

УЛЬТРАСТРУКТУРА ПЕЧІНКИ В УМОВАХ ЗАСТОСУВАННЯ ЛОРАТАДИНУ

О.В. Дудок, В.І. Ковалишин, О.Д. Луцук

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. - проф. О.Д. Луцук)

Реферат

Мета. В експерименті на тваринах вивчити вплив тривалого застосування антигістамінного препарату Лоратадину на ультраструктуру клітин печінки.

Матеріал і методи. Експерименти виконано на 18 статево-дорослих білих щурах-самцях лінії Вістар масою 160-200 г, яких було розділено на 2 групи по 9 тварин у кожній. Перша група слугувала контролем. Щурам другої групи щоденно однократно упродовж 30 днів перорально вводили Лоратадин у дозі 0,15 мг/кг маси тіла у вигляді водної суспензії. На 10-й, 20-й, 30-й дні після останнього введення препарату (відповідно 40-й, 50-й та 60-й дні від початку експерименту) здійснювали евтаназію тварин та забирали шматочки печінки для електронно-мікроскопічних досліджень.

Результати й обговорення. На 40-й день експерименту виявлено низку змін в ультраструктурі гепатоцитів, а саме: переважання гранулярного компоненту ядра над фібрилярним, підвищення електронної щільності цитоплазми, у якій визначався підвищений вміст ліпідних включень в оточенні мітохондрій. Останні мали збільшені розміри, порушення контурності крист та внутрішньої мітохондріальної мембрани. У гепатоцитах спостерігалися ознаки гіперплазії гладкої ендоплазматичної сітки. На 50-й день експерименту зміни проявлялися у зменшенні вмісту рибосом, зв'язаних з мембранами гранулярної ендоплазматичної сітки. Ліпідна інфільтрація гепатоцитів поєднувалася зі збільшенням включень глікогену. Спостерігалися також локальні звуження простору Діссе у поєднанні з появою у цих ділянках нетипових клітинних елементів - фібробластоподібних клітин, плазмоцитів. На 60-й день експерименту ультраструктурна організація печінки була такою ж, як і у попередні терміни. Водночас у багатьох гепатоцитах спостерігалися ознаки внутрішньоклітинної регенерації у вигляді збільшення вмісту вільних полірибосом, максимальної деконденсації ядерного хроматину.

Висновки. Тривале застосування максимальних терапевтичних доз Лоратадину супроводжується змінами ультраструктури печінки, які свідчать про посилену інактивацію препарату з одного боку та розвиток супутніх деструктивних процесів з іншого. Такі зміни, в основному, носять транзиторний характер, але можуть бути визначальними у розвитку глибоких незворотних уражень печінки на тлі дії на неї інших гепатотоксичних чинників (віруси, наркотичні, психотропні речовини, тощо).

Ключові слова: антигістамінні препарати, Лоратадин, ультраструктура печінки, детоксикація

Abstract

LIVER ULTRASTRUCTURE AFTER
ADMINISTRATION OF LORATADINE

O.V. DUDOK, V.I. KOVALYSHYN, A.D. LUTSYK

The Danylo Haltsky National Medical University in Lviv

Aim. To investigate the influence of a long-time administration of antihistamine drug Loratadine on the ultrastructure of liver.

Material and Methods. Experiments were performed on 18 male Wistar rats weighting 160-200 g, which were subdivided into two groups of 9 animals each. The first group of the rats served as a control. Animals of the second group during 30 days were treated with aqueous suspension of Loratadine, which they received through intragastric daily injections in the dose of 0.15 mg / kg body weight. On days 10, 20 and 30 after the last injection (40-th, 50-th and 60-th day of experiment) animals were sacrificed and tissue samples of liver were taken for electron microscopic investigation.

