

УДК 616.36-005.4:577.127.2

© Е.О.Данченко

МОДУЛЯЦИЯ ТАУРОУРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Е.О.ДАНЧЕНКО

Витебский государственный медицинский университет, 210602 Витебск, пр-кт
Фрунзе, 27; тел: (212) 372452, факс: (212)372107;
E-mail: scidep@vitmed.belpak.vitebsk.by

В работе изучено влияние препарата тауроурсодезоксихолевой кислоты на пролиферацию гепатоцитов после 180-минутной долевой ишемии печени. Показано, что ТУДХК в дозе 200 мг/кг не изменяла пролиферацию гепатоцитов при введении интактным животным и не обладала цитотоксическим эффектом. Предварительное введение ТУДХК ускоряло течение регенераторных процессов в печени в постишемическом периоде, возможно, за счет синхронизации вступления гепатоцитов в деление. Выявлен мембраностабилизирующий эффект ТУДХК, проявляющийся в снижении активности печеночных ферментов в сыворотке крови.

Ключевые слова: пролиферация, печень, ишемия, тауроурсодезоксихолевая кислота

ВВЕДЕНИЕ. Ишемия печени, обусловленная оперативными вмешательствами или являющаяся результатом окклюзии магистральных сосудов в результате атеросклероза или тромбоза, нарушает течение регенераторных процессов [1]. Предупреждение и коррекция ишемических и реперфузионных повреждений гепатоцитов остается одной из актуальных проблем практической медицины.

Известно, что желчные кислоты усиливают пролиферацию клеток кишечного тракта и печени [2-4], что может быть обусловлено прямым митогенным эффектом желчных кислот [2,5] или вторичной стимуляцией пролиферации в ответ на повреждение [6,7]. В последние годы для лечения заболеваний гепатобилиарной системы применяется препарат тауроурсодезоксихолевой кислоты (ТУДХК) [8,9]. До настоящего времени влияние ТУДХК на процессы репаративной регенерации печени изучено недостаточно

Целью настоящего исследования явилось изучение регенерации печени в разные сроки постишемического периода на фоне предварительного введения ТУДХК.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180 -200 г. В каждой группе было по 8 животных. Препарат ТУДХК, предоставленный фирмой "Dr. Falk Pharma GmbH" (Германия), вводили интрагастрально в дозе 200 мг/кг массы в течение 20 дней. Контрольные животные получали 1% раствор метилцеллюлозы. Ишемию осуществляли через 24 ч после последнего введения препарата путем окклюзии микрозажимом сосудистой ножки центральной и левой долей печени. Крыс декапитировали на 180-й минуте нормотермической ишемии до снятия зажима, через 12, 18, 24, 30, 36 ч, 48 ч, на 4, 10 и 20 сут реперфузионного периода. Ядра гепатоцитов получали методом дифференциального центрифугирования [10]. Интенсивность синтеза ДНК в ядрах гепатоцитов оценивали по включению [³H]тимидина, который вводили внутривентрально в дозе 40 мКи/крыса за 2 часа до декапитации. Для определения радиоактивности ДНК фракцию ядер осаждали 10% ТХУ на миллипоровые фильтры и подсчитывали количество импульсов за 1 мин. Удельную радиоактивность рассчитывали на 1 мг ДНК. Содержание ДНК в печени определяли по методу Blobel и Potter [11]. Активность АсАТ, АлАТ, ГГТ и содержание билирубина в сыворотке крови определяли с помощью стандартных наборов фирмы "Cormay DiAna". Результаты обработаны статистически с помощью электронной таблицы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведенные ранее исследования *in vitro* с использованием первичной культуры гепатоцитов показали, что ТУДХК в диапазоне доз 25-400 мкг/мл не влияет на пролиферацию гепатоцитов, однако предотвращает вызванное гликохенодезоксихолевой кислотой ингибирование пролиферации и обладает антиапоптозогенным и антинекрозогенным эффектами [10].

Предварительное 20-дневное введение ТУДХК интактным животным не изменяло скорости течения регенераторных процессов в печени крыс (рис. 1). Анализ этих и полученных ранее результатов *in vitro* свидетельствует о том, что, несмотря на изменение пула желчных кислот при введении ТУДХК [13], препарат не влияет на пролиферацию гепатоцитов в нормальной печени крыс, что подтверждает данные других исследований [14]. После введения ТУДХК интактным животным не отмечено биохимических признаков цитолиза гепатоцитов: активность АлАТ, АсАТ, ГГТ и содержание билирубина не изменялись по сравнению с интактными животными (рис. 2).

