

ГІСТОМОРФОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ БІЛКОВОГО ОБМІНУ ПРИ ПАТОЛОГІЇ ПЕЧІНКИ

За результатами проведених гістоморфологічних досліджень встановлено, що екстракт з трави люцерни посівної в дозі 25 мг/кг, будучи донором білка та амінокислот, кращий, ніж препарат порівняння "Силібор" у дозі 50 мг/кг, який є стимулятором синтезу білка, здатним відновлювати стан гепатоцитів за умова субхронічного етанол-тетрахлорметанового гепатиту за рахунок відновлення ендогенного пулу білка, нормалізації білкового обміну гепатоцитів та органа в цілому.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: екстракт із трави люцерни посівної, білковий обмін, субхронічний гепатит, корекція білкового обміну.

ВСТУП. Печінка відіграє важливу роль у підтримці білкового гомеостазу, і її пошкодження призводить до порушення білкового обміну. При таких захворюваннях печінки, як гепатит, ішемія, гепатоз, цироз тощо, відбувається пошкодження гепатоцитів як структурного субстрату анаболізму і катаболізму білка, що призводить до руйнування та загибелі гепатоцитів [1, 3–5, 7].

Зважаючи на це, доцільним є застосування в комплексній терапії захворювань печінки лікарських засобів, які б були донорами структурних компонентів амінокислот та інших біологічно активних речовин – коректорів білкового обміну і попереджували та перешкоджали руйнуванню гепатоцитів. Джерелом таких речовин можуть слугувати екстракт із трави люцерни посівної (ЕТЛП) (*Medicago sativa*) з роду бобових (*Fabaceae*), який містить білки, 17 амінокислот, у тому числі 8 незамінних, 8 ферментів, що розщеплюють білки та сприяють їх засвоєнню, які можуть безпосередньо впливати на білосинтетичні процеси в печінці; та біологічно активні речовини з антиоксидантними, мембраностабілізуювальними, органопротекторними, протизапальними та іншими властивостями [3].

Таким чином, вищенаведені дані свідчать про доцільність вивчення впливу коректора білкового обміну ЕТЛП, порівняно з класичним

© Р. Ф. Єрмоєнко, Л. М. Малоштан, 2014.

гепатопротектором силібором, на стан печінки та білкового гомеостазу щурів за умов субхронічного гепатиту [2, 7].

Метою даного дослідження було визначити стан білкового обміну під впливом коректора білкового обміну ЕТЛП, порівняно з класичним гепатопротектором силібором, за умов субхронічного гепатиту в щурів, викликаного комбінацією гепатотоксину етанолу та мембранотоксину тетрахлорметану [4].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на 32 білих безпородних щурах масою 180–200 г, дотримуючись вимог комісії з біоетики НФаУ та Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Київ, 2001), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [2]. Тварин було поділено на групи по 8 голів таким чином: 1-ша – інтактний контроль (ІК); 2-га – контрольна патологія (КП); 3-тя – дослідна, щурам вводили ЕТЛП у дозі 25 мг/кг; 4-та – дослідна, тваринам вводили силібор у дозі 50 мг/кг. Після рандомізації тваринам дослідних груп вводили препарати у вищезазначених дозах, групи КП – розчинник протягом тижня до початку та впродовж терміну експерименту [2]. Далі у тварин моделювали, згідно з методичними рекомендаціями [2], субхронічний гепатит, який викли-

кали шляхом внутрішньошлункового введення етанолу (Ет) та тетрахлорметану (ТХМ) щурам за визначеною схемою протягом 6 діб: спочатку вводили 50 % масляний розчин тетрахлорметану в дозі 0,4 мл/100 г маси тіла, через 2 год – 40 % водний розчин етанолу в дозі 1,3 мл/100 г маси тіла. Об'єкти дослідження ЕТЛП та силібор вводили тваринам під час експерименту щоденно протягом 6 діб через 2 год після введення етанолу [2]. На 7-му добу щурів вивішували та виводили з досліду методом декапітації за умов барбамілового наркозу. Вилучали печінку та проводили гістоморфологічні дослідження [2, 6]. Мікропрепарати розглядали під мікроскопом Mikros 400, мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nicon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері за допомогою програми Nicon Viv 5. Результати дослідження наведено на рисунках 1–7 і в таблиці.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Введення щурам дослідних груп протягом 6 днів гепатотоксинів ТХМ та Ет призводило до пошкодження гепатоцитів (рис. 1–3, табл.). Лікування тварин за допомогою ЕТЛП у дозі 25 мг/кг та силібору в дозі 50 мг/кг чинило виражену гепатопротекторну дію різного ступеня. Аналіз змін гістоструктури гепатоцитів свідчив про їх відновлення, що приводило до покращення функціонального стану печінки, та перевагу ЕТЛП над препаратом порівняння “Силібор” (рис. 4–6, табл.).