Results and Discussion. On the 40-th day of the experiment the detected changes involved mainly hepatocytes and were as follows: increased content of pars granulosa in the nucleolus' elevated electron density of the cytoplasm; enhanced amount of lipid inclusions surrounded by the enlarged mitochondria. The latters exposed irregular cristae and impaired inner mitochondrial membrane. Smooth endoplasmic reticulum expressed signs of hyperplasia. On the 50-th day there was noted a decreased ribosomal content in rough endoplasmic reticulum accompanied by lipid infiltration and accumulation of glycogen deposits within the hepatocytes. Inside the liver lobules there were detected local narrowings of Disse space in association with the appearance in these same locations of plasmocytes and fibroblast-like cells. On the 60-th day of experiment the morphology of hepatocytes was similar to that described earlier, although some hepatocytes demonstrated certain signs of intracellular regeneration - i.e. increased content of free polyribosomes and further decondensation of nuclear chromatin.

Conclusions. Long lasting application of the highest therapeutic doses of Loratadine induced ultrastructural changes in the liver, which apparently encompass this drug inactivation on the one hand and impairments of hepatocytes on the other. These changes most likely are of transient nature, but may play crucial role in the development of irreversible alterations of liver in association with other hepatotoxic factors (viruses, drugs, psychotropic substances, etc.).

Key words: antihistamine drugs, Loratadin, ultrastructure of liver, detoxication

Вступ

Ураження печінки, спричинене ліками, займають значне місце у загальній структурі патології цього органа. За даними Kunt e.a. [5], до 40% гепатитів, виявлених у пацієнтів віком понад 40 років обумовлені медикаментозною гепатотоксичністю.

Доведено, що при прийомі пацієнтами одночасно шести і більше різновидів ліків ймовірність розвитку структурно-функціональних зрушень у печінці сягає 80% [11]. При цьому деструктивна дія обумовлена не стільки самими препаратами, скільки їхніми реактивними метаболітами, що утворюються у печінці за участю системи біотрансформації ксенобіотиків [4]. До ключових ланок патогенезу медикаментозно-індукованого процесу ураження печінки відносять порушення кальцієвого гомеостазу, оксидативний стрес та мітохондріальну дисфункцію, що веде до деструкції гепатоцитів та інших клітинних популяцій печінки [7, 12]. Морфологічними проявами таких процесів є гіперплазія гладкої ендоплазматичної сітки, модифікація мітохондріального компартменту у вигляді деформації і деструкції крист, набрякання матриксу з утворенням мітохондрій великих розмірів [16]. Найбільш повно такі зміни знайдені і описані при вивченні уражень печінки, пов'язаних із прийманням антибіотиків [11, 14], оскільки ці препарати дуже часто застосовують у практичній медицині.

Поряд із тим, за останні роки з'явилася низка повідомлень про можливий токсичний вплив на організм людини цілого ряду антигістамінних препаратів - блокаторів H₁-гістамінових рецепторів [1, 2]. Актуальність таких досліджень засвідчує, в першу чергу, той факт, що антигістамінні препарати за своєю поширеністю на фармацевтичному ринку, доступністю (рецепт лікаря не потрібен) та частотою застосування (в тому числі при самолікуванні) не поступаються антибіотикам. Одним з таких препаратів є Лоратадин - блокатор H₁-гістамінових рецепторів другого покоління. Позитивною рисою цього препарату є відсутність інгібіторного впливу на центральну нервову систему, тому він застосовується частіше, ніж інші антигістамінні препарати. У доступній літературі ми не знайшли даних щодо впливу цього препарату на мікроструктуру печінки. У той же час проводяться дослідження впливу Лоратадину на стан системи імунного захисту у працівників фармацевтичної промисловості, які пов'язані з виробництвом антигістамінних препаратів [6].

Метою роботи було вивчення в експерименті на тваринах впливу тривалого застосування антигістамінного препарату Лоратадину на структуру клітин печінки.

Матеріал і методи

Експерименти виконано на 18 білих щурах-самцях лінії Wistar масою 160-200 г, які утримувались в стандартних умовах віварію. Усі роботи і маніпуляції проводили відповідно до положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) та загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених 1 Національним конгресом України з біоетики (2001).