После 180-минутной ишемии на фоне введения ТУДХК в первые двое суток репаративной регенерации отмечалось достоверное (в 1,2-1,3 раза) увеличение включения [³H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов ишемизированной доли печени с пиком на 36 часов реперфузионного периода по сравнению с крысами, получавшими метилцеллюлозу (рис. 1). Этот эффект может быть связан с большей синхронизацией вступления гепатоцитов подопытных крыс в деление. Удельная радиоактивность ДНК ядер гепатоцитов у крыс, получавших ТУДХК, снижалась к концу 2-х суток и к 4-м суткам реперфузии не отличалась от интактных животных. Процесс репаративной регенерации печени крыс, получавших метилцеллюлозу, пролонгирован до 10-х суток реперфузионного периода. Таким образом, ТУДХК усиливает пролиферацию гепатоцитов только в условиях стимуляции регенераторных процессов, что напоминает действие

некоторых ростовых факторов, способных повышать пролиферацию только *in vivo*, когда она уже инициирована [15].

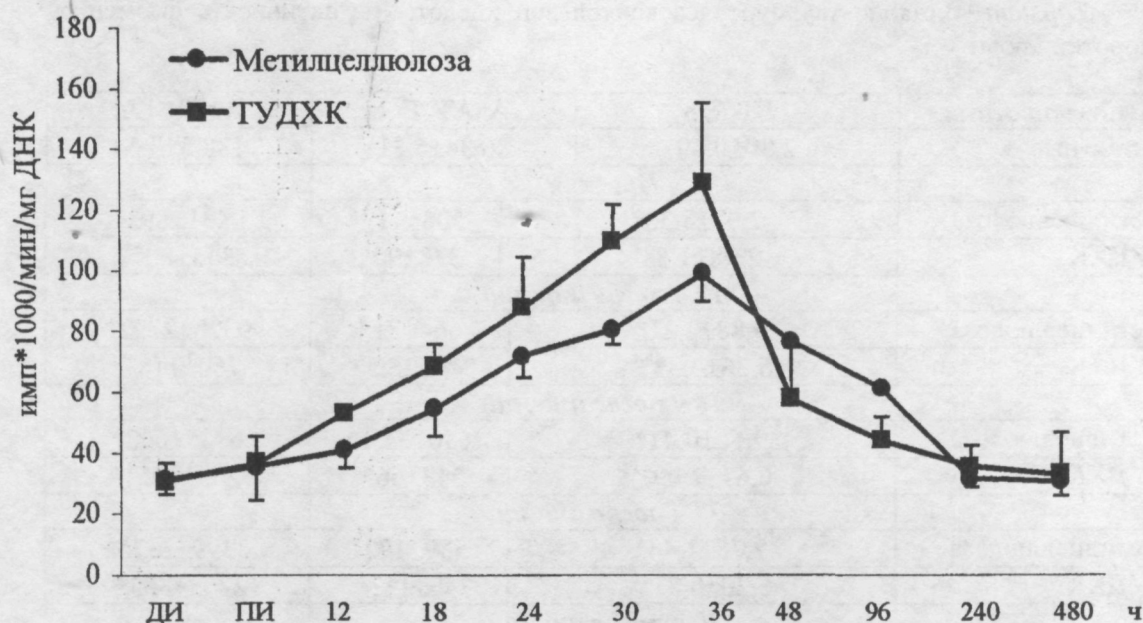


Рисунок 1

Влияние тауроурсодезоксихолевой кислоты на включение [^3H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов крыс после частичной ишемии. ДИ – до ишемии, ПИ – после ишемии часы