У процесі дослідження мікропрепаратів печінки щурів групи КП, яким вводили протягом тижня гепатотоксини ТХМ та Ет, установлено, що вони викликають дезорганізацію печінкових балочок, дифузну жирову дистрофію гепатоцитів, переважно розсіяний уніцелюлярний некроз клітин. Розмір зон деструкцій охоплював від 50 % об'єму часточок і більше. Жирові вclusions мали середньо-крупнокраплинний

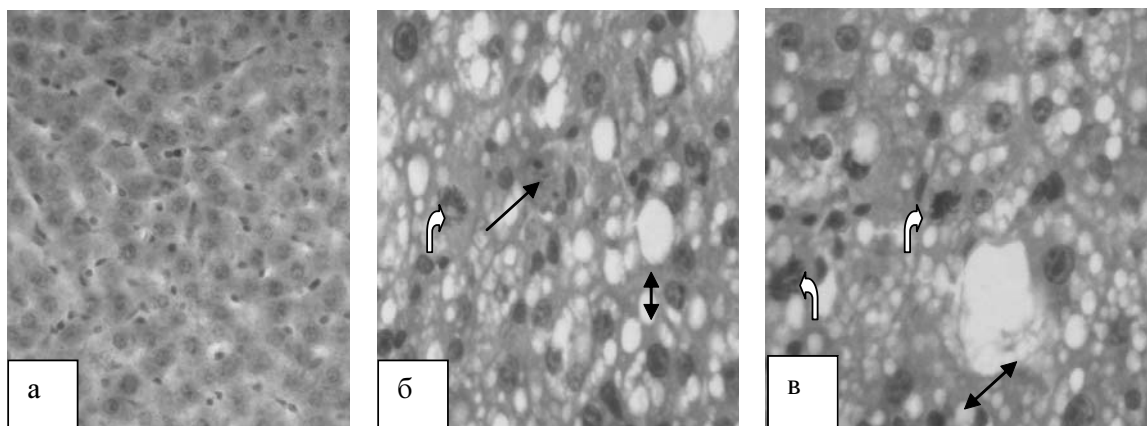


Рис. 1. Печінка щура за умов інтактності (а) та КП (б, в). Дезорганізація балочного рисунка, дифузна жирова дистрофія, гепатоцит у стані ацидофільної дегенерації (б, чорна стрілка), фігури мітозу в клітинах – метафаза і метафаза-анафаза (а-в, біла стрілка), жирові кисти (б, в, подвійна стрілка). Гематоксилін-еозин. x400.

