

ОСОБЛИВОСТІ ФОСФОЛІПІДНОГО СКЛАДУ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ГОСТРОМУ ФЛУКОНАЗОЛОВОМУ ГЕПАТИТІ

С. М. Солтик

Одеський національний медичний університет

Вступ

Медикаментозні ураження печінки є однією з найактуальніших проблем сучасної медицини. Частоту лікарських уражень печінки точно визначити практично неможливо. За даними різних авторів, їх можна спостерігати при медикаментозній терапії у 7-15 % пацієнтів, в США вони є причиною 2,5-3 % всіх випадків жовтяниці, що виникла гостро. В Європі цей показник складає 3-4 % [4, 8, 9]. Такі ураження часто не діагностуються, тому що симптоми основного захворювання, з приводу якого проводилося лікування, маскують прояви небажаної дії ліків. Діапазон клінічних проявів лікарських гепатитів різноманітний - від незначного підвищення активності амінотрансфераз, без чітких клінічних проявів, до блискавичних форм гепатиту і розвитку цирозу [7, 8].

Сьогодні питання патогенезу, клініко-лабораторної і морфологічної діагностики лікарських гепатитів залишаються не до кінця відпрацьованими. Тому виявлення лікарських уражень печінки часто стає можливим лише на стадії розгорнутої клінічної картини, що супроводжується жовтяницею, гепатомегалією. Враховуючи той факт, що морфологічна картина печінки при лікарському гепатиті є схожою з такою при вірусних гепатитах, алкогольному гепатиті, первинному біліарному цирозі печінки [1, 2, 4], ми вважали за доцільне дослідити зміни, які відбуваються при експериментальному гострому медикаментозному гепатиті.

Флуконазол є представником групи азолів - найбільш розповсюджених антимікотиків. Препарат належить до триазолів, які містять 1 п'ятичленний гетероцикл з трьома атомами азо-

ту і використовується для системного лікування. Флуконазол є засобом вибору при захворюваннях, спричинених *Candida albicans*, рядом штамів *Candida parapsilosis*, при висівкоподібному лишаю. Справляє фунгістатичну дію на збудників глибоких мікозів: *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Pseudallescheria boydii*. Привертає до себе увагу тривалістю лікування флуконазолом. Так, при кандидозі шкіри вона складає 2-6 тижнів, при кандидурії, кандидозному езофагіті, бронхолегеневому кандидозі - 14-30 днів. Найбільш тривалий період застосування препарату при оніхомікозі пальців рук - 3-6 місяців і при ураженні нігтів пальці ніг - 6-12 місяців, до заміщення інфікованого нігтя.

Відомо, що лікування флуконазолом може супроводжуватися такими небажаними ефектами з боку травної системи як порушення апетиту, біль в животі, метеоризм, нудота, блювота, діарея, закріп, підвищення активності амінотрансфераз і лужної фосфатази, гіпербілірубінемія, холестаза.

Сприймаючи до уваги важливе значення фосфоліпідів (ФЛ) у механізмах формування клітинних мембран [3, 5, 6], на наш погляд, є доцільним провести їх дослідження, визначити залежність між ними, що дозволить більш глибоко розкрити патогенетичні механізми формування змін, які відбуваються в гепатоцитах. Однак, до теперішнього часу модель гострого медикаментозного гепатиту, спричиненого флуконазолом не розроблена. Тому ми вважали необхідним розробити модель експериментального флуконазолового гепатиту і вивчити порушення, що відбуваються у фосфоліпідному шарі біомембран еритроцитів, які, як відомо, відображають зміни у печінкових клітинах.

Знання основних ланок патогенезу лікарського гепатиту дозволить, на наш погляд, не лише своєчасно його діагностувати, але й знайти нові підходи до корекції патологічного процесу, попередити виникнення можливих ускладнень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами: робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією Одеського національного медичного університету на тему: "Взаємозв'язок патологічних і імунологічних змін при гепатитах різної етіології, TORCH-інфекціях та їх корекція" (№ держреєстрації 01008001104).

