

ВОПРОСЫ АЛКОГОЛИЗМА

ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛКОГОЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ

Е. Б. Белоновская¹, Е. Е. Нарута¹, О. Я. Лукивская¹, В. З. Абакумов², В. У. Буко¹

Исследована эффективность новых производных урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) – УДХК-N-ацетилцистеина, УДХК-L-цистеина, нор-УДХК – в дозах, эквивалентных УДХК в дозе 40 мг/кг/сут для профилактики алкогольного поражения печени у крыс, вызванного длительным потреблением жидкой этанолсодержащей диеты Либер-Де Карли. УДХК и ее производные ослабляют в той или иной степени выраженность патологических изменений в печени и крови: уменьшают интенсивность стеатоза, снижают активность щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы, уровень триглицеридов в сыворотке и печени, а также содержание фактора некроза опухоли альфа. При этом более выраженное гепатопротекторное действие по сравнению с УДХК оказывает нор-УДХК за счет уменьшения аккумуляции триглицеридов в печени.

Ключевые слова: алкогольный стеатогепатит; гепатопротективное действие; урсодезоксихолевая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Злоупотребление алкоголем — наиболее частая причина развития острых и хронических диффузных заболеваний печени. Алкогольный стеатогепатит (АСГ) представляет одну из основных форм алкогольной болезни печени и характеризуется значительным распространением в популяции. Высокая медико-социальная значимость данной патологии обусловлена значительным процентом инвалидизации и развитием фатальных осложнений в виде цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [4]. Несмотря на многообразие лекарственных средств, применяемых в фармакотерапии алкогольного поражения печени, они не всегда эффективны.

Лечение АСГ представляется весьма сложной задачей в связи с определенными трудностями проведения этиотропной терапии, а также отсутствием доказательной базы для большинства препаратов, имеющих теоретическое обоснование эффективности при данной патологии. Важным и актуальным в настоящее время является поиск новых фармакологических веществ для коррекции метаболического дисбаланса при поражении печени, вызванного хронической алкогольной интоксикацией, снижающих токсичность этанола и имеющих высокий индекс безопасности. На сегодняшний день имеется большое количество экспериментальных и клинических данных об успешном применении в терапии АСГ урсодезоксихолевой кислоты (УДХК), используемой в основном для лечения заболеваний с наличием внутриспеченочного хо-

лестазы [2, 4]. Данный препарат обладает уникальными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, прямым цитопротективным и мембраностабилизирующим действием, что обеспечивает его терапевтическую эффективность, безопасность и возможность применения препарата длительными курсами.

Целью исследования явилась оценка эффективности новых производных УДХК: УДХК-N-ацетилцистеина (УДХК-N-АЦ), УДХК-L-цистеина и нор-УДХК для профилактики экспериментального АСГ у крыс. В качестве сравнения использовали коммерческий препарат УДХК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах-самках линии Вистар с массой тела к началу опыта 180 – 200 г. Для формирования АСГ использовали жидкую этанолсодержащую диету Либер-Де Карли (ЭСД), в которой этанол составлял 36 % от общей энергетической ценности [11]. Для адаптации крыс к ЭСД в течение первых 3 суток эксперимента доза этанола составляла 25 г/л диеты. С последующих суток и до конца опыта содержание этанола в диете соответствовало 50 г/л. Контрольные животные получали жидкую безалкогольную диету, в которой этанол был изокалорийно замещен мальтодекстрином. Все диеты были приготовлены на основе стандартной диеты Либер-Де Карли производства Ssniff Specialdiäten GmbH (Германия). В опытах использованы вещества производства Prodotti Alimentari S.o.o., Basalucco (Италия).