Піддослідні тварини було розділено на 2 групи по 9 тварин у кожній. Перша група тварин була контрольною. У другій групі білим щурам щоденно однократно впродовж 30 днів перорально вводили Лоратадин у дозі 0,15 мг/кг маси тіла, у вигляді водної суспензії. Лоратадин - етиловий ефір-4-8-хлор-5,6-дигідро-11Н-бензо-[5,6]циклогепта-[1,2-b]піридин-11-іліден)-1-піперидинкарбонової кислоти. Виробник - "FARMACHEM SA Chem Limited" (Індія). Доза препарату відповідала середньодобовій максимальній дозі для людини. На 10-й, 20-й, 30-й дні після останнього введення препарату здійснювали евтаназію тварин шляхом дислокації шийних хребців під загальним ефірним наркозом. Доцільність такого дизайну експерименту (термінів взяття матеріалу для досліджень) мотивувалася даними щодо високої кумулятивної здатності Лоратадину та відсутністю у літературних джерелах повідомлень про віддалені наслідки тривалого застосування препарату.

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки печінки розміром 0,5-1 мм³ фіксували у 2% розчині OsO₄ на 0,1М буфері Міллоніга (рН 7,36) [9], промивали у одноіменному буфері та зневоднювали у водних розчинах етанолу зростаючих концентрацій. Отриманий матеріал інкубували у двох порціях пропіленоксиду і просочували сумішшю смол епон-аралдит [15].

Зрізи отримували за допомогою ультрамікротома УМТП-3М, монтували на опорні сітки, контрастували розчином уранілацетату за методом Stempak e.a [13]. Отримані зрізи переглядали та фотографували у трансмісійному електронному мікроскопі УЕМВ-100К(м. Суми) при прискорюючій напрузі 75 кВ.

Результати й обговорення

При дослідженні ультраструктури печінки тварин

контрольної групи було встановлено, що основну масу клітинних елементів органа складають гепатоцити середньої електронної щільності, ендотеліальні клітини та зірчасті макрофаги (клітини Купфера) синусоїдних гемокапілярів. Просвіти останніх заповнені дрібнозернистим матриксом плазми крові та поодинокими форменими елементами. Між васкулярними поверхнями гепатоцитів та ендотелієм розташований чітко контурований простір Діссе (рис. 1). Отримані дані в цілому відповідають ультраструктурній організації печінки, описаній в літературі [3]. Проведені електронно-мікроскопічні дослідження печінки тварин, що отримували Лоратадин, виявили розвиток певних реактивних змін, відсутніх у тварин контрольної групи. Ці зміни були обумовлені, очевидно, напруженням процесів інактивації застосованого препарату. Так, на 10-й день після закінчення введення Лоратадину виявлені зміни торкалися головним чином гепатоцитів. Їхня цитоплазма набувала підвищеної електронної щільності. Ядра округлі з периферійною локалізацією хроматину, у структурі ядра переважав гранулярний компонент, що свідчить про посилення РНК-утворювальної функції. У цитоплазмі гепатоцитів визначався підвищений, у порівнянні з контролем, вміст ліпідних включень; краплі останніх були локалізовані поблизу мітохондрій, що свідчить про підвищення метаболічної активності гепатоцитів (рис.2). При цьому розміри мітохондрій були збільшені, контурність

крист та внутрішньої мітохондріальної мембрани порушені. Ми розцінюємо означені зміни як ознаки оксидативного стресу внаслідок реакції на метаболізм ксенобіотика.

На відміну від тварин контрольної групи, в гепатоцитах досліджуваних щурів спостерігалися явища гіперплазії гладкої ендоплазматичної сітки у вигляді розширення окремих цистерн і трубочок (рис.3), що є проявом активації детоксикаційної функції. Слід відзначити, що описані зміни торкалися, в першу чергу, гепатоцитів у центральних ділянках печінкової часточки. Якихось значних змін із сторони інших клітинних елементів печінки не виявлено. Синусоїдні гемокапіляри і структури з ними пов'язані суттєво не відрізнялися від таких у контрольній групі.

