

УДК 612.35:612.36:612.015.81

© Ж.В. Картіфузова¹, Є.М. Решетнік¹, С.І. Павлович², А.С. Пустовалов¹, М.Г. Матвієнко¹,
М.Ю. Макачук¹Біологічний факультет Ки вського національного університету імені Тараса Шевченка¹
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України²**ВПЛИВ ДАЛАРГІНУ НА МОРФОСТРУКТУРУ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ПІДГОСТРОГО АЛКОГОЛЬНОГО ГЕПАТИТУ**

ВПЛИВ ДАЛАРГІНУ НА МОРФОСТРУКТУРУ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ПІДГОСТРОГО АЛКОГОЛЬНОГО ГЕПАТИТУ – Досліджено вплив синтетичного аналогу лей-енкефаліну даларгіну на морфометричні показники тканини печінки і на активність ферментів сироватки крові щурів при змодельованому підгострому алкогольному гепатиті. Встановлено, що в умовах алкогольного навантаження даларгін усуває негативні ефекти етанолу на площу перерізу клітин центральнобулярно та перипортально зон, при цьому збільшується активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та гамма-глутамілтрансферази сироватки крові щурів.

ВЛИЯНИЕ ДИЛАРГИНА НА МОРФОСТРУКТУРУ ТКАНИ ПЕЧЕНИ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПОДОСТРОГО АЛКОГОЛЬНОГО ГЕПАТИТА – Исследовано влияние синтетического аналога лей-энкефалина даларгина на морфометрические показатели ткани печени и на активность ферментов сыворотки крови крыс при смоделированном подостром алкогольном гепатите. Установлено, что в условиях алкогольной нагрузки даларгин устраняет негативные эффекты этанола на площадь сечения клеток центральнобулярной и перипортальной зон, при этом увеличивается активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и гамма-глутамилтрансферазы сыворотки крови крыс.

THE INFLUENCE OF DALARGIN ON MORPHOSTRUCTURE LIVER AND THE SERUM FERMENTS ACTIVITY OF RATS DURING EXPERIMENTAL NON-ACUTE ALCOHOL-INDUCED HEPATITIS – The influence of the synthetic leu-enkephaline's analogue dalargin on the ferments activity of the rats serum and liver tissue morphometric characteristics in not acuteness alcohol liver damage has been investigated. It was revealed that the dalargin alters ethanol's influence on the cross-sectional area of the hepatocytes centrolobular and periportal zone. Activity of the alaninaminotransferase, aspartataminotransferase, gammaglutamyl- transferase in the rats' serum increases under dalargin and the ethanol influence.

Ключові слова: алкогольний гепатит, морфоструктура печінки, даларгін, аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, гамма-глутамілтрансфераза.

Ключевые слова: алкогольный гепатит, морфоструктура печени, даларгин, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, гамма-глутамилтрансфераза.

Key words: alcohol hepatitis, dalargin, morphostructure liver, alaninaminotransferase, aspartataminotransferase, gammaglutamyltransferase.

ВСТУП Встановлено, що прийнятий у медичній практиці синтетичний препарат даларгін використовується у клініці завдяки його репаративним і регенеративним властивостям щодо ушкоджених тканин органів травного каналу, при цьому відмічаються і його гепатопротективні властивості [1]. Так, даларгін зменшує рівень малонового діальдегіду за умов експериментально викликаного посилення його утворення в клітинах печінки [2]. Він виявляє антиоксидантну дію

в умовах гострого холестази, яка призводить, ймовірно, до стабілізації клітинних мембран гепатоцитів, наслідком чого є зменшення вимивання в кров гепатоспецифічних ферментів і збереження їх у клітинах печінки [3, 4, 5]. Особливо актуальним є вивчення ефектів даларгіну за умов підгострого алкогольного ураження печінки. Відомо, що печінка є головним органом, в якому відбувається біотрансформація етанолу: більше 80 % одноразово введено дози алкоголю підлягає перетворенню в печінці [6, 7, 8], а алкогольна хвороба печінки належить до найбільш актуальних проблем гепатології [8, 9, 10].