Животные были разделены на следующие группы: 1 — контрольная, получавшая безалкогольную жидкую диету; 2 — животные, получавшие ЭСД в течение 8 недель опыта. В последующих группах крысы получали в течение 8 недель на фоне ЭСД: 3 — УДХК в дозе 40 мг/кг/сут; 4 — УДХК-N-АЦ в дозе 52,8 мг/кг/сут; 5 — УДХК-L-цистеин в дозе 54,8 мг/кг/сут; 6 — нор-УДХК в

¹ Отдел биохимической фармакологии Государственное учреждение “Научно-производственный центр “Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси”, Гродненский филиал, 230030, Гродно, БЛК 50,

² УО “Гродненский государственный медицинский университет”, 230015, Гродно, ул. Горького, 80.

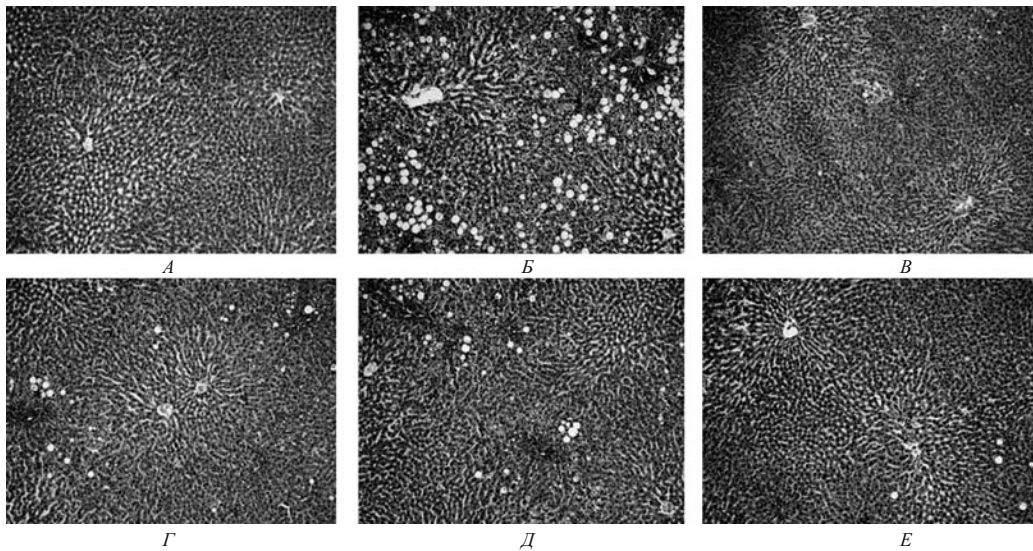


Рис. 1. Гистологическое строение ткани печени крыс с алкогольным стеатогепатитом, получавших УДХК и ее производные.

А — контрольная группа; нормальное строение печени. *Б* — животные, потреблявшие этанолсодержащую диету без профилактического применения препаратов; крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов с наличием лимфогистиоцитарной инфильтрацией портального тракта. *В* — УДХК. *Г* — УДХК-N-АЦ. *Д* — УДХК-L-цистеин. *Е* — нор-УДХК, снижение признаков стеатоза печени с сохранением воспалительной клеточной инфильтрации. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$.