На 20-й день експерименту зміни носили дещо інший характер. Це стосувалося, у першу чергу, пригнічення білок-синтетичної функції у вигляді зменшення вмісту рибосом, зв'язаних з мембранами гранулярної ендоплазматичної сітки. Поряд з ліпідною інфільтрацією гепатоцитів у окремих з них з'являлися фагосомні тільця, підвищувався вміст включень глікогену. Цитоплазма гепатоцитів, розташованих ближче до периферії часточки була зниженої електронної щільності. Біліарні поверхні гепатоцитів містили незначну кількість мікроворсинок, деякі з них були редуковані, а просвіт жовчного капіляра розширений. У вказаний термін досліджень виявлено зміни з боку судинного русла. Вони супроводжувалися

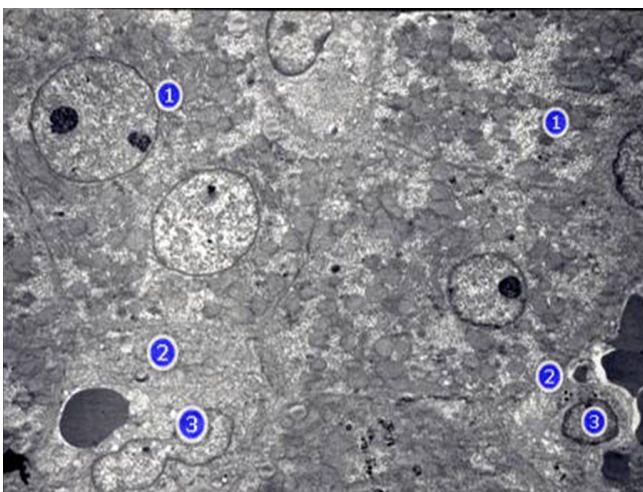


Рис. 1

Ультраструктура гепатоцитів, простору Діссе та синусоїдних гемокапілярів інтактного білого щура. 1-гепатоцит. 2- простір Діссе. 3-ендотеліоцит.

36.x2000

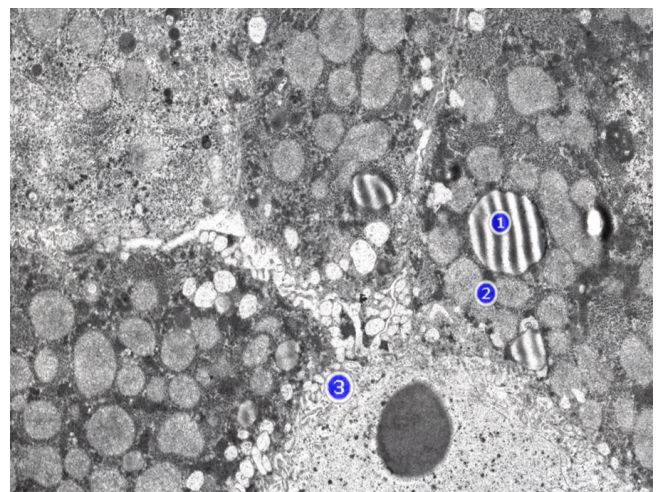


Рис. 2

Ультраструктура гепатоцита на 10-й день після припинення введення Лоратадину. 1-ліпідна крапля. 2-мітохондрія. 3- простір Діссе.

36.x4000

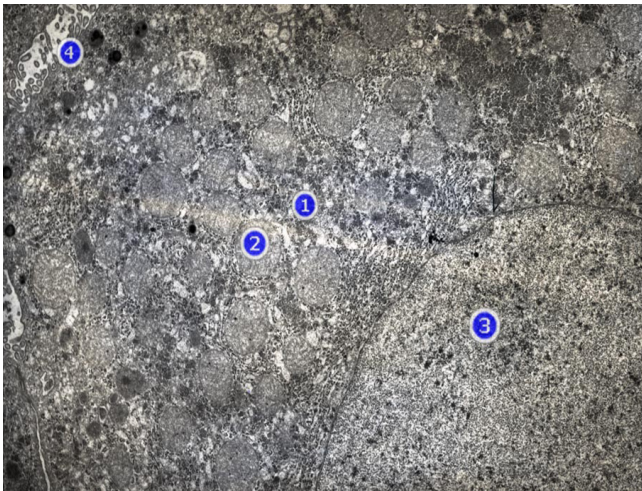


Рис. 3

Ультраструктура гепатоцита на 10-й день після припинення введення Лоратадину. Гіперплазія цистерн і трубочок гладкої ендоплазматичної сітки. 1- елемент гладкої ЕПС. 2- мітохондрія. 3- ядро. 4- жовчний капіляр. Зб.х6000

