

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭССЕНЦИАЛЕ И НОВОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО ГЕПАТОПРОТЕКТОРА «ФОСФОЛИВ» НА МОДЕЛИ ОСТРОГО 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 лечебное действие разработанного в Институте биомедицинской химии нового препарата («Фосфолив») - состоящего из полиненасыщенного фосфатидилхолина и соли глицирризиновой кислоты - при остром гепатите у крыс, вызванном отравлением СС14. С использованием C^{14} -лейцина и C^{14} -оротовой кислоты показано восстановление нарушенного биосинтеза альбумина и суммарной клеточной РНК печени после трехдневного лечения Фосфоливом. Включение метки во фракцию полирибосом - сниженное под влиянием СС14 - также возрастало в результате лечения Фосфоливом, что может указывать на восстановление нарушенной белок-синтезирующей системы и целостности субклеточных структур гепатоцитов. При этом наблюдали значительное снижение морфологических повреждений ткани печени. Другой фосфолипидный препарат - известный гепатопротектор Эссенциале - также оказывал положительное воздействие, однако эффект Фосфолива на биохимические и морфологические характеристики печени превышал был в 1,5-2 раза выше.

Результаты указывают на эффективность лечения острого гепатита полиненасыщенными фосфолипидами, с максимальным эффектом в случае использования нового гепатопротектора Фосфолив.

Ключевые слова: фосфолипиды, глицирризиновая кислота, острый гепатит, биосинтез РНК, биосинтез альбумина, морфология печени.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема лечения больных гепатитами остается одной из актуальных проблем медицины вследствие высокой распространенности этих заболеваний. Применяющееся для этой цели комплексное лечение не всегда, к сожалению, приводит к желаемому результату. В этой связи остается актуальной задача поиска эффективных лекарственных средств, способных ускорить темпы функционального восстановления печени или защитить гепатоциты от повреждающего воздействия гепатотропных вирусов и других патогенов. Внимание практического здравоохранения привлекает в этом плане препарат Эссенциале - производимый в ФРГ лекарственный препарат, основу которого составляет фосфатидилхолин из соевых бобов. Мнения в отношении этого препарата противоречивы: несмотря на данные о положительном эффекте [1-3], имеются сообщения об его отсутствии [4] или даже аллергических реакциях [5]. К тому же он достаточно дорог, и в нашей стране давно назрела необходимость в собственном фосфолипидном гепатопротекторном препарате.

Недавно разработанный в Институте Биомедицинской химии РАМН новый препарат Фосфолив содержит полиненасыщенный фосфатидилхолин,

солгобилизованный детергентом растительного происхождения - солью глицирризиновой кислоты, известной также и своим положительным воздействием на ткань печени [6]. В настоящей работе исследовались гепатопротекторные свойства Фосфолива - в сравнении с Эссенциале - на модели острого гепатита у крыс, вызванного введением четыреххлористого углерода [7].

МЕТОДИКА. Использовали крыс-самцов линии Вистар, массой 160-180 г, содержащихся на стандартной диете, по 4 - 6 животных в каждой группе. Четыреххлористый углерод (CCl_4) вводили крысам внутрибрюшинно в 50% растворе вазелинового масла в дозе 0,1 мл/100 г веса. Контрольным животным вводили только вазелиновое масло. Через 24 часа начинали лечение фосфолипидными препаратами: одну группу Фосфоливом, другую - Эссенциале, а третью оставляли нелеченной. Препарат Фосфолива в виде суспензии готовили согласно описанию к патенту [8]. Концентрация фосфатидилхолина в препарате составляла 50 мг/мл. Эссенциале использовали в виде раствора той же концентрации в ампулах для внутривенных инъекций («Босналиек», Югославия, ФРГ). Препараты вводили внутривенно в течение 3 суток каждые 24 часа в дозе по 20 мг/100 г. Через 24 часа после последнего введения животных забивали, печень сразу же замораживали в жидком азоте и хранили при $-70^{\circ}C$.

Для исследования синтеза альбумина крысам вводили внутрибрюшинно C^{14} -лейцин (80 мкКи/ммоль, Чехия) в дозе 50 мкКи/100г массы тела. Синтез РНК оценивали по включению той же дозы C^{14} -оротовой кислоты (40 мкКи/ммоль, Венгрия); ее вводили за час, а C^{14} -лейцин - за 10 минут до декапитации.

Печень гомогенизировали, полирибосомы ($> 80 S$) выделяли центрифугированием, определяли радиоактивность в этой фракции и в альбумине [9,10].