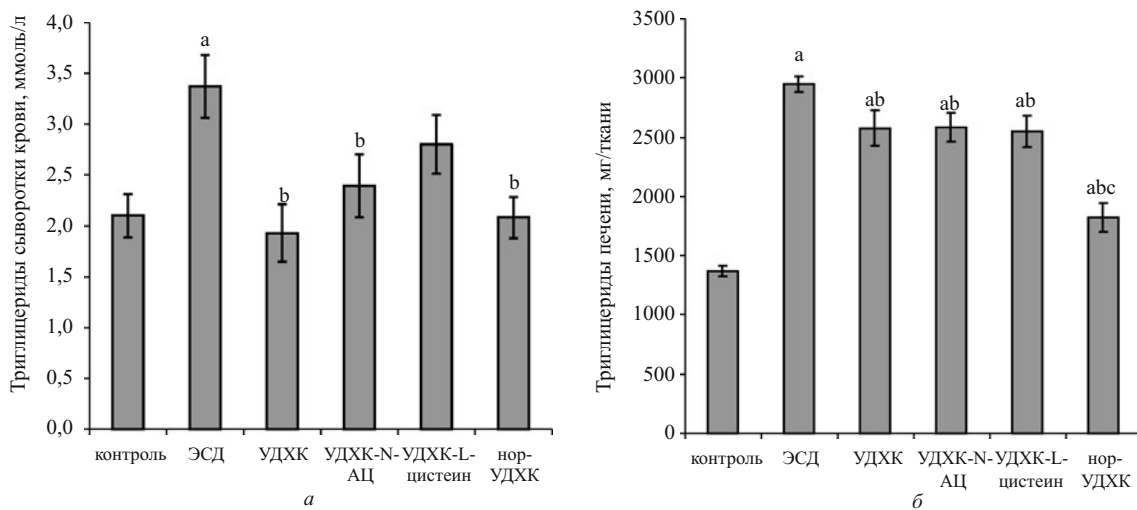


Рис. 2. Содержание триглицеридов в сыворотке крови (*а*) и в печени (*б*) крыс с алкогольным стеатогепатитом, получавших УДХК и ее производные.

Здесь и на рис. 3: *a* — $p < 0,05$ — достоверное отличие по сравнению с контролем; *b* — $p < 0,05$ — по сравнению с группой животных, потреблявших ЭСД; *c* — $p < 0,01$ — по сравнению с группой животных, получавших УДХК.

дозе 38,6 мг/кг/сут. Все вещества вводили в дозах, эквивалентных УДХК 40 мг/кг/сут ежедневно, внутривенно на 0,8 % водном геле гидроксиметилпропилцеллюлозы с первых суток (на фоне потребления ЭСД). Каждая группа состояла из 8 животных. Скармливание ЭСД проводили без ограничений, с ежедневным мониторингом съеденного объема. Контрольной группе диету давали в объеме, равном съеденному животными 2-й группы, что обеспечивало парнокормленность. Экспериментальный протокол соответствовал международным стандартам проведения эксперимента с животными (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)). По оконча-

нии эксперимента декапитация животных проводилась под тиопенталовым наркозом. Материалом исследования явились кровь, взятая натощак из шейной вены, и ткань печени.

Для проведения гистологического исследования образцы ткани печени фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, обезживали по стандартной методике в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы (толщина 5 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином [3] для обзорных исследований грубых морфологических нарушений в органе. Для оценки степени аккумуляции липидов в печени часть образцов печени замораживали в жидком азоте.

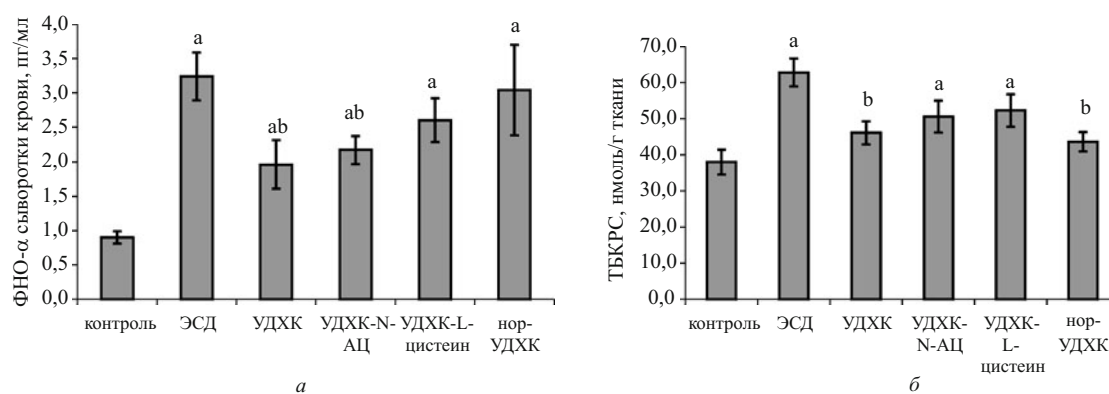


Рис. 3. Уровень цитокина ФНО-α в сыворотке крови (а) и содержание ТБКРС-реагирующих субстратов в ткани печени (б) крыс. Обозначения те же, что на рис. 2.