локальними звуженнями просторів Діссе у поєднанні з появою у цих ділянках нетипових клітинних елементів, як от фібробластоподібних клітин та плазмоцитів, збільшенням вмісту перисинусоїдних адипоцитів (клітин Іто) та зірчастих макрофагів (клітин Купфера). При цьому, деякі фібробластоподібні клітини характеризувалися накопиченням гранулярної ендоплазматичної сітки, просвітленнями перинуклеарних ділянок цитоплазми та відсутністю ліпідних включень (рис. 4).

Ці ознаки свідчать про можливість синтезу та відкладання такими клітинами фібрилярних (колагеновмісних) структур у просторах Діссе. Виявлені нами плазмоцити мали характерні для них ознаки, у першу чергу добре розвинену гранулярну ендоплазматичну сітку та специфічну локалізацію гетерохроматину (рис.5). Появу плазмоцитів можна пояснити ймовірним утворенням в процесі інактивації метаболітів Лоратадину субстанцій, які при спонтанній кон'югації з ендогенними протеїнами набирають антигенних ознак і стимулюють В-клітинну ланку імунітету.

Через 30 днів після завершення прийому Лоратадину ультраструктурна організація печінки в основному відповідала такій, як і у попередні терміни дослідів. Поряд із тим, у деяких незмінних гепатоцитах спостерігаються ознаки внутрішньоклітинної регенерації у вигляді різкого збільшення незв'язаних з мембранними структурами полірибосом, що свідчить про зростання потреб таких клітин у різноманітних білках -

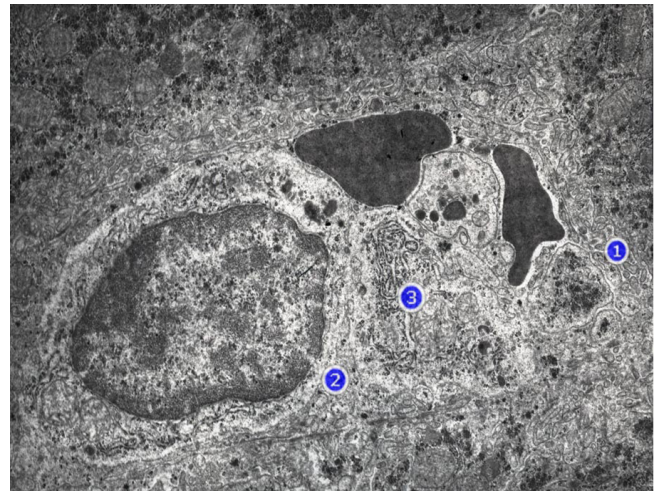


Рис. 4

Ультраструктура печінки білого щура на 10-й день після введення Лоратадину. 1- простір Діссе. 2- фібробластоподібна клітина. 3.- гранулярна ЕПС. Зб.х6000

структурних, ферментних, мембранних. У ядрах гепатоцитів хроматин підлягав максимальній деконденсації, що вказує на посилення транскрипційних процесів з утворенням різних видів РНК, необхідних для білкового синтезу. В цитоплазмі багатьох гепатоцитів зберігалася гіперплазія компонентів гладкої ендоплазматичної сітки, що свідчить про відносну довготривалість метаболізації дериватів Лоратадину.