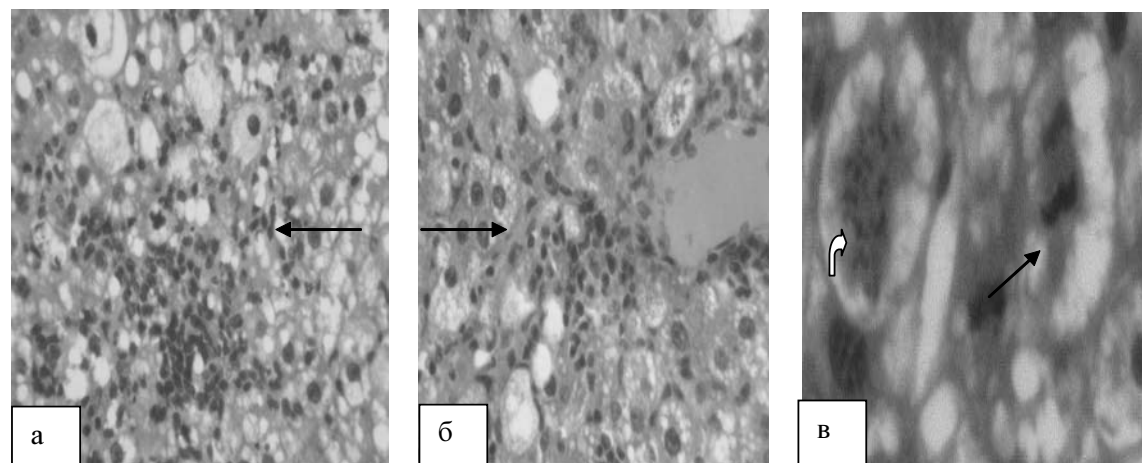


Рис. 2. Печінка щура за умов КП. Дифузна жирова дистрофія гепатоцитів. Різна за вираженням запальна реакція (а – виражена, б – помірною), діapedезні крововиливи (а, б, стрілка). Мітоз у гепатоцитах (в): нормальний – анафаза (чорна стрілка) та патологічний розподіл клітин – розпорощення хромосом (біла стрілка). Гематоксилін-еозин. Імерсія. Гематоксилін-еозин. x250.

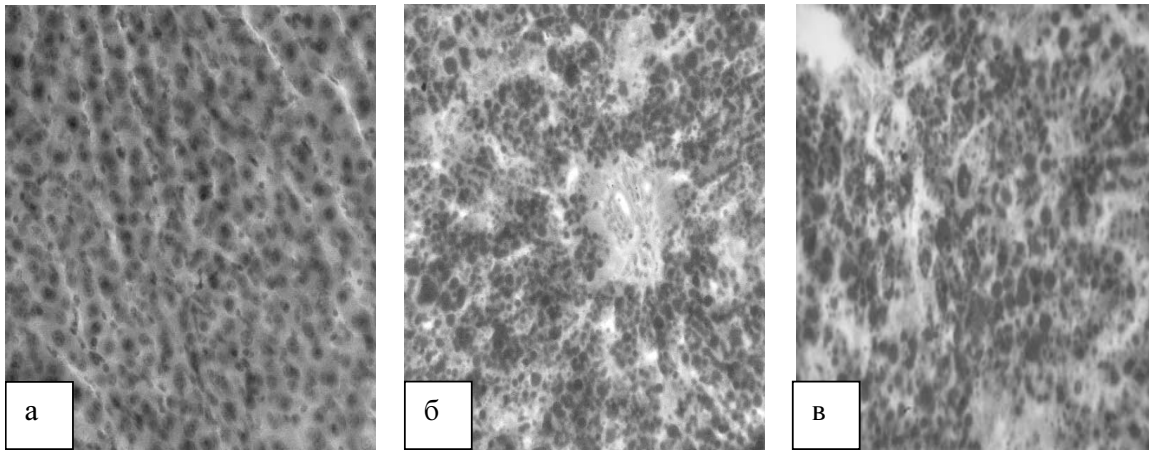


Рис. 3. Печінка за умов інтакту (а) та КП (б, в). Цитоплазма гепатоцитів різних зон часточок (б – перипортально, в – центролобулярно) забита краплями жиру. Судан, заморожений зріз. $\times 200$.