Срезы, приготовленные в криостате толщиной 15 мкм, окрашивали суданом черным В [3]. Определение относительной площади суданофилии проводили с помощью компьютерной системы анализа цветового изображения BIOSCAN-NT (Минск, Беларусь). Оценку воспалительной реакции проводили полуколичественным методом с подсчетом воспалительных фокусов в ткани печени, состоящих из лимфоцитов, в 20 полях зрения ($\times 40$ объектив): 0 баллов — отсутствие воспаления; 1 — очаг, состоящий из < 5 клеток; 2 — > 5 клеток. Микрофотографирование гистологических препаратов осуществляли при помощи комплекса визуализации изображения, состоящего из микроскопа Olympus CX-41 и цифровой фотокамеры Olympus (Япония).

В сыворотке измеряли активность щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ), уровень триглицеридов (ТГ) в сыворотке и печени с помощью наборов фирмы "Lachema" (Чехия). Содержание фактора некроза опухолей альфа (ФНО-α) в сыворотке проводили с помощью тест-системы Quantikine производства "R&D Systems" (США) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) регистрировали по концентрации субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), оп-

ределяемых спектрофотометрически по методу Stocks и Dormandy [15]. Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего арифметического (SEM) и проанализированы с расчетом *t*-критерия Стьюдента, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на однотипное поведение и физическую активность животных во всех группах, крысы, получавшие ЭСД в течение 8 недель, достоверно отставали по массе по сравнению с животными, получавшими контрольную диету: прибавка по массе к концу эксперимента составила соответственно 8,2 и 13,5 % по отношению к исходной.

При гистологическом исследовании печени у крыс, получавших ЭСД, наблюдалась крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов в сочетании с умеренно выраженной баллонной дистрофией (рис. 1, Б). Значительная часть клеток с обильными жировыми включениями располагалась перипортально. Обнаруженные воспалительные изменения в печени характеризовались наличием фокальных участков гепатоцитов в состоянии некробиоза с сопутствующей лимфоцитарной инфильтрацией печеночных долек и отдельных портальных трактов. Признаки цирротической трансформации печени отсутствовали. Относительная площадь суданофильных областей у животных с АСГ превышала контрольные значения более чем в 2 раза (табл. 1).

УДХК и ее производные уменьшали интенсивность стеатоза (рис. 1, В – Е). В 25 % случаев при введении УДХК, УДХК-N-АЦ и нор-УДХК наблюдалась картина относительно нормальной печени (табл. 2). Однако достоверное снижение площади суданофильной окраски срезов печени отмечено лишь при введении нор-УДХК. Применение УДХК и её остальных производных снижало этот показатель в одинаковой степени, но недостоверно (табл. 1). Явления воспалительной внутридольковой инфильтрации сохранялись у животных всех исследуемых групп, однако степень ее интенсивности снижалась в большей степени УДХК (табл. 2). Очаги некробиоза ге-

Таблица 1. Влияние производных УДХК на активность маркерных ферментов сыворотки крови и площадь суданофильного окрашивания у крыс с алкогольным стеатогепатитом

