

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС С ХОЛЕСТАЗОМ И ИХ КОРРЕКЦИЯ КОМБИНАЦИЕЙ ТАУРИНА С ЦИНКА ДИАСПАРТАТОМ

ПАШКО А.Ю., БУШМА К.М., БОРИСЕНКО О.А., БУШМА М.И.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь

---

### Резюме.

Цель исследования – оценка гепатозащитных свойств комбинации таурина с цинка диаспартаатом («тауцин») у крыс с холестатическим поражением печени. В опытах на 24 беспородных крысах-самцах показано, что перевязка общего желчного протока в течение 13 дней сопровождается появлением участков некроза паренхимы печени, порто-портальным фиброзом, лейкоцитарной инфильтрацией и пролиферацией холангиол; ингибированием в гепатоцитах СДГ и ЛДГ (сукцинат- и лактатдегидрогеназы); увеличением в плазме активности АлАТ и АсАТ (аланин- и аспартатаминотрансферазы), ГГТП (γ-глутамилтранспептидазы) и ЩФ (щелочной фосфатазы); содержания общего билирубина и его фракций. «Тауцин» (таурин – 50 г/моль; 6,25 г + цинка диаспартаат – 1 г/моль; 0,35 г), вводимый в желудок в дозе 0,5 г/кг/день в течение 11 дней, оказывает гепатозащитное действие. Улучшается строение печени (не выявляются участки некроза, уменьшается выраженность порто-портального фиброза и лейкоцитарной инфильтрации, повышается плотность холангиол), активизируются ингибированные процессы метаболизма (СДГ, ЛДГ) в гепатоцитах, улучшаются биохимические маркеры гепатотоксичности в плазме (уменьшается активность АлАТ и АсАТ, ГГТП и ЩФ; содержание общего билирубина и его фракций).

*Ключевые слова:* крысы, холестаз, «тауцин», гепатозащитное действие.

### Abstract.

The purpose of the study is to evaluate the hepatoprotective properties of the combination of taurine with zinc diaspertate («taucin») in rats with cholestatic liver damage. In experiments on 24 mongrel male rats it has been shown that the common bile duct ligation within 13 days is accompanied by the appearance of areas of the liver parenchyma necrosis, porto-portal fibrosis, leukocyte infiltration and proliferation of cholangioles; inhibition in hepatocytes of SDH (succinate dehydrogenase) and LDH (lactate dehydrogenase); increase in the plasma activity of ALAT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), GGT (γ-glutamyltranspeptidase) and ALP (alkaline phosphatase), the content of total bilirubin and its fractions. «Taucin» (taurine - 50 g/mol; 6,25 g + zinc diaspertate - 1 g/mol; 0,35 g) introduced into the stomach in the dose of 0,5 g/kg/day during 11 days has hepatoprotective action. The structure of the liver improves (areas of necrosis are not revealed, the severity of porto-portal fibrosis and leukocyte infiltration reduces, the density of cholangioles increases), inhibited metabolic processes (SDH, LDH) in hepatocytes are activated, biochemical markers of hepatotoxicity in plasma improve (the activity of ALAT and AST, GGT and ALP, the content of total bilirubin and its fractions decrease).

*Key words:* rats, cholestasis, «taucin», hepatoprotective action.

---

Холестатические поражения печени широко распространены в клинической практике. Они проявляются симптомокомплексом клинических и морфологических изменений, развивающихся на фоне желчной гипертензии, из-за нарушения проходимости

желчных путей и прекращении поступления желчи в двенадцатиперстную кишку. В хирургических клиниках больные с ЖКБ занимают ведущее место среди пациентов с заболеваниями органов брюшной полости, при этом растет количество осложненных

форм (холангит, цирроз, печеночная недостаточность) [1, 2]. Несмотря на многочисленные исследования в этом направлении, практическое здравоохранение не обладает высокоэффективными и безопасными гепатозащитными средствами профилактики и лечения данной патологии.

