



EDN: JWNRVС

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-199-3-86-92>

Экспериментальный лекарственный гепатит. Гепатопротекторные эффекты препарата Лаеннек на моделях токсического повреждения печени парацетамолом или алкоголем*

Громова О. А.¹, Торшин И. Ю.¹, Демидов В. И.², Жидоморов Н. Ю.², Калачева А. Г.², Богачева Т. Е.², Гришина Т. Р.²

¹ Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН (ФИЦ ИУ РАН), (ул. Вавилова, д. 44, корп. 2, Москва 119333, Россия)

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Шереметевский проспект, д. 8, г. Иваново 153012, Россия)

Для цитирования: Громова О. А., Торшин И. Ю., Демидов В. И., Жидоморов Н. Ю., Калачева А. Г., Богачева Т. Е., Гришина Т. Р. Экспериментальный лекарственный гепатит. Гепатопротекторные эффекты препарата Лаеннек на моделях токсического повреждения печени парацетамолом или алкоголем. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;199(3): 86–92. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-199-3-86-92

✉ Для переписки:

Громова Ольга Алексеевна
unesco.gromova@gmail.com

Громова Ольга Алексеевна, д-р мед. наук, проф., в.н.с., научный руководитель Института Фармакоинформатики

Торшин Иван Юрьевич, к.ф.-м.н., к.х.н., с.н.с.

Демидов Вадим Игоревич, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой патологической анатомии

Жидоморов Николай Юрьевич, доцент кафедры фармакологии

Калачева Алла Геннадьевна к.м.н., доцент кафедры фармакологии

Богачева Татьяна Евгеньевна к.м.н., доцент кафедры фармакологии

Гришина Татьяна Романовна, д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии

Резюме

Гепатопротекторы необходимы для терапии алкогольных и неалкогольных (в т.ч. лекарственных) поражений печени. В настоящей работе представлены результаты исследования гепатопротектора «Лаеннек», производимого на основе фармацевтически стандартизированных гидролизатов плаценты человека (ГПЧ). Применение ГПЧ при токсическом поражении печени алкоголем или парацетамолом приводило к достоверному снижению маркёров дисфункции печени (АСТ, АЛТ, билирубин, МДА), которые повышаются при воспроизведении моделей. Гепатопротекторный эффект Лаеннека подтверждён результатами гистологических исследований, указывающими на снижение воспаления и сохранение паренхимы печени. Гистологические исследования также указали на нефропротекторный и кардиопротекторный эффекты Лаеннека при поражении печени и алкоголем, и парацетамолом.

Ключевые слова: лекарственное повреждение печени, парацетамол, алкоголь, гидролизаты плаценты человека, Лаеннек, гепатопротекция.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

* Иллюстрации к статье –
на цветной вклейке
в журнал.

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-199-3-86-92>

Experimental medicinal hepatitis. Hepatoprotective effects of the drug Laennec in models of toxic liver injury with paracetamol or alcohol*

O. A. Gromova¹, I. Yu. Torshin¹, V. I. Demidov², N. Yu. Zhidomorov², A. G. Kalacheva², T. E. Bogacheva², T. R. Grishina²¹ Federal Research Center "Computer Science and Control" of Russian Academy of Sciences, 42, Vavilova Str., Moscow, 119333 Russia² Ivanovo State Medical Academy, 8, Sheremetevskiy avenue, Ivanovo, Russia

For citation: Gromova O. A., Torshin I. Yu., Demidov V. I., Zhidomorov N. Yu., Kalacheva A. G., Bogacheva T. E., Grishina T. R. Experimental medicinal hepatitis. Hepatoprotective effects of the drug Laennec in models of toxic liver injury with paracetamol or alcohol. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;199(3): 86–92. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-199-3-86-92

Olga A. Gromova, Professor, Doctor of Medical Sciences, Science Head of the Institute of Pharmacoinformatics, leading researcher of the Department of Intellectual Systems; SPIN: 6317–9833, Scopus Author ID: 7003589812, ORCID: 0000–0002–7663–710X, ResearcherID: J-4946–2017