Группа животных	Щелочная фосфатаза, МЕ/л	Гамма-глутамил-транспептидаза, МЕ/л	Относительная площадь суданофильного окрашивания, %
Контроль	187 \pm 4	4,0 \pm 0,3	3,2 \pm 0,2
ЭСД	287 \pm 16 ^a	8,3 \pm 0,3 ^a	7,3 \pm 0,7 ^a
УДХК	205 \pm 20 ^b	5,1 \pm 0,3 ^{ab}	5,8 \pm 0,5 ^a
УДХК-N-АЦ	245 \pm 10 ^{ab}	5,0 \pm 0,4 ^b	5,8 \pm 0,4 ^a
УДХК-L-цистеин	286 \pm 13 ^{ac}	5,0 \pm 0,4 ^b	5,9 \pm 0,4 ^a
Нор-УДХК	262 \pm 16 ^{ac}	4,7 \pm 0,4 ^b	5,0 \pm 0,6 ^{ab}

Примечание. Здесь и в табл. 2: ^a — статистически значимое отличие от контрольной группы животных; ^b — от группы животных, потреблявших ЭСД; ^c — от группы животных, получавших УДХК.

Таблица 2. Показатели интенсивности стеатоза и воспаления печени крыс с алкогольным стеатогепатитом, получавших производные УДХК

Показатель	Контроль (n = 8)		ЭСД (n = 8)		УДХК (n = 8)		УДХК-N-ацетилцистеин (n = 8)		УДХК-L-цистеин (n = 8)		Нор-УДХК (n = 8)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Отсутствие признаков стеатоза печени	8	100	8	0	2	25	2	25	8	0	2	25
Стеатоз печени:	8	0	8	100	6	75	6	75	8	100	6	75
выраженный (макроевезикулярный)			8	100	1	12,5	0	0	0	0	1	12,5
умеренно-выраженный (сочетание макро- и микроевезикулярного)					3	37,5	4	50	5	62,5	1	12,5
слабовыраженный (микроевезикулярный)					2	25	2	25	3	37,5	4	50
Воспаление: * (средний балл)	0		1,1 ± 0,1		0,9 ± 0,1 ^b		1,0 ± 0,1		1,0 ± 0,1		1,0 ± 0,1	

* — 0 баллов — отсутствие воспаления; 1 — очаг, состоящий из < 5 лимфоцитов; 2 — > 5 лимфоцитов.

паточитов отсутствовали во всех группах, получавших УДХК и её производные.

В сыворотке крови хроническая алкогольная интоксикация вызывала повышение активности ЩФ в 1,5 раза, а ГГТ в 2,1 раза по отношению к контрольной группе. Введение УДХК достоверно снижало активность ЩФ, тогда как ее производные не вызывали существенных изменений активности этого фермента. Активность ГГТ значительно снижалась всеми исследуемыми веществами (табл. 1).

Потребление ЭСД вызывало достоверное увеличение уровня ТГ в сыворотке крови в 1,6 раза. Кроме того, имело место увеличение содержания ТГ в печени в 2,2 раза по сравнению с контролем. Все вещества, за исключением УДХК-L-цистеина, достоверно снижали уровень ТГ сыворотки (рис. 2, а). Снижение ТГ в печени имело место во всех опытных группах, получавших вещества, однако в сравнении с УДХК наиболее значительное снижение отмечено у животных, получавших нор-УДХК (рис. 2, б).

У животных с АСГ наблюдалось резкое увеличение сывороточной концентрации основного провоспалительного цитокина ФНО-α, уровень которого был выше в 3,6 раза по сравнению с контрольной группой (рис. 3, а). УДХК и УДХК-N-АЦ в отличие от УДХК-L-цистеина и нор-УДХК достоверно снижали уровень ФНО-α.

Потребление этанола увеличивало наработку конечных продуктов ПОЛ, определяемых в печени в виде ТБКРС, что свидетельствовало об активации окислительного стресса. Уровень ТБКРС в печени достоверно снижался УДХК и нор-УДХК. Другие производные не влияли на этот показатель (рис. 3, б).