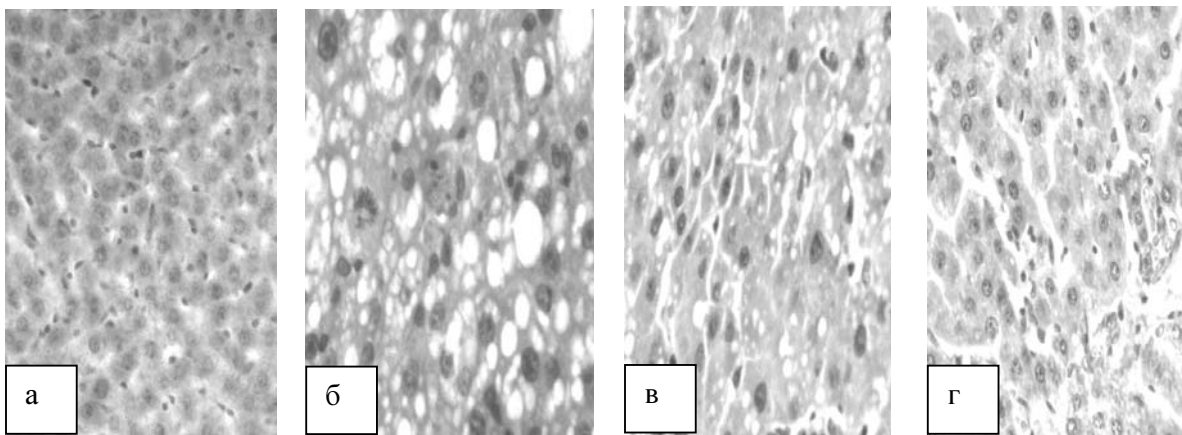


Рис. 4. Печінка щура за умов Ет+ТХМ-гепатиту, лікованого ЕТЛП у дозі 25 мг/кг (в, г), порівняно з інтактом (а) та КП (б): в – виражене зменшення жирової дистрофії, відсутність запальної реакції та судинних розладів, анізонуклеоз, набряк клітин; г – нормальний стан гепатоцитів. Гематоксилін-еозин. $\times 250$.

характер, ядра часто були зміщені на периферію клітини, місцями жирові вакуолі сусідніх клітин зливалися між собою та створювали жирові кісти. При фарбуванні суданом виявлено дифузне потужне червоне забарвлення всієї часточки, краплі жиру заповнювали цілком усю цитоплазму, містилися і між клітинами. Некробіотичні гепатоцити перебували або у стані ацидофільної дегенерації (тільця Каунсилмена – чіткий відокремлений округлий утвір з гомогенною цитоплазмою, в якій відсутнє ядро або видно його залишки), або у стані ядерно-цитоплазматичного детриту, що відображало різні стадії некрозу клітин. Серед дегенерованих та некротизованих гепатоцитів видно різну за вираженням запальну круглоклітинну реакцію. Зоряні ретикулоендотеліоцити активовані. Спостерігали помірні циркуляторні розлади у вигляді повнокров'я центральних вен, вен портальних трактів, іноді синусоїдальних капілярів та діapedезних крововиливів. За ходом судин відмічали дрібні лейкоцитарні інфільтрати, в деяких судинах – крайове

розташування клітин крові. Цитоплазма клітин була з дрібною вакуолізацією. На обмежених ділянках часточок з відносно збереженою паренхімою виявлено набухання гепатоцитів, нечіткість клітинних мембран, розмитість радіальної спрямованості тяжів клітин, помірне коливання розміру ядер (анізонуклеоз), зменшення кількості двоядерних клітин, що свідчило про білкову недостатність. Крім того, поділ клітин мав ознаки патології: з'являлися аномальні фігури з неправильним з'єднанням фрагментів хромосом, розпорощенням хромосом (рис. 2).

Профілактично-лікувальне введення ЕТЛП у дозі 25 мг/кг сприяло чіткому покращенню морфологічного стану печінкової паренхіми. У більшості щурів жирова дистрофія гепатоцитів стала суттєво менш вираженою. Ліпідні включення були дуже дрібними та в більшості тварин не руйнували цілісності клітин. Жирові кісти відсутні або поодинокі. Зони деструкції виявлялися лише перипортально, розмір їх не перевищував 10 % – рідко 20 % об'єму часточки.

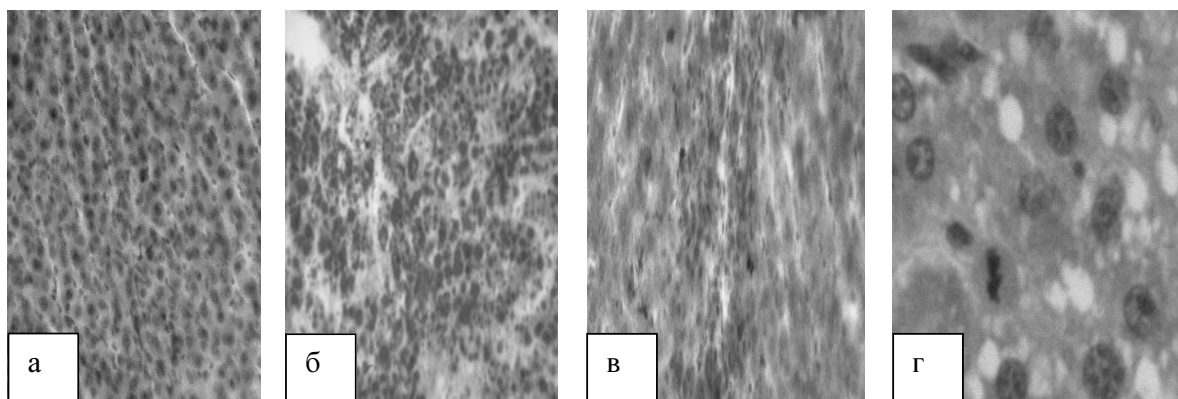


Рис. 5. Печінка щура за умов Ет+ТХМ-гепатиту, лікованого ЕТЛП у дозі 25 мг/кг (в, г), порівняно з інтактом (а) та КП (б): в – виражене зменшення жирової дистрофії (судан, заморожений зріз. $\times 250$); г – нормальний мітоз (метафаза) в гепатоциті (гематоксилін-еозин, $\times 400$).