✉ **Corresponding author:**
Olga A. Gromova
unesco.gromova@gmail.com

Ivan Yu. Torshin, PhD in Applied Mathematics, Institute of Pharmacoinformatics, leading researcher of the Department of Intellectual Systems; SPIN: 1375–1114, ORCID: 0000–0002–2659–7998, ResearcherID: G-7683–2018

Demidov Vadim Igorevich, Head of the Department of Pathological Anatomy; ORCID: 0000–0002–1064–8201, Scopus Author ID: 56806409700, ResearcherID: F-9158–2019

Nikolai Yu. Zhidomorov, Associate Professor of the Department of Pharmacology; SPIN: 4226–9075, ORCID: 0000–0002–0222–1451

Alla G. Kalacheva, PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology; ORCID: 0000–0001–6144–5781

Tatiana E. Bogacheva, PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology; ORCID: 0000–0002–5042–4886

Tatiana R. Grishina, Head of the Department of pharmacology; ORCID: 0000–0002–1665–1188

Summary

Hepatoprotectors are necessary for the treatment of alcoholic and non-alcoholic (including medicinal) liver damage. This paper presents the results of a study of the Laennec hepatoprotector, produced on the basis of pharmaceutically standardized human placental hydrolysates (HPH). The use of HSP in toxic liver damage with alcohol or paracetamol led to a significant decrease in markers of liver dysfunction (AST, ALT, bilirubin, MDA), which increase when the models are reproduced. The hepatoprotective effect of Laennec was confirmed by the results of histological studies, indicating a reduction in inflammation and preservation of the liver parenchyma. Histological studies also indicated the nephroprotective and cardioprotective effects of Laennec in liver damage with both alcohol and paracetamol.

* Illustrations to the article are on the colored inset of the Journal.

Keywords: drug-induced liver injury, paracetamol, alcohol, human placenta hydrolysates, Laennec, hepatoprotection

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Печень – жизненно важный орган, постоянно подвергающийся значительным нагрузкам, в т.ч. токсических ксенобиотиков – алкоголя, лекарственных средств (ЛС), плохо-усвояемых синтетических жиров и т.п. Лечение и реабилитация пациентов с лекарственными поражениями печени (ЛПП) большая проблема для здравоохранения разных стран. По данным глобальной базы данных о зарегистрированных неблагоприятных осложнениях при приеме лекарств (VigiBase, <https://who-umc.org/vigibase/>) на 2022 г. гепатотоксичность является самым распространенным побочным эффектом при приеме лекарственных средств, а парацетамол (ацетаминофен), при этом, занимает лидирующую

позицию по частоте случаев поражения печени (LiverTox® (<http://livertox.nlm.nih.gov>)). Высокие дозы парацетамола приводят к частым предсказуемым реакциям, связанным с фармакологической активностью ЛС (т.е. относятся к максимальному варианту «Тип А» нежелательных эффектов по классификации лекарственных поражений печени).

Токсическое действие ксенобиотиков усугубляется на фоне микронутриентных дефицитов (витаминов, холина, омега-3 ПНЖК и др.). Часто встречаются случаи токсического поражения печени лекарственными препаратами. Например, парацетамол широко используется при лечении самых различных заболеваний и относится

к фармакологическим агентам, которые наиболее часто вызывают ЛПП. Препараты на основе парацетамола, как правило, относятся к группе безрецептурных препаратов, что увеличивает риск самолечения и превышения рекомендуемой дозы. Нередки и алкогольные заболевания печени (алкогольный гепатит, стеатоз и цирроз).

Комплексная терапия лекарственного или алкогольного гепатита требует использования безопасных многофункциональных гепатопротекторов. Гидролизаты плаценты человека (ГПЧ) с высокой степенью фармацевтической стандартизации представляют собой одно из наиболее перспективных направлений гепатопротекции.