Метою роботи було вивчення особливостей фосфоліпідного складу мембран еритроцитів у щурів з гострим токсичним гепатитом, обумовленим флуконазолом.

Матеріал і методи дослідження

Експериментальні дослідження проведені згідно біотичних вимог на 90 статевозрілих щурах-самцях масою 180 - 200 грамів розведення віварію Одеського національного медичного університету. Тварини утримувались в звичайних умовах на стандартному харчовому раціоні. Гострий токсичний гепатит викликали шляхом внутрішньоочеревинного введення 0,2 % розчину флуконазолу у дозі 3 мг/кг протягом 5 днів. Після введення флуконазолу тварин брали до експерименту через 24, 48, і 120 годин. Об'єктом для досліджень були еритроцити крові та печінка тварин.

Для проведення морфологічного дослідження після забою тварин вилучалася печінка і фіксувалася в 10 % нейтральному формаліні. Після заливки у парафін виготовлялись гістологічні зрізи, які фарбувались гематоксиліном і еозином, а також за ван Гізон. PAS - позитивні речовини визначались за допомогою ШІК - реакції за Шабадаш. Жири виявлялись на заморожених зрізах пофарбованих Суданом III.

Для виділення фракції ФЛ використовували загальну ліпідну фракцію, вилучену із тканин за методом Фолча. Виділення фракції фосфоліпідів здійснювали за допомогою методу тонкошарової хроматографії. Розподіл ФЛ на окремі фракції проводили на скляних пластинках розміром 20x20 см із застосуванням 2 систем розчинників. Такий метод дозволяв розділити ФЛ на наступні фракції: лізофосфатидилхолін (ЛФХ), сфінгомієлін (СФМ), фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноланін (ФЕА), фосфатадилсерин (ФС) та інші. Кількість ФЛ оцінювали за реакцією взаємодії неорганічного фосфату з молібдатом амонію.

Для оцінки і співставлення отриманих результатів проведено дослідження 30 інтактних тварин.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали на персональному комп'ютері Intel Celeron 2300 за допомогою програм Microsoft Office 2000, Statistica* for Windows. Бази даних формували в таблицях Microsoft Excel.

Отримані результати та їх обговорення

Морфологічні зміни в печінці після п'ятиденного введення флуконазолу характеризувалися вираженими порушеннями гемодинаміки, дистрофічними змінами гепатоцитів і вогнищевими некротичними процесами.

Через 24 год після початку експерименту у сироватці крові тварин, яким вводили флуконазол встановлено підвищення активності АлАТ і АсАТ. Так, показник активності АлАТ у середньому дорівнював $(75,32 \pm 4,48)$ ммоль/г.л, а АсАТ - $(189,51 \pm 8,61)$ ммоль/г.л, що, відповідно, в 1,4 і 1,3 разу перевищувало показники інтактних щурів. На 5 добу введення токсиканту активність АлАТ складала $(122,74 \pm 10,08)$ ммоль/г.л, а активність АсАТ - $(232,43 \pm 10,58)$ ммоль/г.л. Такі результати були вище за фізіологічні, відповідно, у 2,2 і 1,6 разу, що свідчить на користь розвитку гострого токсичного гепатиту.

Як видно з таблиці 1, концентрація загальних ФЛ еритроцитах щурів протягом всього періоду спостереження поступово знижалася. Найменший рівень загальних ФЛ відмічений через 72 години від початку експерименту. Отримане значення дорівнювало $(1,83 \pm 0,12)$ ммоль/л і було в 1,4 разу нижче за результат інтактних тварин ($p < 0,05$).