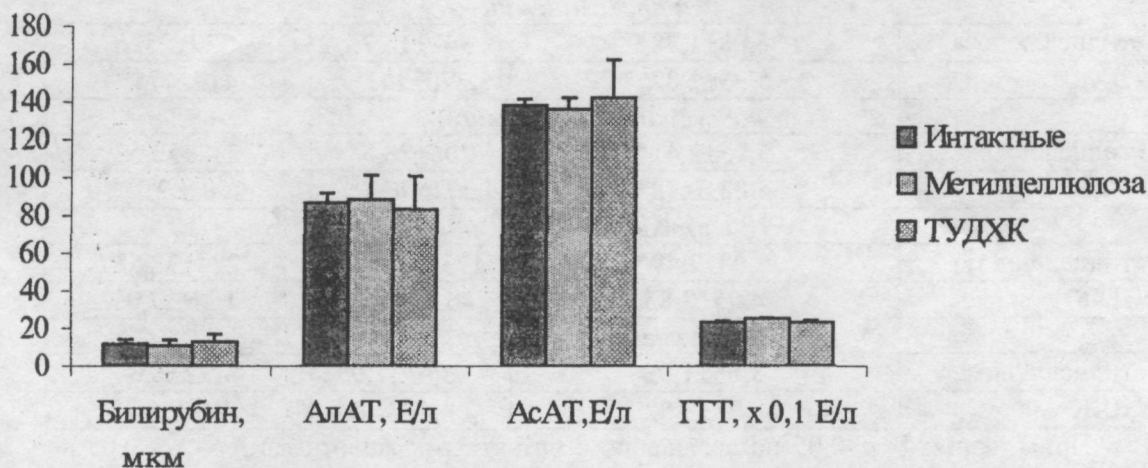


Рисунок 2.

Влияние тауроурсодезоксихолевой кислоты на активность ферментов и содержание билирубина в сыворотке крови интактных крыс

Повреждение печени в постишемическом периоде, обусловленное нарушением микроциркуляции, гипознергетическим состоянием и активацией перекисного окисления липидов [16], сопровождалось увеличением активности печеночных ферментов в сыворотке крови, наиболее выраженное через 12 ч реперфузионного периода, что свидетельствует о развитии дегенеративных и

некротических процессов в ишемизированных долях. На 2-е сутки отмечалось значительное снижение активности ферментов с нормализацией к 20-м суткам

Таблица. Влияние тауроурсодезоксихолевой кислоты на активность ферментов сыворотки крови

Группа животных	ГГТ, Е/л	АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л
Интактные	2,30±0,69	86,34±5,31	138,5±3,54
<i>Ишемия</i>			
Метилцеллюлоза	7,09±3,33*	508±119*	431±89*
ТУДХК	2,98±1,63 [#]	378±90 [#]	343±80 [#]
<i>12 ч после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	9,88±2,21*	664±31*	9328±2292*
ТУДХК	6,36±0,33 [#]	515±15,5 [#]	3760±1187 [#]
<i>18 ч после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	9,60±0,41*	650±32,1*	6335±648*
ТУДХК	6,61±2,09 [#]	543±66 [#]	3260±1951 [#]
<i>24 ч после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	7,76±1,44*	539±192*	3399±2575*
ТУДХК	6,20±0,31 [#]	350±113 [#]	2265±863 [#]
<i>30 ч после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	7,13±0,93*	452±106*	2298±986*
ТУДХК	6,05±0,90 [#]	307±128*	1293±533 [#]
<i>36 ч после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	6,35±0,2*	406±118*	1986±710*
ТУДХК	5,72±0,32 [#]	265±28 [#]	1001±430 [#]
<i>48 ч после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	6,03±1,78*	362±18,7*	579±253*
ТУДХК	5,33±1,82*	270±241*	419±174*
<i>4-е сутки после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	5,95±2,41*	206±28,8*	312±23,5*
ТУДХК	5,08±0,78*	171±70,7*	253±42,1 [#]
<i>10-е сутки после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	5,08±2,49*	173,4±77,2*	224±32,5*
ТУДХК	4,75±2,85	86,7±41,6 [#]	156±17,0 [#]
<i>20-е сутки после ишемии</i>			
Метилцеллюлоза	3,55±1,92	68,9±12,9	122±6,6
ТУДХК	2,38±3,82	68,6±31,2	123±23,1

Примечания: *- $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными, # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем.

постишемического периода. ТУДХК обладала протективным действием против ишемических и реперфузионных повреждений гепатоцитов: к концу ишемического периода выявлено менее значительное увеличение активности ферментов (АсАТ в 1,3 раза, АлАТ – в 1,25 раза и ГГТ – в 2,37 раза меньше, чем в контрольной группе). В течение реперфузионного периода отмечена достоверно более низкая активность ферментов в сыворотке крови, которая нормализовалась к 10-м суткам восстановительного периода. Гепатопротективный эффект может быть обусловлен мембраностабилизирующим эффектом ТУДХК за счет изменения фосфолипидного состава мембран [17,18], антиоксидантными

свойствами [19], а также повышением метаболизма, транспорта и экскреции токсичных гидрофобных эндогенных желчных кислот [20].