Например, ГПЧ «Лаеннек» представляет собой мультикомпонентный высокоочищенный препарат на основе гидролизата плаценты человека и содержащий полифункциональные пептидные фрагменты с противовоспалительным и регенераторным действием, витамины (B_1 , B_2 , PP, B_{12} , C), аминокислоты (например, цистеин), различные макро- и микроэлементы (серу, кобальт, цинк, селен и др.), проявляющие гепатопротекторные эффекты [1]. Препарат зарегистрирован для лечения таких заболеваний печени, как K70.0 Алкогольная жировая дистрофия печени, K76.0 Жировая дегенерация печени, K76.9 Болезнь печени неуточненная, а также для терапии atopического дерматита и неуточненной герпетической инфекции.

Благодаря особенностям пептидного состава ГПЧ Лаеннек может способствовать регенерации гепатоцитов, восстанавливать нарушенную функцию печени и других органов. Например, в работе [2] представлены результаты анализа пептидного состава препарата Лаеннек с точки зрения метаболического синдрома (который, подчеркнём, включает жировое поражение печени). Масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование «лёгкой» (до 1200 Да) пептидной фракции

препарата позволило найти в составе ГПЧ пептиды LAGSGPAG (ингибитор тирозинкиназы BTK), VGPLGPLGPAG (ингибитор рецепторов андрогенов), DLGLPGAPGAP (ингибитор провоспалительной арахидон 5-липоксигеназы ALOX5) и GPSLGP (ингибитор провоспалительного воспаления NF- κ B). Позднее было обнаружено, что весьма похожий по аминокислотному составу и структуре пептид GPPGPAG легко переносится через гематоэнцефалический барьер и улучшает дисфункцию памяти и атрофию дендритов у мышей с моделью болезни Альцгеймера [3].

Наиболее ярко гепатопротекторные и другие регенераторные свойства ГПЧ Лаеннек были продемонстрированы в терапии пациентов с COVID-19 на фоне дисфункции печени с гиперферритинемией и с повышенным риском «цитокинового шторма». Лаеннек (6 мл/сут) применялся у 14 пациентов с длительным, застойным течением COVID-19 в составе комплексной терапии. Пациенты в контрольной группе ($n=14$) получали только комплексную терапию, рекомендованную МЗ РФ. Применение Лаеннека приводило к положительной клинической динамике: снижению уровней ферритина, увеличению оксигенации крови, снижению объема повреждения легких по данным КТ и, что важно, нормализации маркеров дисфункции печени (АСТ, АЛТ) ($P<0.05$) [4]. Эффекты ГПЧ (6 мл/сут, 10 дней) при лечении COVID-19 подтверждены в независимом исследовании пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания ($n=22$): ГПЧ оказывал более благоприятное влияние на динамику АСТ и АЛТ и снижал сроки пребывания больных в стационаре [5].

Целью данной работы является исследование гепатопротекторной эффективности Лаеннека при экспериментальном повреждении печени различными гепатотоксинами (парацетамол, алкоголь) у крыс.

Материалы и методы

Опыты проводились на 45 самцах белых крыс линии Вистар массой 200–300 г. Животные были разделены на 5 групп: 1-я группа – интактный контроль, остальные – группы с экспериментальными моделями поражения печени (2 и 3 группы – модель алкогольного поражения печени, 4 и 5 – повреждение печени токсической дозой парацетамола) [6].

Животные 4 и 5 групп получали однократно парацетамол в виде суспензии, вводимой в желудок в дозе 700 мг/кг [7]. Для создания алкогольной модели повреждения печени крысам через зонд в желудок вводили 40% раствор этилового спирта из расчета 8 мл/кг в течение 7 дней. Опытным группам 3 (Алкоголь + Лаеннек) и 5 (Парацетамол + Лаеннек) на протяжении последующих 3 недель внутрибрюшинно вводился Лаеннек, разведенный стерильным физиологическим раствором (из расчета 0,1 мл/кг Лаеннека, регистрационный номер П N013851/01, Джапан Био Продактс Ко., Япония). Крысы 2-й (алкоголь, контроль) и 4-й групп (Парацетамол, контроль) служили модельным

