

ФАРМАКОЛОГИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

ВЛИЯНИЕ ИНФУЗИОННОГО ГЕПАТОПРОТЕКТОРА РЕМАКСОЛ НА ФУНКЦИЮ ПЕЧЕНИ КРЫС НА МОДЕЛИ ОБТУРАЦИОННОЙ ЖЕЛТУХИ

Н. Г. Смирнова, С. Г. Чефу, А. Л. Коваленко, Т. Д. Власов¹

Изучено гепатопротективное влияние ремаксола на функцию печени крыс на модели обтурационной механической желтухи на сроках одна и две недели после перевязки общего желчного протока. Ремаксол или NaCl 0,9 % вводили крысам в хвостовую вену в течение первой недели после моделирования холестаза в дозировке 1 мл/100. Оценивали размер и массу печени, степень асцита, биохимические показатели крови (билирубин, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, амилаза, альбумин). Исследовали патоморфологические изменения в печени. Показано, что ремаксол оказал гепатопротективное действие, как при оценке биохимических показателей, так и при исследовании морфологических препаратов печени на сроках одна и две недели после моделирования холестаза.

Ключевые слова: ремаксол, обтурационная желтуха, холестаз, гепатопротекция

ВВЕДЕНИЕ

Холестаз – клинический синдром, обусловленный нарушением образования и выделения желчи с уменьшением или полным прекращением поступления желчи в двенадцатиперстную кишку.

Синдром внепеченочного холестаза развивается при ряде заболеваний гепатобилиарной области. В его основе лежит нарушение оттока желчи, связанное с механической обтурацией внепеченочных желчных протоков.

Наиболее частой причиной внепеченочного холестаза является желчекаменная болезнь с обтурацией камнем общего желчного протока. Заболеваемость желчекаменной болезнью в последние десятилетия повысилась и продолжает возрастать. По данным National Institute of Health (1992) желчекаменной болезнью страдает 10 – 15% взрослого населения. Другой частой причиной внепеченочного холестаза являются онкологические заболевания: рак поджелудочной железы, желчного пузыря и внепеченочных желчных протоков. Опухоли органов гепатобилиопанкреатодунальной зоны составляют 15% всех злокачественных новообразований и этот показатель растет [2].

Как в случае желчекаменной болезни, так и в случае онкологических заболеваний гепатобилиопанкреатодунальной зоны ведущим синдромом подпеченочной обтурационной желтухи является холестаз. Первоначальное нарушение желчеоттока по желчевыводящим путям является причиной развития вторичного внутрипеченочного холестаза. Нарушение оттока желчи приводит к повреждению гепатоцитов уже на 7-й день холестаза, развивает-

ся ацидофильная и баллонная дистрофия [8]. В дальнейшем происходит альтерация паренхимы печени, которая обусловлена токсическим влиянием компонентов желчи, а также механическим давлением расширенных тромбированных желчных канальцев. Застой желчи и некробиоз гепатоцитов сопровождается воспалительной мезенхимально-клеточной реакцией. При длительном холестазе нарушается всасывание жирорастворимых витаминов, что сопровождается нарушением свертывающей системы крови (дефицит витамина К), нарушением кальциевого обмена и остеопорозом (дефицит витамина Д) [4, 5, 8].

При биохимическом анализе крови отмечается повышение уровня билирубина, в основном за счет конъюгированного, повышение уровня экскреторных ферментов: щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, а также индикаторных ферментов: аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы.

Новый инфузионный гепатопротектор ремаксол (ООО “НТФФ” ПОЛИСАН”) является сбалансированным полиионным инфузионным раствором, обладающим гепатопротекторным действием. Препарат содержит активные компоненты – янтарную кислоту, рибоксин, никотинамид, метионин, а также электролиты - натрия хлорид, магния хлорид, калия хлорид и сольстабилизирующий агент N-метилглюкамин. Фармакологические свойства и лечебная эффективность данного препарата обусловлены взаимно-потенцирующим действием всех его компонентов. Под действием препарата ускоряется переход анаэробных процессов в аэробные, улучшается энергетическое обеспечение гепатоцитов, увеличивается синтез макроэргов, повышается устойчивость мембран гепатоцитов к перекисному окислению липидов, восстанавливается активность ферментов антиоксидантной защиты. Ремаксол снижает цитолиз, что проявляется в снижении индикаторных ферментов: аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы [6, 7].