В настоящем исследовании изучены гепатозащитные свойства комбинации таурина с цинка диаспаратом у крыс с холестатическим поражением печени. Основанием для них явились известные гепатопротекторные свойства таурина, а также неорганических (сульфат, нитрат, хлорид) и органических (аспарат, оротат, цитрат) солей цинка [3, 4]. Мы предположили, что их комбинация («тауцин») окажется эффективной при холестатическом поражении печени.

### Материалы и методы

Опыты проведены на 24 беспородных белых крысах-самцах массой 350 – 400 г в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном обращении с животными. Холестаз длительностью 13 дней моделировали путем перевязки общего желчного протока. До операции животных лишали корма в течение 12 часов. Затем под эфирным наркозом крыс фиксировали на операционном столе, удаляли шерсть ножницами в районе надчревя и средней области живота. Поверхность обрабатывали 5% спиртовым раствором йода. Производили разрез кожи длиной 2 – 2,5 см по белой линии брюшной стенки от мечевидного отростка. Вскрывали переднюю брюшную стенку, делая разрез в той же области длиной 1,5 – 2 см. В рану выводили петлю 12-перстной кишки. Производили перевязку общего желчного протока двумя шелковыми лигатурами на расстоянии 2 – 5 мм ниже места слияния долевых протоков печени. Рану ушивали послойно. Комбинацию таурина (50 г/моль – 6,25 г) с цинка диаспаратом (1 г/моль – 0,35 г) вводили в желудок в виде взвеси в слизи крахмала в дозе 0,5 г/кг/день в течение 11 дней, начиная через 24 часа после перевязки протока. Контрольным крысам с холестазом вводили слизь крахмала. Ложнооперированным животным производили оперативное вмешательство без перевязки протока и вводили слизь крахмала. Через

24 часа после последнего введения веществ крыс лишали корма в течение 1 суток, декапитировали, собирали кровь и получали плазму, брали образцы печени.

### 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  $-15^{\circ}\text{C}$ . Изготовленные одновременно из материала контрольных и опытных животных криостатные срезы толщиной 10–14 мкм служили для определения активности СДГ, ЛДГ [5].

Методы оценки маркерных биохимических показателей гепатотоксичности в плазме. Определяли активность АЛАТ, АсАТ (с помощью анализатора KONELAB 30i, Финляндия), ГГТП и ЩФ; содержание общего билирубина и его фракций [6].

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 [7].

### Результаты и обсуждение

Холестаз. Через 13 дней после перевязки общего желчного протока регистрируется поражение печени. Об этом свидетельствует резкое расширение и переполнение желчью холангиол, междольковых желчных протоков и общего протока выше лигатуры. Кубический эпителий, образующий их стенку, чаще уплощен. Гепатоциты полиморфны, иногда с крупными гиперхромными ядрами. Цитоплазма клеток центральной части долек гомогенно оксифильная, а периферической – базофильная. Между порталными трактами и центральными венами регистрируются участки некрозов паренхимы печени (лизис гепатоцитов, детрит, лейкоцитарная инфильтрация), занимающие 0,12 – 6,88% поля зрения. Разрастается соединительная

ткань ( $\approx$  в 9 раз), связывающая междольковые печеночные триады (мостовидный порто-портальный фиброз). Выявляется большое количество новообразованных холангиол, особенно вокруг триад. Выражена лейкоцитарная инфильтрация (табл. 1., рис. 1).

Фоновая окраска структурных липидов менее интенсивная, чем у контрольных крыс. В цитоплазме гепатоцитов, расположенных по периферии дольки в области триад, регистрируется большее количество липидов. В области некроза и фиброза липиды выявля-

Таблица 1 – Влияние «тауцина» (в желудок в виде взвеси в слизи крахмала; 0,5 г/кг/день – 11 доз) на показатели поражения печени крыс с холестазом