контролем и получали внутрибрюшинно физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Через сутки после окончания курсового применения Лаеннека крыс декапитировали под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг внутрибрюшинно). В сыворотке крови определяли АСТ, АЛТ (с помощью стандартного набора Lachema), уровни общего белка биуретовым методом, прямого и общего билирубина (с помощью стандартных наборов Ольвекс) и малонового диальдегида (МДА) по методу Jagi [8]. В группах сравнения проводилось определение интенсивности процесса перекисного окисления липидов в сыворотки крови методом индуцированной хемолюминисценции. Статистическая обработка данных производилась с помощью программа «Statistica 10», в электронных таблицах Excel; статистическая значимость корреляций оценивалась гетероскедастическим тестом Стьюдента и тестом хи-квадрат.

Проведены патогистологические исследования секционных материалов печени, миокарда, почек. Фиксация органов проводилась в 10% растворе

нейтрального формалина, проводка образцов – через обезживание этиловым спиртом с последующей заливкой парафином. Срезы толщиной 5–6 мкм изготавливались после депарафинизации образцов на санном микротоме. Окрашивание препаратов

проводилось гематоксилином и эозином по стандартным методикам [9]. Микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа “Micros” на анализаторе изображения “BioVision” (Австрия).

Результаты исследования

Результаты определения биохимических показателей крови суммированы в *таблице 1*. Результаты показывают, что и однократный прием парацетамола, и 7-дневная алкоголизация животных

приводили к повреждениям печени, на что указывают изменения биохимических показателей (*Таблица 1*) и гистологическая картина поражения печени.

Показатель Группа	АЛТ, мккат/л	АСТ, мккат/л	Общий белок, г/л	МДА, ммоль/л	Общий билирубин, мкмоль/л	Креатинин, мкмоль/л
1. Интактные	0.29±0.16	0.49±0.04	73±5	6.8±1.4	5.8±1.7	73±7
2. Алкоголь, контроль	0.44±0.12**	0.64±0.19**	71±6	7.7±0.6**	10.5±2.5**	70±6
3. Алкоголь, Лаеннек	0.32±0.06*	0.53±0.04*	70±5	6.4±0.9*	6.4±0.6*	71±5
4. Парацетамол, Контроль	0.8±0.4**	0.51±0.02	73±3	7.9±1.3**	11±2.5**	96±30**
5. Парацетамол, Лаеннек	0.7±0.2*	0.50±0.03	72±2	6.8±0.8*	9.1±2.5*	77±11*

Таблица 1.

Биохимические показатели функции печени в различных моделях химического поражения печени и эффекты ГПЧ Лаеннек.

Примечание.

«*» – достоверные различия (Стьюдент $p \leq 0,05$) по сравнению с показателями в соответствующей контрольной группе; «**» – достоверные различия по сравнению с интактными

Исследованные биохимические параметры отражают функциональное состояние печени в результате воспроизведения моделей токсического поражения печени. При этом, профиль биохимических изменений различался в моделях алкогольной и парацетамоловой интоксикации по сравнению с интактными животными. Так, в парацетамоловой модели статистически значимыми являлись только повышение АЛТ ($p=0.008$), МДА ($p=0.051$), общего билирубина ($p=0.002$) и креатинина ($p=0.04$). В алкогольной модели наблюдалось статистически значимое повышение (по сравнению с группой 1) уровней АСТ ($p=0.05$), АЛТ ($p=0.03$), МДА ($p=0.053$) и общего билирубина ($p=0.002$).

Воспроизведение моделей отравления печени парацетамолом или алкоголем имело патогистологическое подтверждение. Во всех наблюдениях интактных животных, микроскопическая картина ткани печени соответствовала норме. В интактной группе, вены и синусоиды обычного кровенаполнения, единичные клетки воспалительного характера в портальных трактах. Единичные гепатоциты содержат вакуоли с цитоплазматической жидкостью, что полностью соответствует норме. В пределах отдельно взятой печеночной дольки при сохранении гистоархитектоники наблюдалась равномерная перфузия синусоидов как в центральной и в перипортальной зонах, гепатоциты имели привычную конфигурацию и равномерную окраску, в строме портальных трактов присутствовали единичные лимфоциты (*рис. 1А на цветной вклейке в журнал*).