¹ Кафедра патофизиологии (зав. – проф. Т. Д. Власов), Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8.

Ремаксол способствует снижению билирубина и его фракций, улучшает экскрецию прямого билирубина в желчь. Снижает активность экскреторных ферментов гепатоцитов – щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы, способствует окислению холестерина в желчные кислоты [6, 7].

В настоящем исследовании изучали специфическую фармакологическую активность препарата Ремаксол раствор для инфузий на модели экспериментальной обтурационной механической желтухи у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполняли на крысах-самцах линии Вистар (возраст 18 недель, масса 270 – 300 г), полученных из питомника Рапполово РАМН (Санкт-Петербург).

До экспериментов животных подвергали 14-дневному карантину и рандомизации. Метки и индивидуальные номера животных регистрировали в протоколах лабораторных испытаний. Животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе, на неограниченном потреблении корма и воды.

Документальное исследование проводили согласно правилам лабораторной практики, регламентированным Федеральным законом "О лекарственных средствах" № 86-ФЗ от 22.06.1998 и приказом от 19 июня 2003 г. №267 "Об утверждении правил лабораторной практики".

Эксперименты выполняли под анестезией (тиопентал натрия 50 мг/кг внутрибрюшинно).

Экспериментальный холестаза моделировали путем перевязки общего желчного протока [10]. Крысам под общей анестезией проводили срединную лапаротомию, органы брюшной полости сдвигали и выделяли общий желчный проток. Общий желчный проток перевязывали лигатурой 4–0, после чего органы брюшной полости

крысы аккуратно возвращали на прежнее положение и послойно ушивали операционную рану.

В дальнейшем всем животным со 2-го дня после операции внутривенно вводили исследуемые препараты в течение 5 дней в хвостовую вену.

Все экспериментальные животные были разделены на 6 групп: ложно-оперированные, которым проводили полную процедуру воспроизведения холестаза без перевязки общего желчного протока, со сроком после операции 1 и 2 недели (группы №1 и №2 соответственно); группа №3 – холестаза сроком 1 неделя и введение 0,9 % NaCl в объеме 1 мл/100 г; группа №4 - холестаза сроком 2 недели и введение 0,9 % NaCl в объеме 1 мл/100 г; группа № 5 – холестаза сроком 1 неделя и введение ремаксола в объеме 1 мл/100 г, группа № 6 - холестаза сроком 2 недели и введение ремаксола в объеме 1 мл/100 г. Растворы в хвостовую вену животных вводили со скоростью 1 мл/мин.

В течение исследования каждое животное осматривали ежедневно. Осмотр включал: оценку общего поведения, состояния животных, степень желтушности видимых слизистых и склер, вес крыс.

Крыс выводили из эксперимента через одну или две недели после операции, в зависимости от распределения по группам.

Забор крови проводили перед непосредственным выведением животного из опыта под анестезией (тиопентал натрия 50 мг/кг внутрибрюшинно). Кровь без консерванта набирали в пластиковые пробирки и оставляли на 30 мин. После этого кровь центрифугировали при 1500 оборотов в течение 15 минут. Оценивали следующие биохимические показатели сыворотки крови: аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, билирубин общий, билирубин прямой, билирубин непрямой, щелочная фосфатаза, амилаза, гамма-глутамилтранспептидаза, альбумин. Все биохимические исследования выполнялись на

Биохимические показатели (по группам)