Суттєвих деструктивних змін мікроциркуляторного русла не виявлено, проте зберігалася ділянки різкого звуження перисинусоїдних просторів з відкладеннями у них тонкофібриляр-

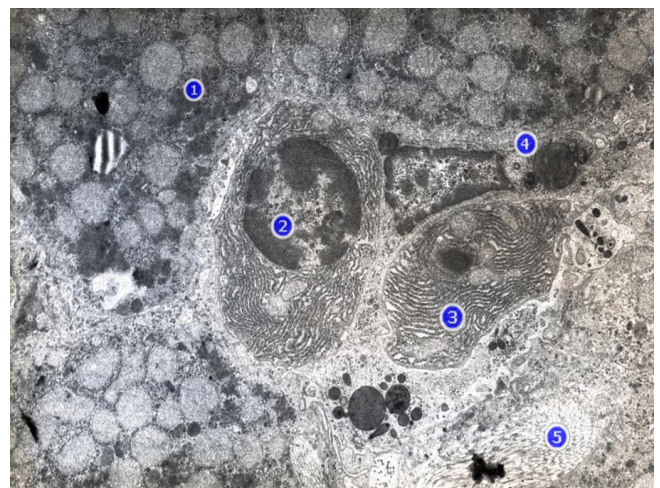


Рис. 5

Ультраструктура печінки білого щура на 20-й день після введення Лоратадину. 1- гепатоцит. 2- плазмоцит. 3- гранулярна ЕПС. 4- клітина Купфера. 5- колагенові фібрили у просторі Діссе. Зб.х4000

них компонентів. Окремі гепатоцити, розташовані поблизу цих ділянок, мали різко просвітлену цитоплазму, у якій, у невеликих кількостях містилися деструктивно змінені мітохондрії. Це свідчить про вичерпання такими клітинами енергетичних ресурсів і, як результат, різке зниження їхніх функціональних можливостей.

Аналізуючи отримані результати в цілому можна дійти висновку, що метаболізм Лоратадину відбувається в печінці. Морфологічними проявами цього є виявлені нами зміни, такі як гіперплазія гладкої ендоплазматичної сітки гепатоцитів на тлі редукції білково-синтетичного апарату, що можна трактувати як перебудову синтетичних функцій у напрямку посилення метаболічної. Виявлені деструктивні зміни мітохондрій свідчать про розбалансування процесів окислення та фосфорилування і зниження рівня синтезу АТФ. Виявлення явищ ліпідної інфільтрації гепатоцитів в умовах накопичення метаболітів Лоратадину з одного боку може свідчити про їхній токсичний вплив, а з другого - про реакцію-відповідь, що спрямована на самозбереження популяції гепатоцитів [16]. Таке припущення підтверджується також і тим, що в критичних ситуаціях печінка може виконувати роль органа імунного захисту [8,10]. В наших досліджах це підтвердилося появою у печінці плазмоцитів - продуцентів імуноглобулінів.

Висновок

Застосування максимальних терапевтичних доз Лоратадину у експерименті веде до змін ультраструктури печінки, які свідчать про посилену інактивацію препарату з одного боку та розвиток супутніх деструктивних процесів з другого. Такі зміни в основному носять транзиторний характер, але можуть бути визначальними у розвитку глибоких незворотних уражень печінки на тлі дії на неї інших гепатотоксичних екзогенних чинників (віруси, наркотичні, психотропні речовини, тощо).