При алкогольном поражении печени, центральные вены расширены и полнокровны, в процесс полнокровия вовлечены синусоиды центров печеночных долек, в просветах сосудов краевое состояние нейтрофилов с инфильтрацией нейтрофилами портальных трактов и синусоидов перипортальной

зоны (*рис. 1Б*). Повреждения клеток печени отчетливые и проявляются в виде мелкокапельного ожирения гепатоцитов центральных отделов печеночных долек; в единичных долях сформированы цетрлобулярные некрозы (*рис. 1В*). Единичные гепатоциты содержат эозинофильные включения, что позволяет расценивать их как тельца Маллори, имеет место диффузно-очаговый внутриклеточный холестаз.

При воспроизведении модели поражения печени парацетамолом отмечалось умеренно выраженное полнокровие центральных вен и синусоидов, в которых наблюдались единичные лейкоциты (*рис. 1Г*). В строме портальных трактов формировался лимфо-гистиоцитарный инфильтрат с примесью единичных эозинофилов (*рис. 1Д*). На фоне расстройства кровообращения и воспалительно-клеточной реакции отмечалось фокальное повреждение гепатоцитов преимущественно в центрах печеночных долек, что выражалось вакуольной (белковой гидропической) дистрофией отдельных клеток и изменением интенсивности окраски цитоплазмы гепатоцитов (*рис. 1Е*). В составе лимфо-гистиоцитарных инфильтратов стромы портальных трактов увеличилось количество эозинофильных лейкоцитов (*рис. 1Ж*). Для поврежденных гепатоцитов характерны субтотальный характер гидропической вакуольной дистрофии (*рис. 1З*), наличие в центрах печеночных долек гепатоцитов с изменением интенсивности окраски цитоплазмы, кариолизис и внутриклеточный холестаз (*рис. 1И*).

Таким образом, токсическое воздействие парацетамола на печень имело гистологическое подтверждение. Были выявлены морфологические маркеры гепатотоксичности парацетамола: (1) развитие острого венозного полнокровия печени, (2) формирование воспалительно-клеточного

Table 1.

Biochemical parameters of liver function in various models of chemical liver injury and the effects of Laennec HSP.

инфильтрата с участием эозинофильных лейкоцитов (что соответствует формированию острого лекарственного гепатита), (3) гидропическая (вакуолярная) дистрофия гепатоцитов, (4) гепатоциты со сниженной интенсивностью окраски цитоплазмы (что указывает на нарушение биосинтеза гликогена в клетках печени).

В соответствии со значениями биохимических показателей, применение Лаеннека в течение 3-х недель у животных с алкогольным поражением печени проявляло достоверный гепатопротекторный эффект. Как было отмечено выше, статистически значимыми биохимическими показателями для алкогольной модели являлись уровень АСТ, уровень АЛТ и общий билирубин. Применение ГПЧ Лаеннек у животных с моделью острого повреждения печени парацетамолом способствовало нормализации уровня АЛТ, МДА, билирубина, креатинина; значимых изменений в уровнях АСТ и общего белка не наблюдалось (Рис. 2). Применение Лаеннека приводило к снижению уровней АЛТ (от 0.44±0.11 до 0.32±0.06 мккат/л, p=0.01) и общего билирубина (от 10.5±2.5 до 6.4±0.6 мкмоль/л, p=0.002).

Хемилюминисцентная оценка интенсивности процессов перекисного окисления липидов

в парацетамоловой модели (Таблица 2) показала, что при остром гепатите, вызванном парацетамолом, наблюдается достоверное повышение показателей свободно-радикального окисления (S, S₁max, α, Z, Z₁max) по сравнению с интактным контролем. Применение Лаеннека, наоборот, способствовало снижению значений про-оксидантных показателей.