Метою дослідження було вивчення впливу синтетичного аналога лей-енкефаліну опію дного гексапептиду даларгіну на морфоструктуру тканини печінки та на активність деяких ферментів сироватки крові щурів у нормі та за умов експериментального підгострого алкогольного ураження печінки.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Досліди проведені на білих щурах (самцях) масою 170-230 г із дотриманням вимог Європейсько конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують із експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Моделювання експериментального підгострого алкогольного ураження печінки щурів здійснювали за методикою [11]. Впродовж 7 діб контрольна група тварин отримувала внутрішньошлунково воду (7 мл/кг) та фізіологічний розчин у вигляді ін'єкцій внутрішньочеревно. Друга група тварин отримувала внутрішньошлунково етанол (40 %) у дозі 7 мл/кг та внутрішньочеревно фізіологічний розчин. Синтетичний опію дний гексапептид даларгін у дозі 10 мкг/кг вводили тваринам третьої групи внутрішньочеревно разом із внутрішньошлунковим введенням води у дозі 7 мл/кг. Четверта група отримувала даларгін (10 мкг/кг) внутрішньочеревно та етанол (40 %) у дозі 7 мл/кг внутрішньошлунково. Для наркотизації тварин використовували тіопентал натрію у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно. Для морфологічного дослідження кусочки печінки після фіксації 10 % нейтральним формаліном оброблювали за загальноприйнятою гістологічною методикою і заливали у парафін. Зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином і піддавали світлооптичному дослідженню. Проводили морфометричний аналіз з використанням комп'ютерно програми Scione Images та визначенням наступних показників: діаметру капілярів, площі перерізу ядер гепатоцитів та площі клітин, розташованих у центральнобулярній і перипортальній зонах печінково часточки [12]. Оскільки у печінці знаходиться велика кількість неспецифічних ферментів: аланінамінотрансфераза (АлАТ), аспартатамінотрансфераза (АсАТ), гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ), лужна фос-

фатаза (ЛФ) тощо, які мають важливе значення в лабораторній діагностиці алкогольного захворювання, для дослідження стану печінки використовували кінетичний колориметричний метод щодо визначення активності цих ферментів в сироватці крові [6, 7, 8]. Активність ферментів сироватки крові виражали в міжнародних одиницях активності, О/л (1 мкат/л = 60 О/л). Експериментальні дані оброблені за допомогою пакету програм STATISTICA 6.0 (фірма Stat Soft, USA). Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями досліду при $p < 0,05$ [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ При гістологічному дослідженні за умов введення етанолу ексудативні та проліферативні зміни у па-

ренхімі відповідали морфологічній картині гепатиту. Спостерігалися дисциркуляторні порушення з розширенням та повнокрів'ям судин різних калібрів, периваскулярними набряками. Відмічалися проліферація та гіпертрофія зірчастих ретикулоендотеліоцитів, розширення навколосинусо дальних просторів, зерниста та місцями вакуольна дистрофія гепатоцитів, що було більш характерним для портальних зон печінки. Зустрічалися клітини печінки з ознаками жирової дистрофії та незначні локуси з цитолізом та некробіозом гепатоцитів. Місцями у стромі виявлялися незначні лімфогістіоцитарні інфільтрати з домішками поодиноких поліморфноядерних лейкоцитів, еозинофілів та плазмоцитів (рис.1,а).

