

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 14, №1

2015



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ***УДК 616.36-002-085.015.2:548.736.36]-092.9***СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС С ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВЫМ ГЕПАТОЗОГЕПАТИТОМ И ИХ КОРРЕКЦИЯ «ТАУЦИН»****© Пашко А.Ю., Бартош А.Н., Бушма М.И.***Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230023, Гродно, ул. Большая Троицкая, 4*

Резюме: Целью исследования было изучение гепатопротективного действия комбинации таурина с цинка диаспаратом («тауцин») у крыс с тетрахлорметановым гепатозогепатитом. В эксперименте на 24 беспородных крысах-самцах с помощью морфологических и гистохимических исследований печени, а также биохимических исследований крови установлено, что введение в желудок тетрахлорметана (2мл/кг – 5 доз) оказывает повреждающее действие на печень. Это сопровождается появлением участков жировой и белковой дистрофии, участков некроза паренхимы печени, лейкоцитарной инфильтрацией; ингибированием в гепатоцитах активности СДГ (сукцинатдегидрогеназы) и увеличением активности ЛДГ (лактатдегидрогеназы); увеличением в плазме активности АЛАТ (аланинаминотрансферазы), АсАТ (аспартатаминотрансферазы), ГГТП (γ-глутамилтранспептидазы), ЩФ (щелочной фосфатазы), содержания общего билирубина и его неконъюгированной фракции; ингибированием белоксинтезирующей функции печени. «Тауцин» (500 мг/кг/день – 9 доз), вводимый в желудок, ослабляет проявления СС14-гепатозогепатита.

Ключевые слова: крысы, тетрахлорметановый гепатозогепатит, комбинация таурина с цинка диаспаратом, гепатопротективное действие

STRUCTURAL, METABOLIC AND FUNCTIONAL DISTURBANCES IN THE LIVER OF RATS WITH TETRACHLORMETHANE-INDUCED HEPATOSHEPATITIS AND THEIR CORRECTION BY «TAUCIN»**Pashko A.U., Bartosh A.N., Bushma M.I.***Grodno State Medical University, Republic of Belarus, 230023, Grodno, Bolshaya Trojitskaya St., 4*

Summary: The purpose of the study was to investigate the hepatoprotective action of combination of taurine with zinc diaspertate ("taucin") in rats with tetrachlormethane-induced hepatoshepatitis. In experiments on 24 outbred male rats by morphological and histochemical studies of the liver and blood biochemical studies it was shown that inserted into the stomach tetrachlormethane (2 ml/kg – 5 doses) causes liver damage. It is accompanied by the appearance of areas of lipid and protein dystrophy, areas of necrosis of the liver parenchyma, leukocyte infiltration; inhibition of activity of SDH (succinate dehydrogenase) and increase in activity of LDH (lactate dehydrogenase) in hepatocytes; increase in activity of ALAT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), GGT (γ-glutamyltranspeptidase), ALP (alkaline phosphatase), the content of total bilirubin and its unconjugated fraction in the plasma; inhibition of function of protein synthesis in the liver. "Taucin" (500 mg/kg/day – 9 doses), inserted into the stomach, has weakened manifestation of tetrachlormethane-induced hepatoshepatitis.

Key words: rats, tetrachlormethane-induced hepatoshepatitis, combination of taurine with zinc diaspertate, hepatoprotective action

Введение

Аминокислота таурин в качестве лекарственного средства применяется при хронической сердечной недостаточности, интоксикации сердечными гликозидами и сахарном диабете (дибикор); травмах глаз, дистрофических заболеваниях роговицы и катаракте (тауфон); как

гепатопротектор (компонент комплексного аминокислотного лекарственного средства «тавамин») [5, 6, 7].

Препараты цинка (окись и сульфат), отдельно, и в комбинации с другими лекарственными средствами, широко применяются наружно в качестве антисептических, вяжущих и противовоспалительных средств при конъюнктивитах и катаральном ларингите, уретритах и вагинитах, угрях и дерматозах, язвах и ранах, ожогах и опрелости, пролежнях и экземе, трещинах заднего прохода и геморрое. Цинка сульфат – компонент поливитамино-минеральных комплексов (таблетки «компливит», «олиговит» и др.). Системно соединения цинка применяют в комбинированной терапии заболеваний печени и соединительной ткани, детском церебральном параличе и гнездном облысении, гипогонадизме и гипоцинкемии. За рубежом для этих целей выпускаются органические соли цинка: цинка аспартат и оротат, оксалат и цитрат, фитат и ацетат [4, 7].

