лечения Фосфоливом и Эссенциале (в баллах: 0-4)

| Группы животных | Дистрофические изменения | Интенсивность некроза | Фиброз | Фибробластическая реакция | Ложные дольки | Воспалительная реакция |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------|---------------------------|---------------|------------------------|
| 1. Контроль | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. Получившие СС14 | 2,3 | 0,3 | 2,3 | 2,3 | 3,0 | 2,3 |
| 3. СС14 + Фосфолив | 1,3 | 0 | 1,3 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 4. СС14 + Эссенциале | 2,3 | 0 | 2,3 | 1,7 | 2,3 | 2,0 |

Условия введения СС14 и фосфолипидных препаратов приведены как указано в и в разделе (Методика). Получение и окраску срезов ткани проводили традиционными методами [7]; изменение морфологических признаков для каждого образца оценивали визуально по балльной системе: от 0 до 4 баллов - в зависимости от степени выраженности. Приведены средние баллы для каждой группы животных.

В группе животных, получавших СС14, отмечали созревание соединительной ткани, развившейся по мере замещения очагов некроза. Наблюдалось интенсивное фиброзообразование (2.3 балла) и формирование цирротических изменений ткани, включая образование «ложных долек» и воспалительных изменений (3.0 и 2.3 балла соответственно) - на фоне общих дистрофических изменений (2.3 балла).

В группе же, получавшей Фосфолив, дистрофические изменения снижены по сравнению с нелечеными животными - до 1.3 балла. Ослаблено также развитие соединительной ткани и цирротическая перестройка ткани печени, развитие фиброза (1.3), образование ложных долек (1.0) и воспалительная реакция (1.0), что свидетельствует о гепатопротекторном и антицирротическом действии Фосфолива. У животных, получавших Эссенциале, дистрофические изменения оказались на том же уровне, что у нелеченных животных; фибробластическая реакция и развитие соединительной ткани также почти не изменились.

Таким образом, Фосфолив - в отличие от Эссенциале - способен защищать ткань печени от дистрофических изменений и некроза, тем самым препятствуя прогрессированию хронического гепатита при длительном токсическом воздействии.

В ходе эксперимента оценивались также и изменения скорости нарастания массы тела у всех четырех групп животных (рис.1). У крыс с развивающимся под влиянием СС14 гепатитом масса тела в первые дни оказалась сниженной; она начала медленно возрастать выше исходного уровня только с 15-ого дня эксперимента - в отличие от постоянного равномерного прироста в контрольной группе. Оба фосфолипидных препарата, несмотря на их нормализующее - особенно для Фосфолива - действие на морфологические и биосинтетические процессы в печени, не привели, вопреки ожиданию, к приросту скорости увеличения массы тела:

она начала возрастать в обеих леченных группах только после 20 дня введения. По всей вероятности, это объясняется экстремальными условиями борьбы организма с продолжающейся интоксикацией, когда значительная часть потребляемых калорий расходуется на регенеративные процессы в печени, которые - как показано выше - оказываются более эффективными у животных, получавших Фосфолив.

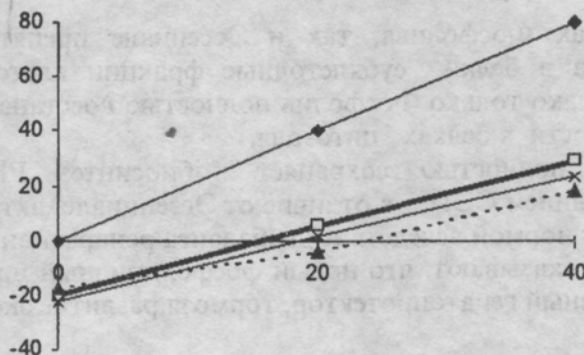


Рисунок.

Динамика увеличения массы тела животных после интоксикации СС14 и лечения Фосфолитом и Эссенциалем. 1 - контрольная группа (интактные животные), 2 - крысы, подвергавшиеся интоксикации СС14; 3 - крысы, получавшие Фосфолив на фоне СС14; 4 - крысы, получавшие Эссенциалем на фоне СС14. По оси абсцисс - дни эксперимента, по оси ординат - изменение массы тела, в %.

Таким образом, проведенные на модели гепатита крыс исследования показали, что новый отечественный препарат Фосфолив, разработанный в Институте биомедицины РАМН, обладает эффективным гепатозащитным действием в условиях хронического гепатита с элементами цирроза печени, вызванного длительной интоксикацией. Механизм действия Фосфолива связан с включением в мембраны гепатоцитов полиненасыщенного фосфатидилхолина, оказывающего репарирующее влияние на свойства поврежденных биомембран [13]. Первым препаратом, действующим по такому принципу, был Эссенциалем. В нем впервые был использован в лекарственных целях «строительный материал» биомембран - фосфолипиды, поэтому значение Эссенциале - как первого «мембранного лекарства», оказавшего также помощь многим больным [1,2] - неоспоримо. В то же время общая проблема лекарственных фосфолипидных препаратов - это поиск оптимальных способов солубилизации водонерастворимых фосфолипидов. Многочисленные данные о положительном эффекте полиненасыщенных фосфолипидов позволяют со всей определенностью утверждать, что отмечаемые некоторыми авторами негативные результаты действия Эссенциале [3] обусловлены не самим фосфолипидом, а именно способом (или веществом), примененным - уже несколько десятилетий назад - для его солубилизации. Именно это и побуждает исследователей продолжать поиск возможных новых, улучшенных способов - результатом чего и явился, в частности, представленный в настоящей работе препарат «Фосфолив», содержащий глицирризиновую кислоту. Наряду с солубилизирующим и противовоспалительным действием, глицирризиновая кислота также способствует более интенсивной доставке фосфатидилхолина в печень - вследствие обнаруженного Н. Tsui с соавт. [14] ее высокого сродства именно к печени, обусловленного возможным наличием афинных мест. Проведенное в настоящей работе сравнение с Эссенциалем продемонстрировало более активное действие Фосфолива, что свидетельствует о результативности его применения для лечения печеночных патологий. Препарат разрешен Государственным Фармаколо-