Полученные результаты указывают, что потребление животными жидкой ЭСД Либера-Де Карли в течение 8 недель вызывало изменения в печени, свидетельствующие

о развитии АСГ, который характеризовался наличием воспалительного процесса на фоне микроевезикулярного стеатоза. О развитии поражения печени также свидетельствовали и изменения биохимических показателей сыворотки крови. У животных отмечалось повышение активности ЩФ и ГГТ — маркерных ферментов при заболевании печени алкогольной этиологии, что согласуется с литературными данными [4]. Вследствие периферического липолиза и снижения утилизации жирных кислот гепатоцитами, хроническая алкогольная интоксикация вызывала увеличение содержания ТГ в сыворотке и печени. Как известно, алкоголь индуцирует избыточную продукцию и накопление в печеночных клетках свободных радикалов и других токсических метаболитов, вследствие чего происходит нарушение про- и антиоксидантного равновесия с преобладанием прооксидантной составляющей и развитие окислительного стресса [2, 12]. Доказательством этого явилось активация окислительного стресса, проявившегося увеличением уровня ТБКРС у животных с АСГ. В условиях повышенного образования свободных радикалов имеет место гиперсекреция провоспалительных цитокинов, играющих ключевую роль в развитии АСГ и в первую очередь ФНО-α, который способствует апоптозу клеток печени, развитию некроза и воспалительной клеточной инфильтрации [2, 4]. У животных, получавших ЭСД, содержание ФНО-α резко увеличивалось по сравнению с контрольной группой.

Основываясь на результатах морфологических и биохимических исследований, можно сделать заключение, что введение всех исследуемых производных УДХК на фоне жидкой ЭСД ослабляет в той или иной степени развитие патологических изменений в печени. Это указывает на их гепатопротекторные свойства. Между тем УДХК и нор-УДХК обладают более выраженным гепатозащит-

ным действием. Следует отметить, что нор-УДХК в сравнении с базовым препаратом проявляет наиболее выраженную гипополипидемическую активность за счет снижения площади суданофильного окрашивания и уровня ТГ в печени. Влияние других производных УДХК, УДХК-N-АЦ и в меньшей степени УДХК-L-цистеина, на стеатоз печени было выражено не столь значительно.

Исследования показали, что противовоспалительный эффект был сильнее выражен у УДХК, что подтверждалось снижением содержания ФНО- α в сыворотке крови и лимфоцитарной инфильтрации печеночных долек и отдельных портальных трактов. УДХК-N-АЦ также достоверно снижал сывороточный уровень ФНО- α , однако микроскопия срезов печени указывает, что противовоспалительный эффект этого соединения сопоставим с таковым для УДХК-L-цистеина и нор-УДХК. В то же время, литературные данные свидетельствуют, что у мышей линии Mdr^{-/-} и мышей со спонтанным неалкогольным стеатогепатитом (NEMO-зависимый гепатоцит-специфический стеатогепатит) противовоспалительное действие нор-УДХК было значительно сильнее по сравнению с УДХК [8, 9].

При хронической алкогольной интоксикации, воспроизведенной на других экспериментальных моделях, где уровень триглицеридов печени повышался в 3–4 раза, снижение уровня ТГ печени под влиянием УДХК было более значительным и приближалось к контрольному [13, 14]. Предполагается, что гипополипидемическое действие УДХК опосредовано нетранскрипционными механизмами через активацию внутриклеточных протеинкиназ. УДХК угнетает синтез цАМФ, индуцируемый глюкозоном посредством активации протеинкиназы С [6]. Поскольку индуцируемая глюкозоном аккумуляция цАМФ стимулирует окисление [7] и ингибирует синтез [10] жирных кислот в печени, предполагается, что гипополипидемический эффект УДХК реализуется через сигнальный каскад цАМФ — протеинкиназа С. Механизм гипополипидемического действия нор-УДХК, по всей вероятности, отличен от УДХК. В эксперименте на мышцах со спонтанным неалкогольным стеатогепатитом нор-УДХК в отличие от УДХК оказывала выраженный защитный эффект, угнетая липогенез, опосредуемый LRX-рецепторами, а также снижая воспаление и апоптоз [5].