Механизм стимуляции пролиферации желчными кислотами до конца не известен. Данные литературы показывают, что желчные кислоты способны активировать протеинкиназу С в экспериментах с использованием микросомальных фракций [5] или эпителиальных клеток кишечника [21]. Кроме того, результаты *in vitro* на культуре гепатоцитов выявили способность ТУДХК повышать инозитолтрифосфат-зависимое поступление Ca^{2+} [22,23], который, как известно, участвует во внутриклеточной трансдукции сигнала ростовых факторов [24]. Поскольку окислительный стресс при реоксигенации гепатоцитов вызывает апоптотическую гибель клеток при ишемии/реперфузии [25], стимуляция пролиферации может быть связана с антиапоптотическим эффектом ТУДХК [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Foschi D., Castoldi L., Lesma A. et al. (1993) Eur. J.Surg., **159**, 393-398.
2. Deschner E.E., Coher B.I., Raicht R.F. (1981) Digestion., **21**, 290-296.
3. Imray C.H.E., Radley S., Davis A. et al. (1992) Gut., **33**, 1239-1245.
4. Bagheri S.A., Bolt M.G., Boyer J.L. et al. (1978) Gastroenterol., **74**, 188-192.
5. Fitzer C.J., O'Brien A.O., Guillem J.G. et al. (1987) Carcinogenesis., **8**, 217-220.
6. Bull A.W., Marnett L.J. Dawe E.J. et al. (1983) Carcinogenesis., **4**, 207-210.
7. Lapre J.A., Van der Meer R. (1992) Carcinogenesis., **13**, 41-44.
8. Larghi A., Crosignani A., Battezzatti P.M. et al. (1997) Aliment.Pharmacol. Ther., **11**, 409-414.
9. Crosignani A., Budillon G., Stabilini R. et al. (1998) Hepatogastroenterology, **45**, 1624-1629.
10. Абакумова О.Ю. (1977) В кн.Современные методы в биохимии. (ред. В.Н.Орехович) М.: Медицина, 338-341.
11. Blobel G., Potter R. (1968) Biochim.Biophys.Acta, **186**, 48-54.
12. Chirkin A., Danchenko E., Dargel R. (1999) Medical Science, **5**, 109-114.
13. Rodrigues C.M., Kren B.T., Steer C.J. et al. (1995) Gastroenterology, **109**, 564-572.
14. Barone M., Francavilla A., Polimeno L. et al. (1996) Hepatology., **23**, 1159-1166.
15. Francavilla A., Hagiya M., Porter K.A. et al. (1994) Hepatology., **20**, 747-752.
16. Chen M.F., Chen H.M., Ueng S.W. et al. (1998) Liver, **18**, 110-116.
17. Herti M., Herti M.C., Malago M. et al. (1999) Langenbecks. Arch. Surg., **384**, 461-466.
18. Bellentani S., Chao Y.C., Ferretti I. et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., **220**, 479-483.
19. Screejayan N., von Ritter C. (1998). Free Radic. Biol. Med., **25**, 50-56.
20. Paolini M., Pozzetti L., Piazza F. et al. (1999) Hepatology, **30**, 730-739.
21. Craven P.A., Pfanstiel J., DeRubertis F.R. (1987) J.Clin.Invest., **79**, 532-541.

22. *Bouscarel B., Fromm H, Nussbaum R* (1993) *Am. J. Physiol.*, **264**, G243-G251.
23. *Sasaki H., Matsuno T., Nakagawa K. et al.* (1997) *Acta Med. Okayama*, **51**, 305-312.
24. *Powis G., Kozikowski A.* (1991) *Clin. Biochem.*, **24**, 385-397.
25. *Beuers U., Nathanson M.H., Boyer J.L.* (1993) *Gastroenterology*, **104**, 604-612.

Поступила 13.09.00

MODULATION OF HEPATOCYTE PROLIFARATION OF ISCHEMIC RAT LIVER BY TAUROURSODEOXYCHOLIC ACID

E.O.DANCHENKO

Vitebsk Medical University, 210602 Vitebsk, Frunze ave., 27; tel: 00375-212372452, fax:
00375-212372107; E-mail: scidep@vitmed.belpak.vitebsk.by

The influence of the tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on hepatocyte proliferation after 180-minute ischemia of rat liver was investigated. TUDCA in a dose of 200 mg/kg did not change hepatocyte proliferation in the liver of intact rats and had no cytotoxic effect. The preliminary introduction of TUDCA accelerated regenerative processes in the liver in the postischemic period possibly due to synchronization of hepatocyte division. The membrane stabilizing effect of TUDCA manifested in reduction of the liver enzyme activity in blood serum was found.

Key words: proliferation, ischemia, liver, tauroursodeoxycholic acid