Таблиця 1
Динаміка вмісту загальних ФЛ, ХС і співвідношення ХС/ФЛ в еритроцитах щурів при токсичному гепатиті, викликаному флуконазолом ($M \pm m$)

Умови експерименту	Загальні ФЛ, ммоль/л	Загальний ХС, ммоль/л	ХС/ФЛ
24 години (n=30)	$2,16 \pm 0,15^*$	$3,01 \pm 0,12^*$	$1,33 \pm 0,04^*$
48 годин (n=30)	$2,15 \pm 0,08^*$	$3,70 \pm 0,13^*$	$1,72 \pm 0,09^*$
120 годин (n=30)	$1,83 \pm 0,12^*$	$4,68 \pm 0,20^*$	$2,56 \pm 0,11^*$
Інтактні тварини (n=30)	$2,57 \pm 0,11$	$2,43 \pm 0,12$	$0,85 \pm 0,03$

Примітка. * - вірогідна різниця порівняно з показниками інтактних тварин ($p < 0,05$).

На відміну від загальних ФЛ кількість загального ХС підвищувалася (див. табл. 1). Так, на першу добу концентрація загального ХС в мембранах еритроцитів тварин збільшувалася в

1,2 разу, на другу - в 1,5 разу, на п'яту - в 1,9 разу порівняно з інтактними щурами ($p < 0,05$). Такі зміни вмісту загальних ФЛ і ХС відобразилися на показнику коефіцієнту співвідношення ХС/ФЛ (див. табл. 1). Якщо через 24 години після введення флуконазолу значення ХС/ФЛ перевищувало фізіологічний результат в 1,6 разу, то через 48 годин - вже в 2,0 рази. Найвищий показник ХС/ФЛ ($2,56 \pm 0,11$) відзначений через 120 годин після затравки тварин, коли відмічали найбільшу кількість загального ХС і найменшу концентрацію загальних ФЛ. Тобто, введення щурам флуконазолу призводило до певних змін концентрації загальних ФЛ і загального ХС, яке, на наш погляд, може привести до порушення формування ліпідного бішару, зсувів у кількісному вмісті та питомої ваги окремих фракцій ФЛ, негативно відобразитися на структурі і функції клітинних мембран.

Результати дослідження вмісту окремих фракцій ФЛ в еритроцитах щурів під впливом флуконазолу представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Динаміка вмісту фосфоліпідних фракцій (за ліпідним фосфором, мг/100 мл еритроцитів) в еритроцитах щурів при токсичному гепатиті, викликаному флуконазолом ($M \pm m$)

Показники	Умови експерименту			Інтактні тварини (n=30)
	24 години (n=30)	48 годин (n=30)	120 годин (n=30)	
Загальні ФЛ	213,97 ± 5,71*	194,96 ± 9,67*	152,14 ± 8,21*	242,08 ± 7,83
ЛФХ	29,72 ± 1,09*	41,00 ± 1,13*	43,30 ± 1,33*	23,71 ± 1,09
СФМ	44,98 ± 2,16	52,17 ± 1,08*	55,16 ± 1,59*	42,79 ± 1,63
ФХ	74,82 ± 5,64*	57,35 ± 3,94*	29,06 ± 2,36*	98,15 ± 8,56
ФЕА	38,57 ± 2,41*	29,77 ± 1,26*	15,54 ± 0,78*	52,84 ± 2,27
ФС	8,13 ± 0,67*	8,85 ± 0,72	5,482 ± 0,03*	9,63 ± 0,41
ФФК	11,21 ± 0,29*	5,94 ± 0,26*	3,56 ± 0,09*	14,96 ± 1,58
ФХ/СФМ	1,66 ± 0,04*	1,10 ± 0,03*	0,52 ± 0,01*	2,29 ± 0,03
ФЕА/ФС	4,74 ± 0,02*	3,36 ± 0,03*	2,63 ± 0,02*	5,49 ± 0,03
ФЕА + ФС / ФХ + СФМ	0,39 ± 0,02*	0,35 ± 0,01*	0,25 ± 0,02*	0,44 ± 0,01
ФЕА + ФХ / ЛФХ + СФМ	1,52 ± 0,03*	1,01 ± 0,01*	0,45 ± 0,01*	2,27 ± 0,03

Примітка: * - вірогідна різниця порівняно з показниками інтактних тварин ($p < 0,05$).