Оценку морфологических изменений ткани печени проводили гистохимически с использованием традиционных методов фиксации материала и окраски срезов [11]. Оценивали интенсивность некроза, макрофагальную и фибробластическую реакции, а также суммарные дистрофические изменения в каждой из четырех групп животных, для чего использовали 4-х балльную количественную систему - по степени выраженности данного признака (плюс нулевой балл - его отсутствие). Количество гепатоцитов в состоянии митоза и двудерных клеток рассчитывали - в процентах - на 500 клеток. Статистический анализ проводили с использованием критерия t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Влияние сравниваемых фосфолипидных препаратов на состояние печени животных оценивали с помощью двух подходов - 1) анализ изменений белок-синтезирующей системы гепатоцитов по включению радиоактивных предшественников в альбумин сыворотки и во фракцию РНК гепатоцитов, и, 2) - исследование морфологических изменений ткани печени гистохимическими методами.

На рис. 1 приведены данные по удельной радиоактивности альбумина сыворотки крови четырех исследованных групп животных: 1-ая группа - контрольные животные, 2-ая - получившие однократную дозу CCl_4 , а 3-я и 4-ая группы - леченные после этого Фосфоливом или Эссенциале соответственно.

Повреждение четыреххлористым углеродом приводило к снижению скорости синтеза альбумина примерно в 1,5 раза (2-ая группа) по сравнению с контрольными животными, вследствие снижения его синтеза в печени - что наблюдали и ранее [12]. Введение же Фосфолива полностью восстанавливало синтез альбумина, что является одним из указаний на предотвращение деструктивных процессов, ингибирующих его синтез в печени. В противоположность этому, у животных, получавших Эссенциале, радиоактивность альбумина оказалась даже еще ниже, чем у нелеченных животных. Результаты отражают способность Фосфолива - в отличие от Эссенциале - нормализовать нарушения в белок-синтезирующей системе гепатоцитов.

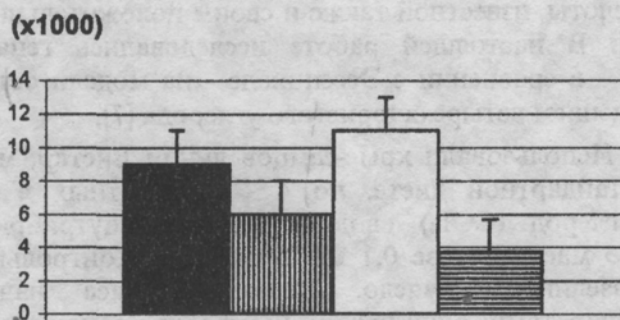


Рисунок 1.

Синтез альбумина в печени крыс с острым гепатитом, леченных Фосфоливом и Эссенциале. По оси ординат - включение ^{14}C -лейцина, имп/мин/мг белка. 1 - контрольные животные; 2, 3 и 4 - крысы, отравленные CCl_4 , в том числе: 3 - леченные Фосфоливом, 4 - леченные Эссенциале. Лечение Фосфоливом или Эссенциале проводили путем ежедневного введения по 20 мг/100г веса в течение 3-х дней. Через сутки после окончания лечения вводили ^{14}C -лейцин, после чего (через 10 минут) животных забивали, выделяли альбумин и определяли его радиоактивность.

Это проявилось и при исследовании синтеза РНК, измеренного по включению ^{14}C -оротовой кислоты (таблица 1). Как видно из таблицы, введение CCl_4 снижает включение метки в суммарную клеточную РНК (на 68%). Это может быть обусловлено как нарушением процесса транскрипции вследствие связывания метаболитов CCl_4 с ДНК [13], так и активацией нуклеаз [14]. Лечение обоими фосфолипидными препаратами увеличивало синтез суммарной РНК, хоть и не до исходного уровня: в обеих группах (3 и 4) он составляет в среднем 63% от контроля.

Однако дифференцированный анализ включения метки в субклеточные фракции (таблица 1) выявил различие между действием Фосфолива и Эссенциале. В норме 59% метки приходится на фракцию $> 80 \text{ S}$, т.е. полирибосомы, что отражает относительную долю новообразованной мРНК, связанной с транслирующими рибосомами. Отравление крыс CCl_4 , наряду с отмеченным выше ингибированием синтеза суммарной клеточной РНК, заметно тормозит также (до 40.6 %) и долю синтеза мРНК [15], приходящейся на полирибосомы. Одной из причин этого может быть дезагрегация этих структур до мономеров под действием CCl_4 [14]. В то же время в группе животных, леченных Фосфоливом, процент включения метки в полирибосомы остался почти на исходном уровне (до 56%), что может указывать на предотвращение их дезагрегации. У крыс же, получавших Эссенциале, такого лечебного эффекта не наблюдалось: процент включения метки в эту фракцию был равен таковому для нелеченных животных.