Целью исследования явилось изучение структурно-метаболические и функциональные нарушения в печени крыс с тетрахлорметановым гепатозогепатитом и после коррекции состояния тауцином.

Методика

Опыты проведены на 24 беспородных белых крысах-самцах массой 200 – 250 г в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном обращении с животными. Тетрахлорметан (CCl_4) вводили в виде 50% (по объему) раствора в подсолнечном масле в дозе 2 мл/кг через 1 день в течение 10 дней (5 доз). Испытывали следующие рецептуры «тауцин», составленные по принципу 1 г/моль цинка диаспартата (0,348 г) с различными г/молярными соотношениями таурина: 20 (2,50 г) – «тауцин-20» и 50 (6,25 г) – «тауцин-50». Комбинации веществ вводили в желудок в дозе 500 мг/кг в виде взвеси в слизи крахмала, ежедневно (9 доз). Контрольным крысам вводили подсолнечное масло и слизь крахмала. Через 24 ч. после последнего введения веществ крыс лишали корма в течение 24 ч., декапитировали, брали образцы печени для оценки степени и характера поражения органа и нарушения в нем процессов метаболизма. Кроме того, исследовалась плазма для оценки рутинных биохимических показателей гепатотоксичности.

Методы оценки строения печени и активности ферментов в гепатоцитах: Одну часть кусочков печени фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином-эозином и использовали для оценки строения печени. Другие кусочки печени замораживали в жидком азоте и, после монтирования на объектодержателе по принципу «контроль-опыт», помещали в криостат фирмы «Leica CM 1850» при $-15^{\circ}C$. Изготовленные одновременно из материала контрольных и опытных животных криостатные срезы толщиной 10–14 мкм служили для определения содержания рибонуклеопротеинов (РНП) активности СДГ, ЛДГ [2].

Методы оценки маркерных биохимических показателей гепатотоксичности в плазме: определяли активность АлАТ, АсАТ (с помощью анализатора KONELAB 30i, Финляндия), ГГТП и ЩФ; содержание общего белка, общего билирубина и его фракций [1].

Количественную оценку полученных результатов проводили методом непараметрической статистики Манна-Уитни, применяя поправку Бонферрони с использованием пакета программ «Statistica» 6.0.437.0 для Windows (StatSoft, Inc., США), лицензионный номер 31415926535897 [3].

Результаты исследования

Гепатотоксическое действие тетрахлорметана. Строение печени: неповрежденная печеночная ткань представлена на рис. 1А.

Через 10 дней от начала введения крысам CCl_4 (5 доз, через 1 день) регистрировалось нарушение архитектоники печени. В дольках исчезала балочная структура. Отмечалась лейкоцитарная инфильтрация вокруг междольковых печеночных триад, центральных вен, погибших гепатоцитов. В некоторых участках центральной части долек синусоидные капилляры были сужены, часть не определялась, в других – значительно расширены. Регистрировалась жировая дистрофия гепатоцитов 3 степени (в соответствии с критерием Hornboll), с преимущественной локализацией в центрлобулярных зонах. При этом для клеток, расположенных вокруг центральных вен, была характерна крупнокапельная жировая дистрофия. В гепатоцитах промежуточной зоны регистрировалась мелкокапельная жировая и гидрорическая белковая дистрофии с явлениями кариопикноза и кариорексиса. Иногда выявлялись небольшие участки некроза паренхимы печени.

В периферических частях долек вокруг триад сохранялись 1-3 ряда относительно неповрежденных гепатоцитов (рис. 1Б).