Исследуемые показатели	Условия опыта		
	Ложная операция	Холестаз	Холестаз + «тауцин»
Строение печени			
Площадь некроза паренхимы печени (%)	0,00 (0,00; 0,00)	0,63 (0,38; 1,04) 0,00 (0,0008) -	0,00 (0,00; 0,00) 32,00 (1,00) 0,00 (0,0008)
Площадь соединительной ткани (%)	1,45 (1,04; 1,57)	12,64(10,28; 13,38) 0,00 (0,0008) -	6,34 (5,62; 8,98) 0,00 (0,0008) 5,00 (0,005)
Активность ферментов в гепатоцитах			
СДГ (ЕД ОП)	0,28 (0,26; 0,29)	0,21 (0,19; 0,23) 2,00 (0,0016) -	0,29 (0,27; 0,32) 22,00 (0,294) 1,00 (0,001)
ЛДГ (ЕД ОП)	0,58 (0,53; 0,60)	0,39 (0,35; 0,43) 0,00 (0,0008) -	0,51 (0,48; 0,53) 6,50 (0,007) 2,00 (0,001)
Маркерные биохимические показатели гепатотоксичности в плазме			
АлАТ (Ед/л)	35,00 (32,0; 37,5)	90,00 (81,0; 97,5) 0,00 (0,0008) -	49,00 (40,5; 57,5) 7,00 (0,008) 3,50 (0,003)
АсАТ (Ед/л)	37,50 (32,5; 40,5)	87,00 (73,5; 95,0) 0,00 (0,0008) -	51,50 (43,0; 65,0) 7,50 (0,010) 4,00 (0,003)
ГГТП (Ед/л)	4,50 (4,2; 5,0)	7,90 (7,5; 8,3) 0,00 (0,001) -	4,70 (4,1; 5,4) <u>26,00 (0,817)</u> 0,00 (0,001)
ЩФ (Ед/л)	209,00 (200,0; 212,0)	415,00 (392,0; 428,0) 0,00 (0,001) -	328,00 (300,0; 370,0) 5,50 (0,009) 2,00 (0,002)
Билирубин общий: (мкмоль/л)	4,10 (3,9; 4,3)	190,00 (184,0; 205,0) 0,00 (0,0008) -	26,70 (17,8; 40,7) 0,00 (0,0008) 0,00 (0,0008)
неконъюгированный	4,10 (3,9; 4,3)	158,50 (129,5; 163,2) 0,00 (0,0008) -	23,30 (17,2; 27,3) 0,00 (0,0008) 0,00 (0,0008)
конъюгированный	0	31,50 (26,5; 58,7) 0,00 (0,0008) -	3,40(1,2; 12,4) 4,00 (0,003) 1,50 (0,001)

Примечания: Первая строка цифр: перед скобками – значения Ме; в скобках – 25% и 75% квартилей. Вторая и третья строки цифр: перед скобками – U – значения критерия Манна-Уитни, в скобках – p. Его значения (с учетом поправки Бонферрони) приведены по отношению к ложнооперированным животным (вторая строка) и крысам с холестазом (третья строка). Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

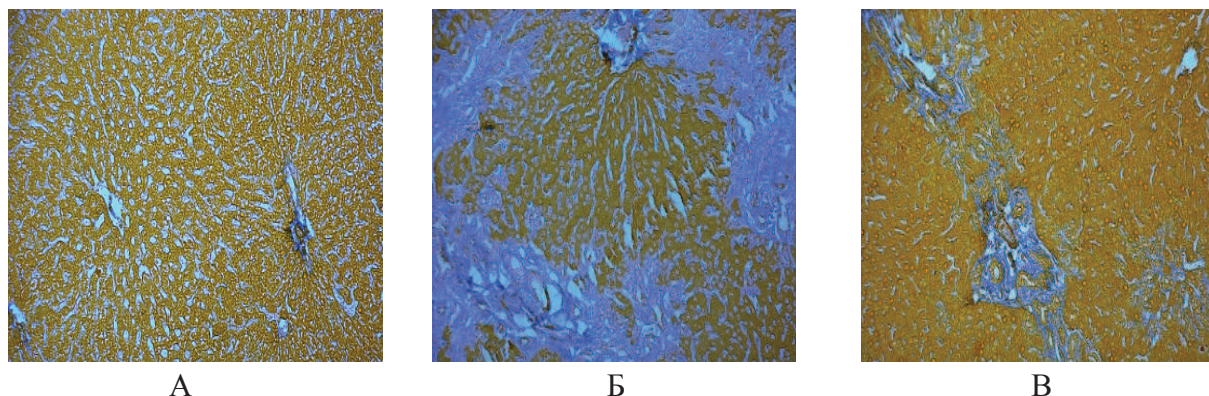


Рисунок 1 – Коллагеновые волокна в печени крыс: А – ложная операция; Б – холестаз, большая площадь соединительной ткани (голубого цвета); В – холестаз + «тауцин», значительное снижение площади соединительной ткани, по сравнению с Б. Окраска по Маллори.  $\times 100$ .