Так, вміст ЛФХ і СФМ підвищувався протягом всього періоду спостереження. Якщо на 1 добу експерименту кількість ЛФХ і СФМ в еритроцитах щурів, яким вводили флуконазол суттєво не відрізнялася від показників інтактних тварин, то на 2 добу отримані результати, відповідно, в 1,7 і 1,3 разу перевищували фізіологічні. На 5 добу від початку експерименту кратність збільшення концентрації ЛФХ складала 1,8, а СФМ - 1,4 ($p < 0,05$). Як відомо, високий вміст ЛФХ вказує на наявність мембранодеструктивних процесів. Тому збільшення кількості важкоокислювальних фракцій ФЛ - ЛФХ і СФМ, на наш погляд, можна розглядати як показники виразності перебігу деструктивного процесу в еритроцитарних мембранах щурів при гепатиті, обумовленому флуконазолом.

Кількість інших фракцій ФЛ в еритроцитах щурів з токсичним гепатитом набувала значного зменшення (див. табл. 2). Однак, ступінь зниження вмісту ФХ, ФЕА, ФС і ФФК протягом спостереження був різним. Так через 24 години від початку експерименту кількість ФХ і ФФК знижувалася в 1,3 разу, ФЕА в 1,4 разу, ФС - в 1,2 разу. Через 48 годин отримані результати: ФХ в 1,7 разів, ФЕА в 1,8 разу, ФС в 1,2 разу, ФФК в 2,5 разу були нижче за відповідні показники інтактних тварин. Через 120 годин кратність зменшення вмісту ФХ складала 3,4, ФЕА - 3,4, ФС - 1,7, ФФК - 4,2.

ФХ являється універсальним будівельним блоком для клітинних мембран, в тому числі й мембран гепатоцитів. Сучасними теоретичними і клінічними дослідженнями встановлено, що ФХ захищає печінку від ушкоджуючої дії цілого ряду токсичних речовин, які здатні руйнувати клітинні мембрани. Тому зниження вмісту ФХ, поряд із зменшенням кількості інших легкоокислювальних фракцій ФЛ, на наш погляд, може свідчити на користь недостатності компенсаторних механізмів підтримки морфофункціонального гомеостазу клітинних мембран, підвищення їхньої проникності або деградації ліпідного бішару.

Компенсація недостатності ФХ у зовнішньому моношарі мембран еритроцитів здійснювалася за рахунок підвищення кількості СФМ. Під час розрахунку коефіцієнту ФХ/СФМ, що характеризує перерозподіл фосфоліпідних фракцій всередині мембранного бішару встановлена тенденція до його зниження (див. табл. 2) у міру прогресування гострого токсичного гепатиту. Найменший його

показник ($0,52 \pm 0,01$) встановлений на 5 добу проведення експерименту і був у 4,4 разу менше, ніж у інтактних тварин ($p < 0,05$). Тобто, відбувається зниження рідинних властивостей мембран еритроцитів (у мембранах з високим вмістом ХС низький вміст води) і підвищення мікров'язкості ліпідного бішару.

Цікавими, на наш погляд, були результати розрахунку співвідношення внутрішнього моношару ФЛ біомембран - ФЕА і ФС. Отримані результати вказують на дискоординацію співвідношення ФЕА/ФС (за рахунок виразнішого зменшення вмісту ФЕА) протягом всього періоду спостереження, що може свідчити про наявність структурно-функціональних порушень усередині бішару еритроцитарної мембрани під впливом флуконазолу.

Про стан рідинності біомембран еритроцитів судили по показнику співвідношення ФЕА+ФС/ФХ+СФМ, що являє собою співвідношення ФЛ внутрішнього моношару (ФЕА та ФС) і ФЛ зовнішнього моношару (ФХ і СФМ) ліпідного бішару мембран еритроцитів. Зниження значення цього співвідношення (див. табл. 2) в 1,8 разу через 120 годин після введення флуконазолу надає можливість зробити висновок про наявність певної асиметрії, що обумовлює підвищення насиченості ліпідного бішару, втрату мембраною води та збільшення її мікров'язкості.