Показатель	Альбумин, г/л	Билирубин общий, мМ	Билирубин прямой, мМ	Билирубин непрямой, мМ	Амилаза, Ед/л	АСТ, Ед/л	АЛТ, Ед/л	ЩФ, Ед/л	ГГТП, Ед/л
Ложнооперированные 1 неделя									
Средн. и ст. откл.	9,7 ± 1,9	164,7 ± 27,4	99,7 ± 15,7	65,0 ± 16,1	1266,6 ± 345,5	463,1 ± 129,5	95,1 ± 32,6	664,4 ± 400,3	16,4 ± 5,5
P2 vs ЛО 2нед	0,023	0,002	0,002	0,002	0,327	0,003	0,02	0,005	0,003
Ложнооперированные 2 недели									
средн	13,7 ± 3,1	4,3 ± 1,7	0,2 ± 0,2	4,1 ± 1,6	1527,8 ± 217,7	227,4 ± 39,3	57,4 ± 8,7	240,0 ± 38,5	3,6 ± 1,5
Физиологический раствор 1 неделя									
Средн. и ст. откл.	12,1 ± 1,8	186,0 ± 27,9	112,0 ± 14,1	73,9 ± 15,4	1254,5 ± 259,9	364,6 ± 56,6	79,1 ± 17,1	274,6 ± 108,6	11,1 ± 5,1
P vs ЛО 1нед	0,426	0,002	0,002	0,002	0,462	0,01	0,032	0,54	0,005
Физиологический раствор 2 недели									
Средн. и ст. откл.	9,7 ± 1,9	164,7 ± 27,4	99,7 ± 15,7	65,0 ± 16,1	1266,6 ± 345,5	463,1 ± 129,5	95,1 ± 32,6	664,4 ± 400,3	16,4 ± 5,5
P2 vs ЛО 2нед	0,023	0,002	0,002	0,002	0,327	0,003	0,02	0,005	0,003
Ремаксол 1 неделя									
Средн и ст. откл.	12,6 ± 1,6	176,5 ± 34,7	124,0 ± 29,1	62,5 ± 22,4	1397,5 ± 300,8	382,8 ± 73,2	76,6 ± 30,2	354,1 ± 97,0	17,4 ± 8,7
p vs. Физ.1	0,791	0,226	0,406	0,023	0,131	0,762	0,97	0,14	0,149
Ремаксол 2 недели									
Средн и ст. откл.	8,0 ± 2,6	139,5 ± 67,8	82,4 ± 38,5	57,1 ± 30,1	1275,1 ± 437,2	336,0 ± 105,1	70,4 ± 27,0	440,1 ± 179,6	16,5 ± 7,2
p vs. Физ.2	0,326	0,226	0,45	0,545	0,821	0,023	0,129	0,406	0,909

Примечание. Ложнооперированные – ЛО, ремаксол – Р, физиологический раствор – Физ.

автоматическом анализаторе Synchron (Beckman Coulter, США).

Патоморфологическое исследование включало некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование печени. Оценивали размер и массу печени, степень асцита. Было проведено исследование состояния брюшной полости и макро- и микроскопическое исследование печени. Гистологический материал заливали в парафин. Парафиновые блоки обрабатывали на санном микротоме МС-2. Просмотр препаратов после окраски гемоксилином-эозином проводили на световом микроскопе МБИ-15 с бинокулярной насадкой. Исследовали образцы ткани печени (степень повреждения, фибротический процесс, ангиогенез).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Statistica (непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Производили оценку достоверности различий между группами: физиологический раствор 1 неделя и ложнооперированные 1 неделя; физиологический раствор 2 недели и ложнооперированные 2 недели; ремаксол 1 неделя и физиологический раствор 1 неделя; ремаксол 2 недели и физиологический раствор 2 недели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование были взяты животные одного возраста и одного веса. Не отмечалось значительных изменений динамики веса у разных групп животных. И ложнооперированные и экспериментальные животные имели положительную динамику веса, достоверно не отличавшуюся между группами.

Операция по воспроизведению экспериментального холестаза не влияла на потребление корма и воды, которые рассчитывались не только в абсолютных значениях, но и в процентах к массе тела, что более правильно, поскольку крысы, несмотря на однородную выборку, имели некоторый разброс по массе тела. У всех крыс с экспериментальным холестазом отмечалась выраженная желтушность слизистых и внутренних органов, что выявлялось при вскрытии брюшной полости при выведении животных из опыта. У части животных (в среднем около 30 % по всем группам) отмечался асцит, но различия по частоте асцита и объему асцитической жидкости не отмечались.

При оценке массы печени наблюдалось увеличение веса в опытных группах. Известно, что на фоне холестаза развивается отек печени, она переполняется желчью, что может быть основной причиной увеличения массы печени во всех группах крыс, что дополнительно подтверждает адекватность выбранной модели по воспроизведению холестаза [10].