ются в виде очень светлой фоновой окраски с небольшим количеством диффузно расположенных крупных липидных капель.

Синхронно с нарушением строения печени, при холестазах ингибируются процессы метаболизма в гепатоцитах. Об этом свидетельствует снижение на 25 % активности СДГ. Продукты реакции фермента (гранулы синего цвета) регистрируются в паренхиме печени неравномерно (в центральной части дольки меньше, чем по периферии) в виде мелких гранул. В участках некроза и фиброза печени ее активность не регистрируется. Активность ЛДГ (гранулы синего цвета) снижена (в большей степени вокруг междольковых триад) на 33 %. В зонах некроза и фиброза ее активность низкая (табл. 1).

Патологические изменения в печени (нарушения строения и ингибирование процессов метаболизма) ассоциируются с увеличением в плазме активности АлАТ и АсАТ, ГГТП и ЩФ (на 157 и 132, 76 и 99%, соответственно). Регистрируется выраженная гипербилирубинемия. Содержание общего и неконъюгированного билирубина повышается соответственно в 46 и 39 раз. Появляется отсутствующий у ложнооперированных крыс конъюгированный билирубин (табл. 1).

Гепатозащитное действие «тауцина». «Тауцин» (в желудок в виде взвеси в слизи крахмала, 0,5 г/кг/день – 11 доз) оказывает гепатозащитное действие у крыс с холестазом, проявляющееся улучшением строения поврежденной печени, активацией процессов метаболизма в гепатоцитах и улучшени-

ем маркерных биохимических показателей гепатотоксичности в плазме.

В расчете на единицу площади соединительной ткани печени резко увеличивается относительное количество холангиол. Исчезает гиперхромная окраска ядер гепатоцитов. Участки некрозов не регистрируются. Количество соединительной ткани снижено на 50 %. Менее выражен жировой гепатоз и лейкоцитарная инфильтрация (табл. 1, рис. 1).

Улучшение под влиянием «тауцина» строения печени ассоциируется с синхронной активизацией в гепатоцитах процессов метаболизма. Активность СДГ увеличивается на 38 %. Продукты реакции фермента в виде крупных гранул регистрируются преимущественно в периферических отделах долек, ближе к участкам фиброза. В участках разросшейся соединительной ткани СДГ не выявляется. Активность ЛДГ возрастает на 30 % и регистрируется мозаично: в некоторых дольках – равномерно, в других – в их центральной части (табл. 1).

Улучшение под влиянием «тауцина» строения печени и активизации в гепатоцитах процессов метаболизма ассоциируется с синхронным улучшением маркерных биохимических показателей гепатотоксичности в плазме. Активность АлАТ и АсАТ, ГГТП и ЩФ снижается на 46 и 41, 41 и 21%, соответственно. В значительной степени ослабляется выраженность гипербилирубинемии. Содержание общего, неконъюгированного и конъюгированного билирубина снижается соответственно на 86, 85 и 89% (табл. 1).



## Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что при холестазах у крыс (перевязка общего желчного протока в течение 13 дней) развивается поражение печени, судя по нарушению строения органа, ингибированию в нем процессов метаболизма и ухудшению маркерных биохимических показателей гепатотоксичности в плазме. В механизме развития гепатопатии играет роль нарушение эвакуации желчи. Сдавливанию ее прилегающей паренхимы органа, а также высокие концентрации желчных кислот, обладающих детергентным действием, оказывают цитотоксическое действие на гепатоциты. Повреждаются богатые фосфолипидами плазматические мембраны. Из цитозоля в плазму выходят ферменты (АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ) и билирубин. Установлено, что при развитии холестаза прогрессивно обедняется внутриклеточный пул тиолов и сульфатов, обладающих антиоксидантными свойствами. В этих условиях активируются процессы генерации активных форм кислорода, повреждающих внутриклеточные структуры [8, 9].