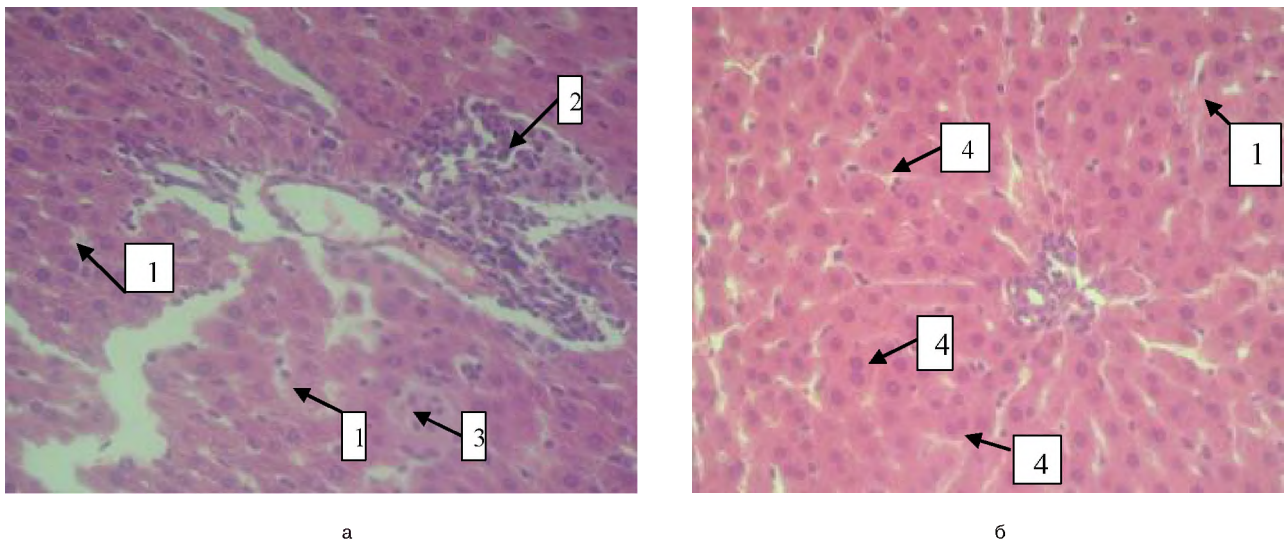


Рисунок 1. Тканина печінки щурів з експериментальним алкогольним гепатитом (а) та при введенні даларгіну (б): 1 – жирова дистрофія, 2 – лейкоцитарні інфільтрати, 3 – дрібновогнищевий некроз, 4 – двоядерні гепатоцити. Забарвлення гематоксилін-еозином, окуляр x 10, об'єктив x 40.

При морфометричному дослідженні препаратів тканини печінки за умов введення етанолу виявлялося зменшення площі перерізу гепатоцитів та x ядер у центролобулярній зоні. Аналогічно зменшувалася площа перерізу гепатоцитів та x ядер у перипортальній зоні. Свідченням порушення мікроциркуляції є зменшення діаметру капілярів центролобулярно зони печінки алкоголізованих щурів (табл. 1). Це може вказувати на деяке пригнічення метаболічно активності клітин печінки, зниження інтен-

сивності процесів транскрипції, а отже дозволяє припустити наявність депресії функціонально активності печінки у тварин з тижневим алкогольним навантаженням.

Введення даларгіну порівняно з контролем викликало незначний набряк паренхіми печінки та дистрофічні зміни окремих гепатоцитів, посилення лімфогістіоцитарно інфільтрації. Переважно за ходом портальних трактів спостерігалися незначні локуси базофільно забарвлених клітин печінки.

Таблиця 1. Морфометричні показники тканини печінки щурів під впливом даларгіну у нормі та при ді етанолу ($M \pm m$, $n=32$)

Показники	Контроль	Етанол	Вода+даларгін	Етанол+даларгін
Діаметр капілярів перипортально зони, мкм	5,49±0,14	5,03±0,12	5,97±0,22 ¹	5,22±0,18
Діаметр капілярів центролобулярно зони, мкм	7,6±0,17	6,75±0,17 ¹	5,59±0,26 ¹	5,95±0,18 ^{1,2}
Площа перерізу клітин центролобулярно зони, мкм ²	208,4±3,67	184,03±2,51 ¹	214,38±4,51	211,04±4,00 ²
Площа перерізу ядер клітин центролобулярно зони, мкм ²	47,32±1,40	41,59±1,04 ¹	39,2±1,71 ¹	41,11±1,74 ¹
Площа перерізу клітин перипортально зони, мкм ²	205,8±3,8	199,57±2,57	199,8±4,20	228,01±3,98 ^{1,2}
Площа перерізу ядер клітин перипортально зони, мкм ²	46,37±0,81	41,83±0,58 ¹	40,87±0,94 ¹	40,15±0,78 ¹

Примітки: ¹ – $p < 0,05$ відносно контрольної групи; ² – $p < 0,05$ відносно групи з етанолом.