В группах с введением препаратов ремаксол и физиологический раствор достоверных различий по весу печени крыс на момент выведения животных из опыта не наблюдалось.

При оценке влияния вводимых препаратов на биохимические показатели крови крыс с экспериментальным холестазом было показано, что у всех животных с экспериментальным холестазом были достоверно увеличены

такие показатели крови как общий, прямой и непрямой билирубин, аспартатаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ), а также повышены показатели гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) – см.таблицу. Максимальные отличия уровня билирубина отмечались на 7-й день после операции, в то время как на 14-й день они были несколько ниже, чем на 7-й, но по-прежнему, сохранялись на более высоком уровне, чем в группе ложнооперированных животных. Уровни ферментов АЛТ, АСТ и ГГТП продолжали увеличиваться. Кроме того, через 14 дней после операции отмечалось и достоверное повышение щелочной фосфатазы, что можно оценить как признаки повреждения гепатоцитов [3, 5, 8, 9]. Введение ремаксолола в группе крыс с недельной механической желтухой сопровождалось некоторым снижением всех показателей, повышенных в группе с NaCl 0,9 % (билирубин прямой, непрямой, общий), однако только содержание в сыворотке крови непрямого билирубина снижалось достоверно ($p = 0,023$). Достоверного снижения остальных показателей из-за разброса данных не отмечалось. Через 2 недели после операции по перевязке желчного протока отмечалось снижение уровней ферментов (АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТП) по сравнению с группой крыс, которым вводили NaCl 0,9 %, причем уровень АСТ ($p = 0,023$) был снижен достоверно. Различия по остальным показателям из-за значительного разброса данных как в группе с введением NaCl 0,9 %, так и в группе с введением ремаксолола были недостоверны. Однако по уровню щелочной фосфатазы в группе с NaCl 0,9 % и холестазом 2 недели у 4 из 10 крыс отмечались значения этого фермента в плазме крови более 800 Ед/л, в то время как ни у одного животного в группе с ремаксололом не отмечалось значений щелочной фосфатазы выше 800 Ед/л. Эти данные мы также расцениваем как проявление гепатопротективного действия.

Морфологическое исследование на фоне введения введения NaCl 0,9 % при холестазе сроком 1 неделя показало, что дольковое строение печени в целом было сохранено. Артерии и вены печеночных триад полнокровны. Отмечалась пролиферация желчных протоков и лимфо-плазмоцитарная инфильтрация. На месте некоторых триад крупноочаговые кровоизлияния с умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. Имелась тенденция к формированию ложных желчных ходов.

При холестазе сроком 2 недели на фоне введения NaCl 0,9 % изменения были более выраженными. Дольковое строение печени местами стерто. Отмечалось резко выраженное полнокровие венозного русла. Крупные желчные протоки резко расширены, просвет пуст. Имелись сформированные ложные желчные ходы, наблюдались паретическое расширение отдельных вен и желчных протоков, множественные кровоизлияния и некроз отдельных печеночных триад с выраженной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией.

Морфологическое исследование на фоне введения ремаксолола при холестазе сроком 1 и 2 недели неделя показало сходную картину, но морфологические изменения были менее выражены, что проявлялось сохранностью долькового строения печени, менее выраженной дилатацией вен и лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией.

Модель холестаза, воспроизведенная в эксперименте [10], является достаточно искусственным отражением клинической модели обтурационной желтухи, так как в клинике хирургических болезней обтурационная желтуха является показанием к хирургическому лечению для восстановления нарушенного желчеоттока. При желчекаменной болезни и онкологических заболеваниях желчевыводящих путей несмотря на то что желтуха порой оказывается первым клиническим проявлением болезни она является поздним диагностическим критерием, отражающим позднюю стадию заболевания [1, 8]. Например, при раке желчного пузыря средняя продолжительность желтушного периода составляет от 2 до 6 недель. Больные поступают в стационар с признаками функциональной недостаточности в работе систем и органов: печени, почек, геморрагическими осложнениями [1]. Всем им наряду с хирургическим лечением обтурационной желтухи показана гепатопротективная терапия для восстановления нарушенной работы печени.