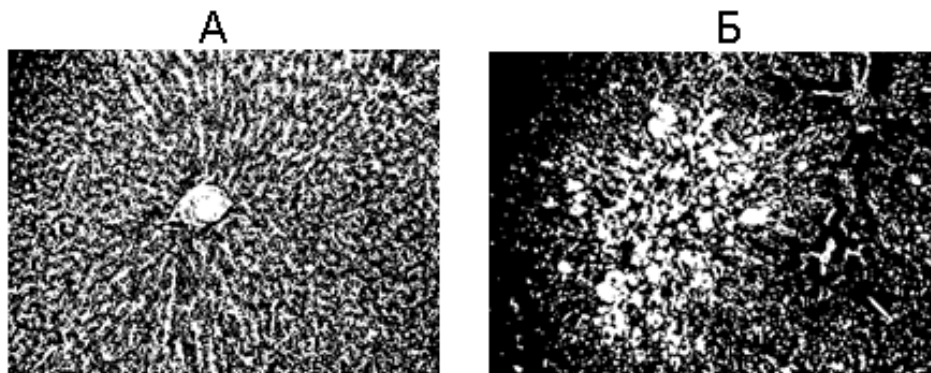


Рис. 1. А – печеночная ткань крыс из контрольной группы; Б – CCl_4 , – поврежденная печеночная долька. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофотография $\times 100$

Интенсивность выявленных изменений в популяции крыс варьировала в широких пределах. Липиды выявлялись в виде темно-синих капель. В центральных частях долек они имели большие размеры. В периферических – фоновая окраска печеночных клеток была слабая. Выявлялись мелкие липидные капли, располагающиеся в цитоплазме гепатоцитов.

При окраске срезов печени по Маллори в перикапиллярных пространствах в центральной части долек или в области центральных вен обнаруживались коллагеновые волокна. Метаболизм в печени. Печеночная ткань с нормальным содержанием РНП представлена на рис. 2А.

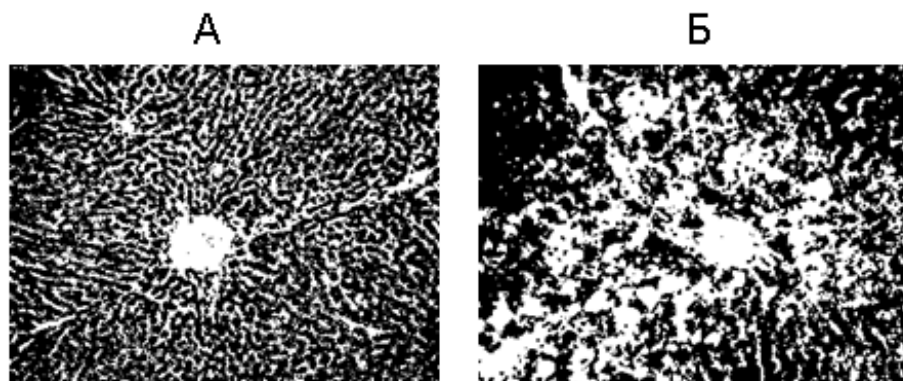


Рис. 2. А – содержание РНП в печени крыс из контрольной группы; Б – Изменения структуры печени и содержания РНП под влиянием CCl_4 . Окраска по Эйнрсону. Микрофотография $\times 100$.

Содержание РНП в поврежденных CCl_4 гепатоцитах гетерогенно. В дистрофически измененных клетках окраска цитоплазмы светлая и неравномерная. Это свидетельствует о снижении их содержания. Цитоплазма периферических гепатоцитов более темная и однородная. В клетках с крупнокапельной жировой дистрофией, располагающихся вокруг центральных вен, РНП не выявлялись. Отмечался полиморфизм ядер печеночных клеток (рис. 2Б). Активность СДГ в печени была снижена на 54%. Продукты реакции – мелкие и средние гранулы синего цвета.

Суммарная активность ЛДГ была повышена на 66%. Фермент выявлялся гетерогенно: снижен в участках повреждения и компенсаторно значительно повышен в сохранившихся неповрежденных областях печени. Продукты реакции в виде гранул синего цвета равномерно распределены в цитоплазме гепатоцитов.

Суммарная активность НАДН-ДГ сохранялась на уровне значений контрольных крыс. В относительно неповрежденных клетках печени она очень высокая и значительно снижена в очагах деструкции. Продукты реакции располагались в цитоплазме гепатоцитов в виде мелких и средних гранул синего цвета.

Показатели гепатотоксичности в плазме. В плазме повышалась активность АлАТ и АсАТ, ГГТП и ЩФ соответственно в 7,2 и 7,1; 2,6 и 3,0 раз. Содержание общего билирубина возрастало в 2,8 раза, преимущественно за счет его неконъюгированной фракции (увеличение в 3,1 раза). Концентрация общего белка снижалась (на 27,9 %), а общего холестерина – не изменялась.