Например, показатель «S» (т.н. «светосумма хемолюминисценции») отражает содержание радикалов RO₂, соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления соединений, обладающих как антиоксидантным, так и прооксидантным действием. Значение S повышалось от 888±165 мВ-сек в интактном контроле до 1247±216 мВ-сек при отравлении печени парацетамолом. Применение Лаеннека соответствовало достоверному снижению S до 908±74 мВ-сек.

Аналогично, при воспроизведении парацетамоловой модели повышались значения показателей S₁max, α, Z, Z₁max, а применение Лаеннека приводило к снижению этих показателей (Таблица 2). Таким образом, ГПЧ Лаеннек уменьшал перекисное окисление липидов, вызванное гепатотоксичным парацетамолом, и повышал антиоксидантную защиту организма.

Таблица 2.
Показатели интенсивности процесса перекисного окисления липидов в плазме крови в парацетамоловой модели поражения печени (по данным хемилюминисценции).

Примечание:
достоверные отличия (тест Манна-Уитни, p<0,05): * – по сравнению с интактным контролем;® – по сравнению с парацетамоловой моделью.

Table 2.
Indicators of the intensity of the process of lipid peroxidation in blood plasma in the paracetamol model of liver damage (according to chemiluminescence data).

Группа	S, мВ-сек	S ₁ max, мВ-сек	α, у.е	Z, сек.	Z ₁ max, сек.
Контроль интактный	888±165	842±156	0,23±0,04	13,7±2,1	13,0±2,0
Парацетамол (14 дней)	1247±216*	1197±210*	0,35±0,03*	21,1±2,1*	20,3±2,0*
Парацетамол +Лаеннек	908±74®	852±74®	0,20±0,03®	12±1,6®	11,3±1,6®

Гистологическое исследование тканей печени показало значимое улучшение состояния ткани печени при употреблении препарата Лаеннек по сравнению с контрольными группами (модели токсического повреждения печени без применения ГПЧ Лаеннек). В группе животных с алкогольной моделью, проходивших инъекции Лаеннека, сохранялось умеренно выраженное полнокровие центров печеночных долек. Однако, воспалительно-клеточная инфильтрация найдена лишь в зонах портальных трактов – от слабой до умеренной (в составе клеточного инфильтрата – лимфоциты и единичные нейтрофилы). В перипортальных зонах обнаруживаются единичные двуядерные гепатоциты, что указывает на рост и восстановление паренхимы печени под воздействием биоактивных пептидов Лаеннека.

Гистологическое исследование, показало, что Лаеннек проявляет не только гепатопротекторное, но и нефропротекторное, и кардиопротекторное действие. При использовании Лаеннека у животных с алкогольным поражением печени установлено заметное улучшение состояния паренхимы почек и миокарда. В то время как в контрольной группе наблюдались отек стромы почек, гиалиново-капельная дистрофия клеток эпителия проксимальных извитых канальцев и даже фокальный некроз нефроцитов, выраженность этих патологических проявления была гораздо слабее при приеме препарата. Выраженность отека стромы и диффузное пылевидное ожирение кардиомиоцитов было гораздо сильнее в контрольной

группе (группа 2) по сравнению с группой Алкоголь + Лаеннек (группа 3).

Однократное введение парацетамола в токсической дозе, как и длительная алкоголизация, приводило к повреждению печени. В контрольной группе (только парацетамол) имело место выраженная лейкоцитарная инфильтрация портальных трактов. Мелкокапельное ожирение гепатоцитов носило диффузно-очаговый характер с преимущественной локализацией в центральных зонах печеночных долек (рис. 3А), единичные гепатоциты в состоянии некроза. Применение Лаеннека приводило к уменьшению повреждения паренхимы и к регенерации гепатоцитов. Повреждения гепатоцитов ограничены мелкокапельным ожирением в отдельных очагах. Регенеративная активность печени в этой группе наблюдений выражена по-разному: у 2 из 6 животных регенерация не была выраженной и ограничивалась наличием единичных двуядерных гепатоцитов. В тоже время у 4 из 6 животных этой группы регенерация была выражена очень интенсивно, с появлением многочисленных гепатоцитов с фигурами митозов (рис. 3Б).