В проведенном эксперименте нет этапа разрешения подпеченочного холестаза и восстановления желчеоттока. Поэтому достоверного изменения общего и прямого билирубина не происходило. Однако, по нашему мнению, ремаксол несколько уменьшил цитолитический компонент холестаза, что проявилось достоверным снижением уровня АСТ на 14-е сутки после проведения операции. Уровни другого фермента (АЛТ) не проверяют данное предположение поскольку у животных, которым вводили ремаксол, отмечали тенденцию к уменьшению. Кроме того, введение ремаксола, по-видимому, уменьшило степень нарушения захвата непрямого билирубина на 7-е сутки после операции по моделированию холестаза. Данные морфологического исследования, позволяющие сделать качественную оценку состояния ткани печени при развившемся холестазе согласуются с полученными данными о положительном эффекте ремаксола.

ВЫВОДЫ

1. У крыс экспериментальный холестаз к концу 7-го дня сопровождается повышением уровня ферментов сыворотки и фракций билирубина, при этом через 2 недели прослеживается тенденция к уменьшению уровня последнего с ростом щелочной фосфатазы сыворотки крови.
2. Введение ремаксола сопровождалось достоверным уменьшением уровня непрямого билирубина на 7-е сутки и уровня аспаратаминотрансферазы на 14-е сутки холестаза у крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Е. Борисов, *Руководство по хирургии печени и желчевыводящих путей*, Т. 2, Скифия, Санкт-Петербург (2003).
2. Б. И. Долгушин, В. Ю. Косырев, *Практическая онкология*, 5 – 2, 77 – 84 (2004).
3. Р. А. Иванченкова, *Хронические заболевания желчевыводящих путей*, Атмосфера, Москва (2006).
4. А. В. Калинин, *Гастроэнтерология и гепатология, диагностика и лечение*, Миклош, Москва (2007).
5. Ф. И. Комаров, *Руководство по гастроэнтерологии*, Т. 2, Медицина, Москва (1995).
6. Т. В. Сологуб, Л. Г. Горячева, *Клин. мед.*, 1, 62 – 66 (2010).
7. Д. С. Суханов, Т. Н. Саватеев, *Вестн. Санкт-Петербургской государственной академии им. И. И. Мечникова*, 4, 127 – 131 (2008).
8. Ш. Шерлок, Дж. Дули, *Заболевания печени и желчевыводящих путей*, ГЭОТАР, Москва (1999).
9. Хендерсон М. Джозеф, *Патофизиология органов пищеварения*, Невский диалект, Санкт-Петербург (1997).
10. М. А. Aller, M. Duran, L. Ortega, and J. L. Arias, *Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat, Microsurgery.*, 24 – 6, 442 – 447 (2004).

Поступила 06.05.10

EFFECT OF HEPATOPROTECTOR REMAXOL INFUSION ON LIVER FUNCTION IN OBSTRUCTIVE JAUNDICE MODEL IN RATS

N. G. Smirnova, S. G. Chifu, A. L. Kovalenko, and T. D. Vlasov

Department of Pathophysiology, Pavlov State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6/8, St. Petersburg, 197022, Russia

Remaxol is a new infusion hepatoprotector that contains succinic acid, inosine, methionine and methylglucamine. The hepatoprotective effect of remaxol on the liver function has been studied on the model of obstructive jaundice in rats, on the terms of one and two weeks after ligation of the common bile duct (M. A. Aller, et al., 2004). Sixty rats were randomly divided into six groups: sham-operated rats with cholestasis, 0.9% NaCl treated rats with cholestasis, and remaxol treated rats with cholestasis, all on the one week (*per os* $n = 10$) and two weeks ($n = 10$) terms. Remaxol was injected into the tail vein in a dose of 1 ml/100 g during the first week after the induction of cholestasis. The rats were removed from the experiment after one and two weeks of postoperative period, respectively. The size and weight of the liver and the degree of ascites were measured, and the blood samples were taken to analyze for bilirubin, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transpeptidase, alanineaminotransferase, aspartataminotransferase. Morphological changes in the liver were also studied. The biochemical parameters of blood and morphological evolution of tissue of liver in both one and two weeks after the induction of cholestasis showed a significant hepatoprotective effect of remaxol.

Key words: Remaxol, obstructive jaundice, cholestasis, hepatoprotective effect