Під дією даларгіну зафіксовано достовірне збільшення діаметру капілярів перипортальної зони, в той час як у центролобулярній зоні спостерігалось зменшення діаметру капілярів відповідно до контролю. Спостерігалось також достовірне зменшення площі перерізу ядер клітин у центролобулярній та у перипортальній зонах порівняно з контролем (табл. 1). Отже, введення даларгіну не викликало таких морфометричних змін тканини печінки, які б вказували на інтенсифікацію функціональної активності.

Спільне введення шурам етанолу і даларгіну призводило до незначного зменшення ураження печінки, викликаного етанолом. Реєструвалося збільшення кількості двоядерних та багатоядерних гепатоцитів, що свідчило про посилення регенераторних процесів у печінці (рис. 1,б). Даларгін за умов алкогольного навантаження усував пригнічуючий вплив етанолу на клітини центролобулярно та перипортальної зони. Виявлено, що площа перерізу клітин перипортальної зони достовірно збільшувалася щодо контролю та щодо етанолу, а площа перерізу клітин центролобулярно зони збільшувалася порівняно з дією лише етанолу (табл. 1). Слід відзначити, що при введенні даларгіну на тлі алкогольного навантаження зменшувалась діаметр капілярів центролобулярно зони, а та-

кож площа перерізу ядер клітин перипортально та центролобулярно зон печінки, але збільшувалася, практично повертаючись до контрольних значень, площа перерізу клітин цих зон (табл. 1).

Встановлено, що тижневе внутрішньошлункове введення етанолу викликало у тварин зростання активності АлАТ, ЛФ, ГГТ порівняно з контрольною групою (табл. 2). Даларгін викликав зростання активності АлАТ сироватки крові щурів, що вказувало на можливість значного надходження цього ферменту до кровоносного русла, зокрема, із клітин печінки. За умов тижневого навантаження організму даларгіном відзначалося зниження активності АсАТ. Результати наших досліджень показали, що даларгін дещо знижував активність АсАТ порівняно з контролем. Така відмінність у дії даларгіну на активність АлАТ і АсАТ сироватки крові можливо пов'язана із різною внутрішньоклітинною локалізацією цих ферментів. За умов спільного навантаження організму тварин етанолом і даларгіном спостерігалися односпрямовані зміни активності обох визначених амінотрансфераз сироватки крові (табл. 2). Отже, у крові щурів, що отримували одночасно етанол і даларгін, вміст АлАТ виявився більш ніж у три рази вищим порівняно з контролем, а активність АсАТ зростала майже у два рази щодо контролю (табл. 2).

Таблиця 2. Активність ферментів сироватки крові щурів при дії даларгіну за умов експериментального алкогольного гепатиту (медіана; 1-й і 3-й квартилі), n=57

Діючі речовини	Активність ферментів сироватки крові, (О/л)			
	аспартатаміно-трансфераза	аланінаміно-трансфераза	гамма-глутаміл-трансфераза	лужна фосфатаза
Контроль (вода)	150,95 [127,9;196,9]	74,1 [59,7;95,4]	1,85 [1,8;3,3]	386,7 [328,9;416,1]
Етанол	191,5* [163,4;249,3]	102,8* [56,9;120,1]	3,40* [2,9;3,8]	411,50 [386,6;421,8]
Даларгін	122,6* [120,3;129,9]	121,9* [114,9;126,3]	1,8 [1,7;1,9]	251,7* [230,5;354,0]
Етанол+ даларгін	284,0* [227,8;302,2]	248,55* [179,6;286,1]	3,85* [3,45;4,10]	384,1 [300,8;492,6]

Примітка. * $p < 0,05$ щодо контролю.

У тварин з модельованим підгострим алкогольним ураженням печінки спостерігалось деяке збільшення активності лужно фосфатази сироватки крові щодо контролю, однак воно не було статистично значимим (табл. 2). Синтетичний аналог лей-енкефаліну даларгін знижував активність ЛФ сироватки крові щурів порівняно з контролем, але на тлі алкоголізації цей ефект гексапептиду не проявлявся (табл. 2). Механізм викликаного даларгіном деякого зменшення активності ЛФ сироватки крові щурів потребує подальшого вивчення. Підвищення активності ГГТ при алкогольному ураженні печінки частково пов'язане з пошкодженням гепатоцитів та з холестазом. При тижневому введенні тваринам даларгіну активність гамма-глутамілтрансферази сироватки крові щурів не змінювалася. В умовах алкогольного навантаження цей гексапептид не усував викликані етанолом змін активності вказаного ферменту (табл. 2).