Таким образом, полученные данные указывают на перспективность и целесообразность дальнейшего изуче-

ния применения нор-УДХК в профилактике и лечении заболеваний печени алкогольного генеза.

ВЫВОДЫ

1. Урсодезоксихолевая кислота (УДХК) и ее производные (УДХК-N-ацетилцистеин, УДХК-L-цистеин и нор-УДХК) на фоне длительного потребления жидкой этанолсодержащей диеты Либер-Де Карли ослабляют выраженность патологических изменений в печени и крови (уменьшают интенсивность стеатоза, снижают активность щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы, уровень триглицеридов в сыворотке и печени, а также содержание фактора некроза опухолей альфа).

2. Более выраженное гепатопротекторное действие по сравнению с УДХК оказывает нор-УДХК за счет уменьшения аккумуляции триглицеридов в печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. О. Буеверов, *Consilium medicum*, **7**(6), 460 – 463 (2005).
2. М. В. Маевская, *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колпрол.*, **19**(2), 14 – 19 (2009).
3. Г. А. Меркулов, *Курс патогистологической техники*, Медицина, Ленинград (1969).
4. С. Н. Мехтиев, Ю. А. Кравчук, В. Ю. Ганчо и др., *Лечащий врач*, (8), 57 – 64, (2009).
5. N. Beraza, L. Ofner-Ziegenfuss, H. Ehedego, et al., *Gut*, **60**(3), 387 – 396 (2011).
6. V. Bouscarel, T. W. Gettys, H. Fromm, et al., *Am. J. Physiol.*, **268**, 300 – 310 (1995).
7. E. P. Brass, C. E. Alford, M. J. Garrity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **930**, 122 – 126 (1987).
8. A. A. Caro, A. I. Cederbaum, *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 27 – 42 (2004).
9. P. Fickert, M. Marschall, H. U. Fuchsichler, et al., *Gastroenterology*, **130**(2), 465 – 81 (2006).
10. M. D. Lane, P. A. Watkins, M. J. Meredith, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **7**, 121 – 141 (1979).
11. C. S. Lieber, *Gastroenterology*, **106**, 1085 – 1105 (1994).
12. C. S. Lieber, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **6**(1), 60 – 65 (2004).
13. O. Ya. Lukivskaya, A. A. Maskevich, V. U. Buko, *Alcohol*, **25**(2), 99 – 105 (2001).
14. O. Ya. Lukivskaya, L. Zavodnik., M. Knas, et al., *Adv. Med. Sci.*, **51**, 54 – 59 (2006).
15. J. Stocks, *Br. J. Haematol.*, **20**, 95 – 111 (1971).

Поступила 18.03.02

PREVENTIVE ADMINISTRATION OF NEW UDCA DERIVATIVES IN EXPERIMENTAL ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

E. B. Belonovskaya¹, E. E. Naruta¹, O. Ya. Lukivskaya¹, V. Z. Abakumov², and V. U. Buko¹

¹ Institute of Pharmacology and Biochemistry (Grodno Branch), National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, 230030, Belarus Republic

² Grodno State Medical University, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230015, Belarus Republic

We have studied the prophylactic effect of new derivatives of ursodeoxycholic acid (UDCA), including UDCA-N-acetylcysteine, UDCA-L-acetylcysteine, and nor-UDCA (in doses equivalent to 40 mg/kg of UDCA) on the development of experimental alcoholic steatohepatitis induced by the Lieber – DeCarli liquid ethanol-containing diet. Results demonstrated that most of the investigated compounds produced a hepatoprotective effect, improving biochemical tests and liver morphology, as manifested by decreasing steatosis intensity, activity of alkaline phosphatase and gamma-glutamyltranspeptidase, triglyceride level in blood serum and liver, and TNF alpha content. However, nor-UDCA was most effective as compared to UDCA in preventing the accumulation of triglycerides in the liver.

Keywords: alcoholic steatohepatitis; hepatoprotective effect; ursodeoxycholic acid (UDCA)