Таким образом, несмотря на то, что оба фосфолипидных препарата способны восстанавливать - хоть и не до исходного уровня - синтез суммарной клеточной РНК гепатоцитов (увеличивая его вдвое по сравнению с нелеченными животными), только Фосфолив устраняет повреждающее действие интоксикации на синтез мРНК в полирибосомах, и на способность печеночных клеток к синтезу альбумина. Эссенциале же, оказывая положительный эффект по одному параметру (увеличение синтеза суммарной РНК), не влияет, однако, на разобщение синтеза отдельных фракций РНК, а в отношении синтеза альбумина еще и усугубляет ингибирующий эффект CCl_4 .

Таблица 1. Синтез РНК в гепатоцитах крыс после интоксикации четыреххлористым углеродом и лечения Фосфоливом или Эссенциале (по включению C^{14} -оротовой кислоты)

Группы животных	Включение в суммарную клеточную РНК (имп./мин., мг РНК)	% включения в РНК полирибосом (от включения в суммарную РНК)
Контроль	19380 ± 580	$59,0 \pm 2,0$
Получившие CCl_4	6170 ± 580	$49,6 \pm 3,3$
CCl_4 + Фосфолив	12420 ± 410	$56,0 \pm 2,3$
CCl_4 + Эссенциале	11410 ± 1240	$44,0 \pm 2,1$

Введение CCl_4 и лечение фосфолипидными препаратами проводили как указано в подписи к рис.1 и в разделе Методика. За час до декапитации вводили C^{14} -оротовую кислоту; сразу же после забоя печень замораживали и хранили при $-70^\circ C$. Перед фракционированием печень подвергали гомогенизации и выделяли фракцию полирибосом ($> 80 S$) дифференциальным центрифугированием. Определяли радиоактивность в аликвотах гомогенатов и фракции полирибосом.

Преимущественное влияние Фосфолива проявилось и при гистологических исследованиях ткани печени. Как видно из таблицы 2, в ткани печени животных, отравленных CCl_4 , (группа 2) наблюдалась высокая степень дистрофических изменений - 3,3 балла (при максимуме - «4.0»). Это проявилось в возникновении очаговых некрозов ткани печени (2 балла), развитии на их месте грануляционной ткани (1,5 балла). Наблюдалось также и увеличение количества макрофагов - как реакция на токсическое повреждение печени - и усиление пролиферации фибробластов, приводящее обычно к фиброзу (т.е. макрофагальная и фибробластическая реакция, соответственно, 3,0 и 2,8 балла - вместо 1,3 и 0 в контрольной группе). Содержание функционально активных крупных гепатоцитов с повышенным количеством РНК и фосфолипидов (оцениваемым гистохимически) было снижено ~ в 2 раза по сравнению с контрольными животными (1,5 балла при с 3,7 и 3,0 в «контроле»).

Таблица 2. Оценка морфологических признаков состояния ткани печени крыс после интоксикации CCl_4 и лечения Фосфоливом и Эссенциале (в баллах: 0-4)

Группы животных	Дистроф. изменения.	Интенс. некроза	Развитие грануляц. ткани	Макрофагальн реакция	Фибробластическая реакция	Содержание	
						РНК	фосфолипидов
1. Контроль	1,3	0	0	1,3	0	3,7	3,0
2. Получившие CCl_4	3,3	2,0	1,5	3,0	2,8	1,5	1,5
3. CCl_4 + Фосфолив	1,7	0	0	2,3	1,0	3,3	3,0
4. CCl_4 + Эссенциале	3,3	1,0	0	2,7	2,0	2,0	1,7

Введение CCl_4 и лечение фосфолипидными препаратами проводили как указано в подписи к рис.1. Сразу же после забоя печень замораживали и хранили при -70° . Получение и окраску срезов ткани проводили традиционными методами [11]; изменение морфологических признаков для каждого образца оценивали визуально и выражали количественно по балльной системе: 0 баллов - отсутствие признака, и от 1 до 4 баллов - в зависимости от степени выраженности данного признака. Приведены средние баллы для каждой группы животных.