Таким чином, етанол спричиняв ураження тканини печінки, порушення цілісності плазматичних і внутрішньоклітинних мембран гепатоцитів та, як наслідок, викликав зростання активності сироваткових аміно-

трансфераз та гамма-глутамілтрансферази, зменшення діаметру капілярів, площі перерізу гепатоцитів та ядер у центролобулярній зоні та площі перерізу ядер клітин перипортальної зони. При підгострому алкогольному гепатиті за умов введення даларгіну відзначалося збільшення активності АлАТ, АсАТ та ГГТ сироватки крові, подібне до такого при дії лише етанолу. Лише активність лужно фосфатази при дії даларгіну за умов алкогольного навантаження фактично дорівнювала контрольним значенням.

ВИСНОВКИ. 1. Етанол виявляє односпрямований негативний вплив на структурно-функціональний стан печінки.

2. Спільне введення етанолу і даларгіну усуває такі пригнічуючі ефекти етанолу, як зменшення площі перерізу клітин центролобулярно зони та площі перерізу клітин перипортальної зони.

Перспективним є дослідження впливу синтетичних опіодних пептидів на стан печінки при алкогольному ураженні в тварин з різною схильністю до вживання етанолу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Короткина Р.Н., Фомченков Е.Л., Андреев В.И. и др. К вопросу о некоторых молекулярных механизмах антиоксидантного действия даларгина на печень в условиях холестаза в эксперименте // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1992. – Т.113, № 1. – С. 38.
2. Львов С.П., Горбунова Т.Ф. Действие гипотермии и даларгина на перекисное окисление липидов в тканях крыс // Вопр. мед. хим. – 1993. – Т.39, № 3. – С. 21-24.
3. Yamanouchi K., Yanaga K., Okudaira S. et al. [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat // J. Surg. Res. – 2003. – V.114, № 1. – P. 72-77.
4. Богданов А.Н., Богданов Н.Н. Цитопротекторные эффекты даларгина и возможности их потенцирования // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1995. – Т.5, № 3, прил.1. – С. 34.
5. Liever C.S., Weiss D.G., Morgan T.R. Aspartateaminotransferase to platelet ratio index in patients with alcoholic liver fibrosis//Am.J.Gastr.– 2006. – № 01(7). – P. 1500-1508.
6. Бауков Ю.И., Тюкавкина Н.А. Биоорганическая химия: учебник для вузов. – Изд-во: Дрофа, 2008. – 544 с.
7. Артеменко М.В. Патологические процессы в печени и биохимические показатели крови // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 6. – С. 10.
8. Родонежская Е.В. Алкогольная болезнь печени // Ліки Укр.– 2004.– № 4. – С. 23-27.
9. Хазанов А.И. Важная проблема современности – алкогольная болезнь печени // Рос. жур. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2003.– Т.13, № 2. – С. 13-20.
10. Day C. Alcoholic liver diseases // Ceska a slovenska gastroenterology and hepatology. – 2006. – Vol. 60, № 1. – P. 67-70.
11. Методические рекомендации по экспериментальному изучению желчегонной, холеспазмолитической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных средств / С.М. Дроговоз, С.И. Сальникова, Н.П. Скакун, В.В. Слышков. – К.:ФКМЗ Украины, 1994. – 46 с.
12. Вірстюк Н.Г., Михайлик І.О., Каленська О.В. Морфологічні особливості змін тканин печінки при алкогольній хворобі печінки на різних стадіях розвитку // Галицький лікарський вісник. – 2003. – Т.10, № 2. – С. 41-43.
13. Климовский В.Г. Применение математической статистики в медико-биологических исследованиях. – Донецк, 2004. – 215 с.

Отримано 10.12.09.