В біомембранах еритроцитів також зменшувався коефіцієнт окислюваності: співвідношення легкоокислювальних фракцій ФЛ до важкоокислювальних. Так, через 24 години від введення флуконазолу значення ФЕА+ФХ/ЛФХ+СФМ зменшувалося в 1,5 разу, через 48 годин - в 2,4 разу, через 120 годин - в 5 разів порівняно з інтактними щурами ($p < 0,05$). Такі зміни можуть свідчити про підвищення мікроцильності та жорсткості мембран еритроцитів щурів з токсичним гепатитом, яке призводить до порушення проникності, доступу субстрату до мембранних ферментів.

У результаті проведених досліджень встановлено, що у щурів, яким вводили флуконазол відбувалися не лише зміни вмісту окремих фракцій ФЛ в еритроцитах, але й також їхній відсотковий перерозподіл. Якщо у інтактних тварин частка ФХ була найбільшою і складала 40,5%, то на п'яту добу експерименту у щурів, яким вводили флуконазол вона складала лише 19,1%. Відзначено збільшення частини ЛФХ до 28,5 % (проти 9,8% у інтактних

тварин) і СФМ - 36,3 % (проти 17,7% у інтактних тварин). Зменшувався відсоток вмісту ФЕА до 10,2 % (проти 21,8% у інтактних тварин) і ФФК до 2,3 % (проти 6,2% у інтактних тварин).

Таким чином, введення флуконазолу призводить до дистрофічних, некротичних і дисциркуляторних змін в печінці, супроводжується підвищенням активності амінотрансфераз. Також спостерігаються значні зміни кількості загальних ФЛ, порушується динамічна система вмісту окремих фракцій ФЛ, що призводить до морфофункціональних розладів у мембранах еритроцитів, порушення їх проникності та пригнічення активності ферментів, локалізованих у біомембранах. Такі порушення являються складовою ланкою патогенезу гострого гепатиту, що виникає під впливом флуконазолу. Подальші дослідження цього напрямку дозволять підвищити ефективність існуючого лікування гострих токсичних гепатитів, запобігти розвитку можливих ускладнень.

Література

1. Бабак О. Я. Лекарственные поражения печени: вопросы теории и практики / О. Я. Бабак // *Ліки України*. - 2008. - № 2. - С. 96-101.
2. Бондарев Л. С. Современный взгляд на проблему лекарственных гепатитов / Л. С. Бондарев, А. А. Заплатная // *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. - 2008. - Т. 9, № 2. - С. 226-229.
3. Клеменова И. А. Клинико-патогенетическая роль структурно-функциональной организации плазматических мембран при псориазе : автореф. дис. на соиск. уч. степени д-ра мед. наук: спец. 14.00.11 "Кожные и венерические болезни" / И. А. Клеменова. - М., 2008. - 40 с.
4. Кушнир И. Э. Лекарственные поражения печени / И. Э. Кушнир // *Мистецтво лікування*. - № 8 (34). - С. 43-47.
5. Лесникова Л. Н. Стрессорные изменения физиологических свойств эритроцитов и их коррекция с помощью экстракта из туники асцидии пурпурной : автореф. дис. на соиск. уч. степени канд. мед. наук: спец. 03.00.13 "Физиология" / Л. Н. Лесникова - Владивосток, 2006. - 22 с.
6. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией

організма: контури проблеми / В. В. Новицький, Н. В. Рязанцева, Е. А. Степовая [и др.] // Бюллетень сибірської медицини. - 2006. - № 2. - С. 62-67.

7. Полуніна Т. Е. Лекарственные поражения печени / Т. Е. Полуніна // Лечащий врач. - 2005. - № 3. - С. 69-72.

8. Степанов Ю. М. Лекарственные поражения печени: патогенез, классификация, диагностика, лечение / Ю. М. Степанов, А. Ю. Филиппова, И. Н. Кононов // Мистецтво лікування. - 2005. - № 3 (19). - С. 46-53.