В противоположность этому, в группе животных, получавших Фосфолив, (группа 3) некротические и грануляционные изменения полностью исчезли (балльные оценки - «0»). Общее количество макрофагов в печени животных этой группы было ниже, чем у нелеченных животных (хотя и превышало данные для контрольной группы). Снижение пролиферации фибробластов (с 2,8 до 1,0 балла) свидетельствует о подавлении процессов фиброобразования в печени под

влиянием Фосфолива. Гистохимическое увеличение содержания РНК и фосфолипидов служит указанием на увеличение количества функционально активных крупных гепатоцитов - почти до исходного уровня. В целом, степень дистрофических изменений в печени животных этой группы оказалась вдвое ниже, чем у крыс, получивших только СС14, и составила 1,7 балла. В то же время у животных, получавших Эссенциале (4 группа), лечебный эффект хоть и наблюдался, но в значительно меньшей степени. У части животных встречались очаговые некрозы ткани (что привело к оценке «1,0» - вместо «0» в группе Фосфолива). Репаративные процессы - о чем можно судить по уровню РНК и фосфолипидов - также проявились слабее, чем после Фосфолива. Степень репаративных процессов в печени, обеспечивающих сопротивление ее токсическому поражению [16], еще более наглядно иллюстрируется по относительному количеству гепатоцитов в состоянии митоза и количеству двуядерных клеток (таблица 3).

Можно видеть, что и митотический индекс, и содержание двуядерных клеток, сниженные приблизительно вдвое под влиянием СС14, значительно возросли после лечения Фосфоливом. Эссенциале фактически не повлиял на митотический индекс - т.е. в целом оказал менее выраженное репарирующее действие на поврежденную печеночную ткань.

Таблица 3. Митотический индекс и содержание двуядерных клеток (в % к общему числу клеток) печени крыс после интоксикации СС14 и лечения Фосфоливом и Эссенциале.

Группы животных	Митотический индекс	Количество двуядерных клеток
1. Контроль	0,17 ± 0,08	8,30 ± 0,80
2. Получившие СС14	0,07 ± 0,05	4,75 ± 0,64
3. СС14 + Фосфолив	1,30 ± 0,40	6,80 ± 0,80
4. СС14 + Эссенциале	0,13 ± 0,04	7,07 ± 1,06

Введение СС14, лечение препаратами и обработку ткани печени проводили как указано в подписи к рис.1 и табл. 2. Количество клеток в состоянии митоза и двуядерных клеток определяли визуально с использованием микроскопа и рассчитывали в процентах, на 500 клеток.

Ранее в подобной модели - на крысах, отравленных СС14 - наблюдался положительный эффект Эссенциале, проявлявшийся в снижении сывороточных трансаминаз [17] или ингибировании некротизации печени и процессов перекисного окисления [18]. Более подробные исследования, проведенные нами в сравнении с новым препаратом Фосфолив, хоть и подтвердили положительное действие Эссенциале, показали в то же время более выраженную активность Фосфолива. Хотя оба препарата - благодаря репарирующему действию полиненасыщенного фосфатидилхолина на клеточные мембраны [19] - способствуют нормализации интоксигированной печени в условиях острого гепатита, все же Фосфолив гораздо в большей степени снижает дистрофические изменения, образование некрозов и фиброобразование, и усиливает репарационные процессы - что проявляется как в повышении доли функционально активных клеток, так и в активации синтеза РНК (в основном - мРНК) и сывороточного альбумина.

Следует отметить также, что такой подход, позволяющий оценить активность биосинтетических процессов - как основных функциональных маркеров состояния клеток печени, является информативным при работе с экспериментальными моделями гепатитов. Оценка включения радиоактивности в альбумин, в общую клеточную РНК и в РНК субклеточных фракций дает возможность охарактеризовать свойства поврежденных клеток печени и степень их регенерации.

Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности Фосфолива как гепатопротекторного средства при лечении острых гепатитов и о перспективности его возможного клинического использования.

ВЫВОДЫ. 1) Введение Фосфолива - нового фосфолипидного препарата, модифицированного аналога Эссенциале - крысам с моделью острого гепатита приводит к восстановлению нарушенной белок-синтезирующей системы гепатоцитов: увеличению включения метки в альбумин и в суммарную клеточную (в том числе и новообразованную) РНК.