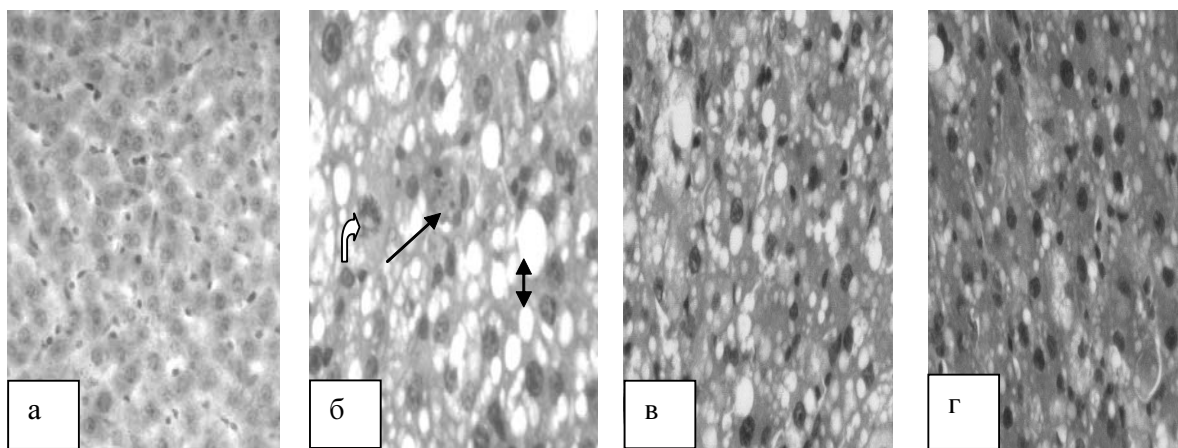


Рис. 6. Печінка щура за умов Ет+ТХМ-гепатиту, лікованого референс-препаратом "Силібор" у дозі 50 мг/кг (в, г), порівняно з інтактом (а) та КП (б). Різні за вираженням жирова дистрофія гепатоцитів: в – доволі виражена, г – помірна. Добре помітний анізонуклеоз. Гематоксилін-еозин. $\times 250$.

Моноцелюлярний некроз гепатоцитів був відсутній або зачіпав лише окремі клітини. На структурно збережених ділянках часточок простежено радіальну спрямованість тяжів гепатоцитів, хоча ще доволі виражені набряклість клітин та стертість клітинних мембран. Помітно вираженішим був поліморфізм ядер гепатоцитів, зорово зростає кількість клітин з більш ніж 2 ядрами в ядрі, відзначено наявність двоядерних клітин. Двоядерні клітини виявлялися також дифузно по часточці. Навіть у зонах деструкції містилися гепатоцити, що зберігали життєздатні функції. Кількість мітозів суттєво зменшувалась, була відсутня патологія мітозу. Відсутні також судинні розлади та запальна реакція (рис. 4, 5).

Аналогічне за схемою введення референс-препарату "Силібор" у дозі 50 мг/кг також чинило позитивний вплив на стан печінкової паренхіми щурів (рис. 6, 7), хоча цей вплив був не таким вираженим, ніж у групі тварин, яких лікували ЕТЛП (рис. 4, 5). Зони деструкції звужувались (не більше 20–30 % об'єму часточок),

виявлялися лише центрлобулярно та перипортально. Відповідно, збільшувались ділянки часточок з нормальним станом гепатоцитів. Зменшувались некротичні зміни клітин, запальна клітинна реакція та судинні розлади. Жирова дистрофія зменшувалася відносно КП і мала переважно дрібновезикулярний характер, але була помітна, охоплювала гепатоцити на 30–60 % об'єму часточок. Мали місце і нечисленні жирові мікрокісти. Патологічних змін у мітозі гепатоцитів не виявлено. Відмічали певне збільшення пулу двоядерних клітин як дистанційно, так і безпосередньо біля зон пошкодження, а також ознак анізонуклеозу, збільшення ядерець в ядрі, що свідчило про стимулювання синтезу білка (рис. 6, 7).