9. Bataller R. Liver fibrosis / R. Bataller, D. A. Brenner // J. Clin. Invest. - 2005. - № 115 (2). - P. 209-218.

Резюме

Солтык С. М. Особливості фосфоліпідного складу мембран еритроцитів при гострому флюконазоловому гепатиті.

Експериментальні дослідження проведені на 90 щурах-самцях, яким внутрішньоочеревинно вводили 0,2 % розчин флюконазолу протягом 5 днів. У мембранах еритроцитів тварин встановлено зниження кількості загальних фосфоліпідів, перерозподіл відносної кількості окремих фракцій фосфоліпідів, а також збільшення вмісту загального холестерину.

Ключові слова: флюконазоловий гепатит, фосфоліпіди мембран еритроцитів, щури.

Резюме

Солтык С. М. Особенности фосфолипидного состава мембран эритроцитов при остром флюконазоловом гепатите.

Экспериментальные исследования проведены на 90 крысах-самцах, которым внутривентрально вводили 0,2 % раствор флуконазола в течение 5 дней. В мембранах эритроцитов животных установлено снижение количества общих фосфолипидов, перераспределение относительного количества отдельных фракций фосфолипидов, также увеличение содержания общего холестерина.

Ключевые слова: флуконазоловый гепатит, фосфолипиды мембран эритроцитов, крысы.

Summary

Soltick S. M. Peculiarities of phospholipid state of erythrocytes' membranes in acute fluconazolium hepatitis.

Experimental studying are made on 90 rats-males, that are injected intraperitoneal by 0,2 % oil solution of fluconazolium during 5 days. Lower level of general phospholipids, changes of specific parts of phospholipid fractions and higher level of general cholesterol are found in erythrocytes' membranes of the animals.

Key words: fluconazolium hepatitis, phospholipides of erythrocytes' membranes, rats.

Рецензент: д. мед. н., проф. Терьшин В. О.

УДК 616.895.4-092:612.012.1.014

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ТА КОНЦЕНТРАЦІЇ "СЕРЕДНІХ МОЛЕКУЛ" У ХВОРИХ НА НЕАЛКОГОЛЬНИЙ СТЕАТОГЕПАТИТ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ЕУКАРБОНУ

В. О. Терьшин, В. І. Сідорова

Луганський державний медичний університет

Вступ

За останні десятиріччя в Україні та інших країнах СНД відмічається суттєве підвищення частоти захворюваності на хронічну патологію печінки та жовчовивідних шляхів, та, поперед усього, на неалкогольний стеатогепатит (НАСГ) [17]. Відомо, що питання стосовно тактики лікування та медичної реабілітації хворих на хронічну патологію гепатобіліарної системи (ГБС) у вигляді НАСГ є вельми складним внаслідок необхідності застосування значної кількості препаратів, що впливають на різні ланки патогенезу сполученої патології та водночас уникнення негативного впливу на паренхіму печінки за рахунок поліпрагмазії [7]. Протягом багатьох років ми аналізуємо порівняльну ефективність різноманітних підходів до лікування та медичної реабілітації хворих на НАСГ. При цьому нашу увагу привернула можливість використання у таких хворих комбінованих препаратів, які сприяють покращенню імунних та метаболічних процесів у організмі, а також функціонального стану печінки та ГБС в цілому, як це підкреслюють і інші автори [3, 8]. При цьому серед препаратів, які використовують при лікуванні патології ГБС, суттєве місце належить комбінованим фітозасобам за полівалентністю фармакологічної дії. В цьому плані нашу увагу привернула можливість використання у комплексі медичної реабілітації хворих з НАСГ сучасного комбінованого фітозасобу еукарбону [4]. Еукарбону поєднує у себе водночас властивості ентеросорбенту та фітопрепарату [18]. Еукарбон зареєстрований в Україні в якості лікарського препарату (реєстраційне посвідчення № 3460) та дозволений до клінічного використання Наказом МОЗ України № 427 від