2) В противоположность Фосфоливу, введение крысам с острым гепатитом Эссенциале активирует только синтез суммарной клеточной РНК, не влияя на синтез мРНК, и даже усугубляя индуцированное четыреххлористым углеродом ингибирование биосинтеза альбумина.

3) Лечение острого гепатита у крыс с помощью обоих фосфолипидных препаратов - Фосфолива и Эссенциале - уменьшает морфологические повреждения ткани печени, однако влияние Фосфолива оказалось в 1.5-2 раза более выраженным, особенно в отношении снижения интенсивности некроза, фиброобразования и суммарных дистрофических изменений.

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. Wallnofer H., Hanusch M., (1973) Med.Wschr., 27, 331-336.
2. Visco G., (1985) Clin.Ther., 114, 183-188.
3. Подымова С.Д. (1984) Болезни печени. М., Медицина, 433-447.
4. Логинов А.С., Блок Ю.Е., (1987) Хронические гепатиты и циррозы печени. М., Медицина, 269-281.
5. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Чередниченко Т.В. (1994) Вирусные гепатиты у детей. М, 304-318.
6. Arase Y., (1997) Cancer, 79 (8), 1494-1500.
7. Стречень С.Б., Кресюн В.И. (1992) Бюлл. эксп. биол. мед., № 7, 58-61.
8. Арчаков А.И., Карякин А.В., Бачманова Г.И., Гамазина Е.В., Гусева М.К., Ипатова О.М., Княжесв 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.
9. Lerman M.I., Abakumova O.Yu., Kutsenko N.G. et al. (1974) Cancer Res., 34, 1536-1541.
10. Подобед О.В., Пичугина Е.М., Кухаренко В.И., Дельвиг А.А., (1985) Мол. генетика, 11, 38-42.
11. Кисели Д., (1962) Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт, 69-219
12. Rotschild M.A., Oralz M., Schreiber S., Lane B., (1978) Gastroenterology, 75, 984-987.
13. Castro G.D., Diaz Gomez M.I., Castro J.A. (1989) Carcinogenesis, 10, 289-294.
14. Lutz R.W., Schries T.K., (1978) Toxicol. Appl. Pharmacol., 45, 653-663.
15. Jamaguchi K., Nalesnik M., Michaelopoulos M., (1996) Scand.J.Gastroenterol., 31(9), 921-928.
16. Скакун Н.П., Сливка Ю.И. (1992) Эксп. и клин. фармакол., 55 (3), 52-54.
17. Rauhen H.M., Schriewer H., Gebauer B., Abu Tair M. (1973) Drug.Res., 23, 1332-1334.

18. Венгеровский А.И., Чучалин В.С., Паулс О.В. (1987) Бюлл.эксп.биол.мед., 103, 430-432.
19. Bachmanova G.I., Abdugafarova M. A., Li V.S., Dobrynina O.V. (1989) In: «Phosphatidylcholine (polyene-phosphatidylcholine/PPC): Effects on Cell Membranes and Transport of Cholesterol», ed. by A.I.Archakov, K.-J.Gundermann, Bingen-Rhein, 137-146.

**COMPARATIVE STUDY OF EFFECTS OF ESSENTIALE AND NEW NATIVE
HEPATOPROTECTOR «PHOSPHOLIV» IN RAT ACUTE
HEPATITIS MODEL.**

O.I. IPATOVA, T.I. TORKHOVSKAYA, V.A. KNJAZEV, 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

Curative effect of new preparation «Phospholiv», elaborated in Institute of Biomedical Chemistry, in acute CCl_4 induced rat hepatitis model was studied. The preparation consists of polyunsaturated phosphatidylcholine and glycyrrhizinic acid salt. Recovery of damaged biosynthesis of albumin and total cell liver RNA - by incorporation of C^{14} -leucine and C^{14} -orotic acid - were observed after 3 days Phospholiv administration, that showed on reparation of damaged protein-synthesis system. Label incorporation into liver fraction $>80S$ - that was decreased under CCl_4 influence - was also restored after Phospholiv treatment, that may testify on its regenerative effect on wholeness of subcellular hepatocytes structures. Substantial decrease of morphologic damages of liver tissue was demonstrated as well. Other phospholipid preparation - known hepatoprotector Essentiale - gave some positive effects too, but Phospholiv influence on biochemical and morphological liver features were 1.5-2 fold as compared with that of Essentiale.

Results show on efficiency of polyunsaturated phospholipids in the treatment of acute hepatitis in rats - as a result of influence on hepatocytes cell membrane - and on preferential effect of new hepatoprotector Phospholiv.

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