Аналіз результатів дослідження впливу ЕТЛП, порівняно із силібором, на показники напівкількісної оцінки стану паренхіми печінки щурів за умов субхронічного Ет+ТХМ-гепатиту засвідчив значну перевагу ЕТЛП у дозі 25 мг/кг над препаратом порівняння "Силібор" у дозі 50 мг/кг за вираженням здатності відновлювати

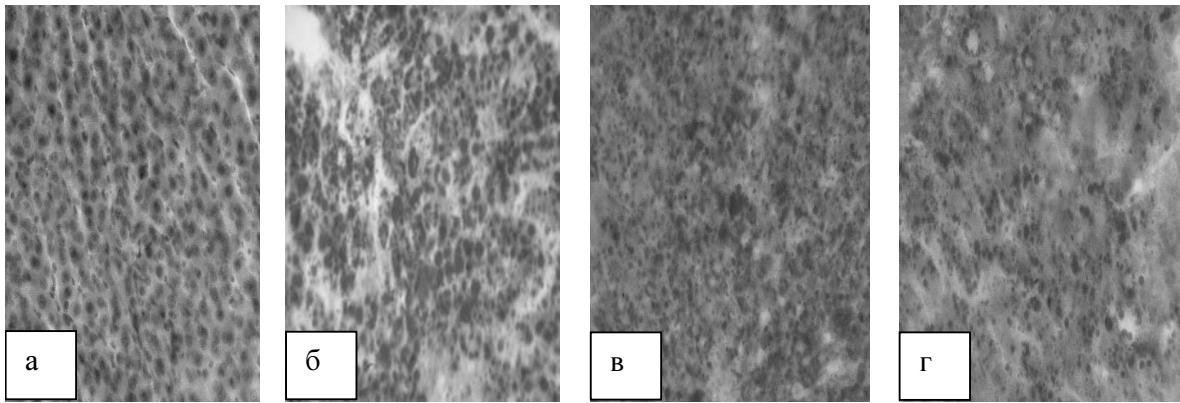


Рис. 7. Печінка щура за умов Et+TXM-гепатиту, лікованого референс-препаратом “Силібор” у дозі 50 мг/кг (в, г), порівняно з інтактом (а) та КП (б): в – цитоплазма більшості гепатоцитів містить дрібнокраплинні ліпідні включення; г – зменшення гепатоцитів з ліпідними краплями у цитоплазмі. Судан, заморожений зріз. $\times 250$.

Таблиця – Вплив екстракту з трави люцерни посівної, порівняно із силібором, на показники напівкількісної оцінки стану паренхіми печінки щурів за умов субхронічного етанол-тетрахлорметанового гепатиту

Показник	Умова досліджу			
	інтактний контроль	етанол-тетрахлорметановий гепатит		
		контрольна патологія	ЕТЛП, 2 мг/кг	силібор, 0 мг/кг
Жирова дистрофія	0 (0; 0)	3 (3; 4)*	2 (2; 2)*/**	2, (2; 3)*/**
Некротичні зміни гепатоцитів	0 (0; 0)	2 (2; 2)*	0,1 (0; 1)**	0, (0; 1)**
Розповсюдженість зон деструкції	0 (0; 0)	3 (2; 3)*	1 (1; 2)*/**	2 (1; 2)*/**
Судинні розлади	0 (0; 0)	1 (1; 1)*	0 (0; 0)**	0 (0; 0)**
Запальна реакція	0 (0; 0)	2 (1; 2)*	0 (0; 0)**	1 (0; 1)**

Примітки:

1. * – відмінності статистично значущі відносно групи інтактного контролю (критерій Крускала–Уоліса та Манна–Уїтні) на рівні значущості $p < 0,05$.

2. ** – відмінності статистично значущі відносно групи контрольної патології (критерій Крускала–Уоліса та Манна–Уїтні) на рівні значущості $p < 0,05$.