Комбинация таурина с цинка дигидратом обладает гепатозащитным действием, судя по улучшению строения печени и маркерных показателей гепатотоксичности в плазме, активации в гепатоцитах процессов метаболизма. Гепатозащитное действие «таурина», по-видимому, обусловлено гепатозащитными свойствами входящих в его состав компонентов. Известна способность аминокислоты таурин обезвреживать гепатотоксичные желчные кислоты с образованием нетоксичных таурохолатов. Кроме того, таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) эффективно восполняет истощенный пул внутриклеточного сульфата [3, 10]. Как следствие, повышается функция антиоксидантной системы гепатоцитов.

Гепатозащитное действие цинка может быть опосредовано его ролью в качестве кофактора более 200 ферментов внутриклеточного метаболизма, в том числе и ферментов антиоксидантной защиты клеток (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы) [4]. Он дополняет гепатозащитные свойства таурина.

Таким образом, сочетание в едином препарате органической соли микроэлемента цинка (цинка дигидрата) и относительно незаменимой полифункциональной аминокислоты таурина фармакологически обосновано. Входящие в состав «таурина» компоненты взаимоусиливают гепатопротекторные свойства друг друга при холестазах печени.

*Исследование выполнено в рамках ГНТП РБ «Фармацевтические субстанции и лекарственные средства» (подпрограмма «Аминокислоты») по заданию «Разработать цитопротектор и корректор метаболизма эпителиальных тканей «таурин» и освоить его производство на СП ООО «Фармлэнд» (2011 – 2019 гг.).*

## Литература

1. Бадретдинова, А. Р. Анализ возрастно-половой структуры больных желчекаменной болезнью, идущих на плановую холецистэктомию / А. Р. Бадретдинова // Практическая медицина. – 2011. – № 50. – С. 60.
2. Controlled production of cirrhosis in the rat liver / H. Rosa [et al.] // Arq. Gastroenterol. – 1991 Jan-Mar. – Vol. 28, N 1. – P. 39-43.
3. Oral taurine supplementation prevents the development of ethanol-induced hypertension in rats / H. Harada [et al.] // Hypertens. Res. – 2000 May. – Vol. 23, N 4. – P. 277-284.
4. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death / A. Q. Truong-Tran [et al.] // Biometals. – 2001 Sep-Dec. – Vol. 14, N 3/4. – P. 315-330.
5. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – Москва : Иностранная литература, 1962. – 962 с.
6. Камышников, В. С. Клинико-лабораторная диагностика заболеваний печени / В. С. Камышников. – Москва : МЕДпресс-информ, 2013. – 96 с.
7. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
8. Cholestasis induces reversible accumulation of periplakin in mouse liver / S. Ito [et al.] // BMC Gastroenterology. – 2013 Jul. – Vol. 13. – P. 116.
9. Механическая желтуха неопухоловой этиологии. Патогенетические аспекты, гомеостатические нарушения. Лечебно-диагностическая

тактика / Г. Н. Андреев [и др.]. – Великий Новгород, 2004. – 120 с.  
10. Manovitskaia, A. V. Clinical effects of application

of taurines in patients with metabolic syndrome / A. V. Manovitskaia // Vopr. Pitan. – 2011. – Vol. 80, N 3. – P. 57-61.

*Поступила 09.03.2015 г.  
Принята в печать 03.04.2015 г.*

**Сведения об авторах:**

Пашко А.Ю. – ассистент и аспирант кафедры фармакологии им. профессора М.В. Кораблева УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Бушма К.М. – к.м.н., доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Борисенок О.А. – к.м.н., ассистент кафедры фармакологии им. профессора М.В. Кораблева УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Бушма М.И. – д.м.н., профессор кафедры фармакологии им. профессора М.В. Кораблева УО «Гродненский государственный медицинский университет».

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, УО «Гродненский государственный медицинский университет», кафедра фармакологии им. профессора М.В. Кораблева. Тел.раб.: +375 (152) 74-24-87, e-mail: anfstas@inbox.ru – Пашко Анастасия Юрьевна.