гическим комитетом к проведению клинических испытаний (протокол №11 от 4.07.96), результаты которых будут представлены в дальнейших публикациях.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют: 1). Введение крысам фосфолипидного препарата Фосфолив - на фоне одновременного длительного отравления СС14 - препятствует развитию морфологических дистрофических изменений ткани печени, причем эффект выражен в большей степени, чем при введении Эссенциале.

2). Введение как Фосфолива, так и Эссециале препятствует снижению включения S^{14} -лейцина в белки субклеточные фракции клеток печени крыс, отравляемых СС14, однако только Фосфолив полностью восстанавливает исходные значения радиоактивности в белках цитозоля.

3). Фосфолив полностью сохраняет биосинтез РНК гепатоцитов, ингибируемый под влиянием СС14, - в отличие от Эссенциале, активирующего его в 1.5 раза по сравнению с нормой вследствие дисбаланса репаративных процессов.

4). Результаты показывают, что новый фосфолипидный препарат Фосфолив действует как эффективный гепатопротектор, тормозя развитие экспериментального хронического гепатита.

Авторы выражают благодарность д.б.н. О.Ю.Абакумовой и д.б.н. А.В.Карякину за предоставление Отчета по специфической активности Фосфолива.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Gundermann K.-J.* (1993) The «Essential» Phospholipids as a Membrane Therapeutic. Szczecin, 20-21.
2. *Visco G.* (1985) Clin. Ther., 114, 183-188.
3. *Логинов А.С., Блок Ю.Е.,* (1987) Хронические гепатиты и циррозы печени. М., Медицина, 269.
4. *Арчаков А.И., Карякин А.В., Бачманова Г.И., Гамазина Е.В., Гусева М.К., Ипатова О.М., Княжев В.А., Воловик Е.Л., Gundermann K., Nimman R.* Композиция, обладающая гепатозащитным действием, и способ ее получения. Заявка № 96123311/14 (030201) от 16.12. 96.
5. *Theret C., Kobele G.H., Alliet J., Gourdiere D.* Med.Chir.Dig., 1977, 6, 69-74.
6. *Masuda M., Takino T., Kanazuna T., Horii Y., Kaibara H.* (1973) Fatty Liver: Experimental and Clinical Study, 12, 62-83.
7. *Vogi S., Peterman H., Dargel R.* (1996) Liver, 16 (5), 313-320.
8. *Подобед О.В., Пичугина Е.М., Кухаренко В.И., Дельвиц А.А.,* (1985) Мол. генетика, № 11, 38-42.
9. *Сергеева Н.А., Щеголев А.И., Явовлов С.П. Ануров М.В., Мишнев О.А.* (1992) Бюлл. эксп. биол. мед., № 2, 208-211.
10. *Jamaguchi K., Nalesnik M., Michaelopoulos M.,* (1996), Scand. J. Gastroenterol., 31, (9), 921-928.
11. *Kodama C., Mizoguchi Y., Yamamoto S., Morisawa S.,* (1988) Jap. J. Gastroenterol., 35, 2596-2600.
12. *Castro G.D., Diaz Gomez M.I., Castro J. A* (1989). Carcinogenesis, 10, 289-294.
13. *Salvioli G.* (1991) Z. Gastroenterol., (Suppl.2), 29, 30-33.
14. *Tsui H., Osaka S., Kiwada H.,* (1991) Chem.Pharm.Bull., 39, 1004-1009.

**HINDERING OF RAT CHRONIC HEPATITIS PROGRESSION
BY MEANS OF NEW HEPATOPROTECTIVE
PREPARATION «PHOSPHOLIV».**

O.I. IPATOVA, T.I. TORKHOVSKAYA, V.A. KNJAZHEV, I.I. KARUSINA,
G.I. BACHMANOVA, M.K. GUSEVA, A.I. ARCHAKOV.

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya str., 10,
Moscow, 119832,
fax: (095) 245-08-57

Protective influence of a new phospholipid preparation «Phospholiv» was studied using a model of chronic hepatitis. Animals were treated 45 days intraperitoneally with CC1₄ with parallel intragastral administration of Phospholiv or - (for comparison) - the of other phospholipid hepatoprotector, Essentiale. Morphologic changes of liver, as well as protein and RNA biosynthesis were evaluated in the end of experiment - by means of measuring C¹⁴-leucine and C¹⁴-orotic acid incorporation into hepatocyte subcellular fractions. Both phospholipid preparations attenuated dystrophic liver changes, Phospholiv effect being more pronounced. They both prevented CC1₄ induced inhibition of label incorporation into subcellular fraction proteins, but only Phospholiv, promoted the maintaining normal level of radioactivity incorporation into cytosol proteins and hepatocyte RNA. The results, confirming certain protective effect of Essentiale, show more pronounced hepatoprotective action of the new preparation Phospholiv (developed on the basis of polyunsaturated phosphatidylcholine and glycyrrhizinic acid salt). Data show also on possible fit hepatitis treatment.

Key words: phospholipids, glycyrrhizinic acid, chronic hepatitis, protein biosynthesis, RNA biosynthesis, liver morphology.