Гепатозащитное действие «тауцин-20». Строение печени: «Тауцин-20» не оказал существенного влияния на характер и степень выраженности тетрахлорметановой гепатопатии. В центральной части долек гепатоциты были также дистрофически изменены. Относительно неповрежденные печеночные клетки находились в периферической части долек, где располагались в 2-5 рядов (рис. 3А).

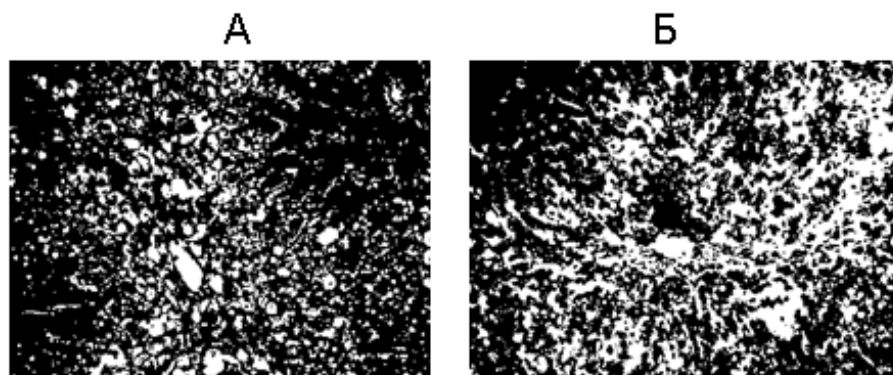


Рис. 3. А – CCl_4 + «тауцин-20» – менее выраженные дистрофические изменения. Окраска гематоксилином и эозином. Б – CCl_4 + «тауцин-20». Окраска по Эйнарсону. Микрофотография $\times 100$.

Интенсивность повреждения печени у разных животных варьировала. Регистрировалась тенденция к увеличению площадей, занимаемых относительно неповрежденными гепатоцитами.

Фоновая окраска структурных липидов была ниже, чем у крыс, получавших CCl_4 . Липидные капли меньших размеров. В перикапиллярных пространствах между гепатоцитами обнаруживалось меньшее количество, чем у контрольных крыс, коллагеновых волокон.

Метаболизм в печени. Содержание РНП в гепатоцитах, а также активности СДГ, ЛДГ и НАДН-ДГ сохранялись на уровне значений крыс, получавших только тетрахлорметан (рис. 3Б).

Показатели гепатотоксичности в плазме. Активности АлАТ и АсАТ, ГГТП и ЩФ, а также содержание общего и неконъюгированного билирубина не изменялись. Уровень конъюгированного билирубина снижался на 55%. Содержание общего белка и холестерина сохранялось на уровне значений животных, получавших только тетрахлорметан.

Гепатозащитное действие «тауцин-50». Строение печени: Степень нарушений строения печени не отличалась от крыс, получавших тетрахлорметан (рис. 4А).

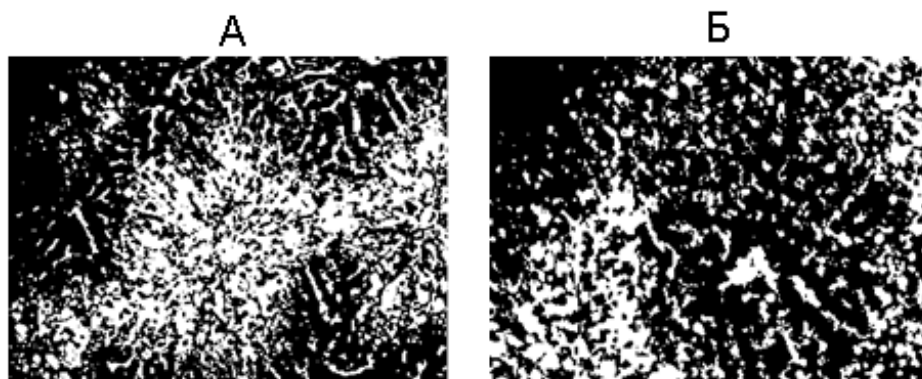


Рис. 4. CCl_4 + «тауцин-50», нет отличий от крыс, получавших CCl_4 . Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. Микрофотография

Содержание липидов в органе было близко к таковому у крыс, получавших CCl_4 в комбинации с «тауцин-20».