структуру та стан гепатоцитів (табл.). Так, спостерігали достовірно відносно групи КП зниження вираження: жирової дистрофії під впливом ЕТЛП – в 1,5 раза, силібору – в 1,2 раза, некротичних змін гепатоцитів – у 200 та 40 разів відповідно; розповсюдженості зон деструкції – в 3 й 1,5 раза відповідно; запальної реакції – на 100 та 50 % відповідно (до 0 й 1 відповідно); судинних розладів – на 100 % (до 0) під впливом обох препаратів (табл.).

ВИСНОВКИ. Профілактично-лікувальне введення щурам за умов субхронічного етанол-тетрахлорметанового гепатиту ЕТЛП у дозі 25 мг/кг викликає зворотні зміни гепатоцитів та їх відновлення, за вираженням яких ЕТЛП має перевагу над референс-препаратом “Силібор” у дозі 50 мг/кг, який є стимулятором синтезу білка, що пояснюється здатністю ЕТЛП

бути донором білка та амінокислот і, таким чином, поновлювати ендогенний пул білка, нормалізувати білковий обмін гепатоцитів та органа в цілому. Під впливом ЕТЛП зони деструкції печінкової паренхіми скорочуються, зменшується вираження жирової дистрофії, активуються процеси фізіологічної регенерації: виражений поліморфізм ядер, більша популяція двоядерних клітин. Зменшення мітозу можна пояснити збереженням під впливом ЕТЛП достатньої популяції морфологічно повноцінних гепатоцитів, здатних відновити пошкоджені ділянки печінкової паренхіми та забезпечити функціонування органа на достатньому рівні. Отже, в роботі гістоморфологічно обґрунтовано доцільність використання ЕТЛП за рахунок корекції білкового обміну в гепатоцитах для профілактики та лікування хронічних захворювань печінки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

ЮцГринштейн СцВцСтруктурнофункциональные особенности мембранных белков 1 СцВцГринштейнН

ОцАцКост 11 Успц биолц химиц – жРРяц – 41ц – Сц77–яРЦц

2. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.

3. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрьоменко [та ін.] // Фармац. часопис. – 2008. – № 2(6). – С. 27–30.

4. Ежова Г. П. Биомедицинские исследования гомеостаза организма человека : учеб.-метод. пособ. / Г. П. Ежова, А. А. Бабаев. – Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет, 2010. – 80 с.

5. Медико-демографічна ситуація та організація медичної допомоги населенню у 2010 році: підсумки

діяльності системи охорони здоров'я та реалізація Програми економічних реформ на 2010–2014 роки “Заможне суспільство, конкурентоспроможна економіка, ефективна держава”. – К. : МОЗ України, 2011. – 104 с.

6. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – М. : Медицина, 1969. – 424 с.

7. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий [и др.] // Суч. пробл. токсикології. – 2005. – № 3. – С. 20–26.

Р. Ф. Єрьоменко. Л. М. Малоштан
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКСТРАКТА С ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА ПРИ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

Резюме

По результатам проведенных гистоморфологических исследований установлено, что экстракт с травы люцерны посевной в дозе 25 мг/кг, будучи донором белка и аминокислот, лучший, чем препарат сравнения “Силибор” в дозе 50 мг/кг, который является стимулятором синтеза белка, способным восстанавливать состояние гепатоцитов в условиях субхронического этанол-тетрахлорметанового гепатита за счет обновления эндогенного пула белка, нормализации белкового обмена гепатоцитов и органа в целом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экстракт с травы люцерны посевной, белковый обмен, субхронический гепатит, коррекция белкового обмена.

R. F. Yeriomenko, L. M. Maloshtan
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

HISTOMORPHOLOGICAL PROOF FOR USE OF EXTRACT MEDICAGO SATIVA SOWING GRASS FOR CORRECTION OF PROTEIN METABOLISM IN LIVER DISEASE

Summary

According to the histomorphological results of the studies it was found that EGMS in a dose of 25 mg/kg, as a donor for protein and amino acids, is better than the reference drug “Silibor” in a dose of 50 mg/kg, which is a stimulator of protein synthesis, capable of reducing the state of hepatocytes under subchronic ethanol carbon tetrachloride hepatitis on account of renovation of the endogenous pool of protein, normalization of protein metabolism of hepatocytes and organ on the whole.

KEY WORDS: extract *Medicago sativa* sowing grass, protein metabolism, subchronic hepatitis, correction of protein metabolism.

Отримано 12.12.13

Адреса для листування: Р. Ф. Єрьоменко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.