Література

1. Borysova E.O. Antihistamines: safety questions. *Lechebnoe delo*. 2005; 2: 37-43. Russian (Борисова Е.О. Антигистаминные препараты: вопросы безопасности / Е.О.Борисова// Лечебное дело, - 2005. - №2. - С. 37-43).
2. Drogovoz S.M. Toxic effects of H1 histamine receptors blockers and mechanisms of their formation. *Suchasni problemy toksykologii*. 2012; 3-4: 44-48. Russian (Дроговоз С.М. Токсические эффекты блокаторов H1-гистаминовых рецепторов и механизмы их формирования /С.М. Дроговоз, В.Д. Лукьянчук, Б.С. Шейман, А.В. Кононенко// Сучасні проблеми токсикології. - 2012. - №3-4. - С.44-48).
3. Ham A., Cormack D. *Histology*. Moscow. Mir; 1983: Vol.4: pp.165-195 Russian (Хэм А., Кормак Д. Гистология - Москва. Мир, 1983, т.4 : с. 165-195).
4. Holt M.P. Mechanisms of drug-induced liver injury /M.P. Holt, C.Ju// *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. - 2006. - Vol. 8. №1. - P.48-54.
5. Kuntz E., Kuntz H.- D. *Hepatology. Principles and practice* - Berlin: Heidelberg, Springer-Verlag., 2006. - P.542-562.
6. Kuzminov O.B. Evaluation of immune toxic impact of Loratadin in the experiment on laboratory animals. *Eksperymentalna ta klinichna fiziologiya i biochymiya*. 2014; 1: 43-46 Ukrainian (Кузьмінов О.Б. Оцінка імунотоксичного впливу Лоратадину в умовах експерименту на лабораторних тваринах /О.Б. Кузьмінов// Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - 2014. - №1. - С.43-46).
7. Lee W.M. Drug - induced hepatotoxicity /W.M. Lee// *N. Engl. J. Med*. - 2003. - Vol.349, №5. - P.127-129.
8. Makogon N.V. Proliferation and death of liver mononuclear cells of mice under conditions of immune destruction caused by the introduction Concanavalin A or antibodies against liver. *Fiziol. Zhurnal*. 2008; 54,6: 49-57. Ukrainian (Макогон Н.В. Проліферація та загибель мононуклеарних клітин печінки мишей за умов їх імунного ураження, викликаного введенням Конканаваліну А або проти печінкових антитіл /Н.В. Макогон, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна [т.ін]//Фізіол. журн. - 2008. - т.54.№6. - С.49-57).
9. Millonig G. Advantages of a phosphate buffer for OsO4 solutiois in Kiration /G. Millonig// *J. Appl. Physiol*. - 1961. - 32. - 1637р.
10. Rocanelly V. The liver as in immunological organ /V. Rocanelly, B. Regerman// *Hepatology*. - 2006. - 43, №2. - P.554-562.
11. Shvets N.Y. Drug-induced liver damage associated with use of antibiotics. *Suchasna gastroenterologiya*. 2009; 3(47): 43-49. Russian (Швец Н.И. Лекарственные поражения печени, связанные с приемом антибиотиков / Н.И. Швец, Т.М. Бенца// Сучасна гастроентерологія. - 2009. - №3(47). - С.43-49).
12. Shyryaeva A.P. The state of the mitochondrial respiratory chain in rats with experimental toxic hepatitis. *Cytologiya*. 2007; 49,2: 125-132. Russian (Ширяева А.П. Состояние дыхательной цепи митохондрий крыс с экспериментальным токсическим гепатитом /А.П. Ширяева, Е.В. Байдюк, А.В. Аркадьева [и др.]// Цитология. - 2007. - Т.49, №2. - С.125-132).
13. Stempak J. G. An improved staining method for electron microscopy /J. G. Stempak, R. T. Ward// *J.Cell.Biol*. - 1964.- 22. - P.697-701.
14. Victorov A.P. Analysis of the side effects of Cefalosporine group of antibiotics in Ukraine in 2005. *Semeynaya medycyna*. 2006; 3: 42-43. Russian (Викторов А.П. Анализ побочных действий антибиотиков группы цефалоспоринов в Украине по итогам 2005 года /А.П. Викторов,

- К.А. Посохова, Е.В. Матвеева, И.А. Логвина// Семейная медицина. - 2006. - №3. - С. 42-43).
15. Weakley B.S. Electron microscopy for beginners/ B.S.Weakley B.S.//Moscow.Mir. 1975. - 314p. Russian (Уикли Б.С. Электронная микроскопия для начинающих /Б.С. Уикли// Москва: Мир. 1975. - 314с.).
16. Yvashkin V.T. Drug - induced liver injury: universal structural markers. Rossiyskiy zhurnal gastroenterology, gepatology, koloproktology. 2009; 12,2: 20-29. Russian (Ивашкин В.Т. Лекарственно-индуцированное поражение печени: универсальные структурные маркеры /В.Т. Ивашкин, Г.Н. Непомнящих, С.В. Айдагулова [и др.]// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, - 2009. - Том 12, №2. - С.20-29).