Метаболизм в печени. Содержание РНП, а также активности СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ в печени не отличались от таковых у животных, получавших только тетрахлорметан (рис. 4Б).

Показатели гепатотоксичности в плазме. Активности ферментов-маркеров повреждения плазматической мембраны гепатоцитов (АлАТ, АсАТ и ГГТП) снижалась соответственно на 42, 52 и 52%. Активность ЩФ сохранялась на уровне значений животных, получавших тетрахлорметан. Количество общего билирубина снижалось на 39%, за счет его конъюгированной фракции (не определялась). Содержание конъюгированного билирубина, общего белка и общего холестерина не изменялось.

Обсуждение результатов исследования

Таким образом, комбинация таурина с цинка диаспаратом «тауцин-20» обладает гепатозащитным действием при тетрахлорметановом поражении печени у крыс. Об этом свидетельствует снижение содержания липидов, коллагеновых волокон в печени и конъюгированного билирубина в плазме. Относительное увеличение содержания таурина в комбинации веществ («тауцин-50»), не влияя на выраженность нарушений строения печени и протекания в ней метаболических процессов, в значительной степени ослабляет проявления гепатопатии, судя по показателям гепатотоксичности в плазме (снижение активности АлАТ, АсАТ и ГГТП, а также содержания общего билирубина за счет его конъюгированной фракции).

Гепатозащитное действие «тауцин» при тетрахлорметановом поражении печени, по-видимому, обусловлено входящими в его состав компонентами. Таурин обладает цитопротекторными, корригирующими метаболизм свойствами и участвует в детоксикации цитотоксичных желчных кислот, с образованием нетоксичных таурохолатов. Кроме того, известна его регуляторная роль в дифференциации и росте клеток [5, 6]. Увеличение в 2,5 раза относительного содержания таурина в комбинации веществ («тауцин-50») сопровождается улучшением показателей гепатотоксичности в плазме без существенного улучшения строения печени.

Цинк входит в состав более 200 ферментов и, поэтому, является внутриклеточным биорегулятором. По-видимому, он, как и таурин, может обладать самостоятельным гепатозащитным действием. Это предположение базируется на том обстоятельстве, что цинк входит в состав супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы – важнейших компонентов ферментной системы антиоксидантной защиты клеток [4, 7].

Выводы

1. Комбинация таурина с цинка диаспаратом («тауцин-20») в общей дозе 500 мг/кг снижает проявления CCl_4 -гепатозогепатита у крыс, судя по результатам морфологических и гистохимических исследований печени.
2. Увеличение относительного содержания таурина в составе «тауцин-50» сопровождается ослаблением проявлений гепатотоксичности, судя по снижению в плазме активности АлАТ, АсАТ и ГГТП (на 42-52%) и выраженности гипербилирубинемии, без существенного улучшения строения печени.

Литература

1. Камышников, В.С. Клинико-лабораторная диагностика заболеваний печени. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 96 с.
2. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
4. Formigari A., Irato P., Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects // *Comp. Biochem. Physiol. Pt. C.* – 2007. – N146. – P. 443-459.
5. Harada, H. Oral taurine supplementation prevents the development of ethanol-induced hypertension in rats // *Hypertens Res.* – 2000. – N23. – P. 277-284.

6. Manovitskaia A.V. Clinical effects of application of taurines in patients with metabolic syndrome // Vopr. Pitan. – 2011. – V.80, N3. – P. 57-61.
7. Razvodovsky Y.E., Doroshenko E.M., Naumov A.V. Taurine and zinc can prevent ethanol induced hyperhomocysteinemia // J. Nutr. – 2007. – V.42, N1. – P. 158-159.

Информация об авторах

Пашко Анастасия Юрьевна – аспирант кафедры фармакологии им. проф. М.В. Кораблева Гродненского государственного медицинского университета. E-mail: anfstas@inbox.ru

Бартош Алексей Николаевич – ассистент кафедры фармакологии им. проф. М.В. Кораблева Гродненского государственного медицинского университета. E-mail: 68839119@mail.ru

Бушма Михаил Иванович – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии им. проф. М.В. Кораблева Гродненского государственного медицинского университета. E-mail: 68839119@mail.ru