Применение Лаеннека у животных с парацетамоловой моделью также показало и кардиопротекторный эффект препарата. В контрольной группе (группа 4, только парацетамол), наблюдались выраженный гемостаз и отек стромы миокарда, неравномерная окраска сократительных волокон. Отмечено пылевидное ожирение кардиомиоцитов. В то же время, в группе животных,

получавших Лаеннек, гистологических признаков повреждений кардиомиоцитов не отмечалось. В составе лимфо-гистиоцитарных инфильтратов стромы порталных трактов присутствовали единичные эозинофильные лейкоциты (рис. 3В). Гидропическая дистрофия гепатоцитов носила очаговый характер и была выявлена только в 2 из 6 наблюдений (рис. 3Г). Использование при окраске

гистологических срезов реактива Шиффа позволила выявить единичные гепатоциты со сниженной интенсивностью окраски цитоплазмы (рис. 3Д).

В целом, использование ГПЧ Лаеннек способствовало снижению уровня повреждения гепатоцитов. Препарат оказывал умеренное влияние на степень расстройства кровообращения и выраженность ответной воспалительно-клеточной реакции.

Обсуждение результатов

В настоящей работе показано, что при остром отравлении печени парацетамолом, как и при хроническом отравлении алкоголем, применение ГПЧ Лаеннек способствует сохранению структуры и функции печени. Функция печени оценивалась посредством измерения концентраций биохимических маркёров (АСТ, АЛТ, билирубин, МДА), а состояние ткани – посредством гистоморфометрии.

Выбор биохимических маркёров очевиден. Повышение уровней ферментов АСТ и АЛТ в крови является индикатором цитолиза гепатоцитов. Билирубин, один из промежуточных продуктов распада гемоглобина в гепатоцитах, также является цитолитическим маркёром. Малоновый диальдегид (МДА) образуется при деградации жиров и является маркёром оксидативного стресса. В описанной серии экспериментов уровни эти маркёров достоверно снижались при применении ГПЧ «Лаеннек».

Ранее, были проведены исследования эффективности ГПЧ на других моделях поражения печени: неалкогольном стеатогепатите (НАСГ, в т.ч. в сочетании с перегрузкой железом) [10] и при поражении печени антифолатным препаратом метотрексат [11].

В модели НАСГ у крыс ГПЧ Лаеннек предотвращал трансформацию НАСГ в цирроз печени посредством снижения продукции про-воспалительного ФНО α , подавления активности звездчатых клеток печени и торможения фибротических изменений печени. Крысам линии SHRSP5/Dmcr на диете с высоким содержанием жиров и холестерина подкожно вводился ГПЧ или физ. р-р в дозе 3,6 мл/кг массы тела (3 р/нед., 8 нед.). Введение ГПЧ начинали с 4-й недели патологической диеты поскольку именно после этого срока развивается НАСГ. К 12-й неделе эксперимента в группе ГПЧ размер фиброзных коллагеновых волокон достоверно снижались. Степень иммуноокрашивания на ФНО α , 4HNE (гидроксиалкенал, который продуцируется при перекисном окислении клеточных липидов) и α SMA (α -актин миоцитов гладких мышц, маркёр патологических фибробластов) была значительно слабее, чем в контроле. АСТ, АЛТ, холестерин и триглицериды снижались [10].

ГПЧ Лаеннек уменьшал фиброз печени в модели НАСГ у мышей, воспроизведённой посредством диеты с дефицитом метионина/холина. Патологическая диета вызывала атрофию печени, сопровождающуюся фиброзом вокруг синусов печени. У мышей, получавших диету, выявлена баллонная дистрофия гепатоцитов, фиброзные изменения (преимущественно вокруг сосудистых стенок центральных вен, порталных вен и синусов, Рис. 4). ГПЧ значительно снижал экспрессию генов Acta2, Col1a1 и Tgfb1 в звездчатых

клетках печени и ингибировал профибротические молекулярные пути (фосфорилирование сигнальных белков Smad). Кроме того, ГПЧ увеличивал экспрессию антиоксидантных генов Hmox1, Nqo1, Cat и Sod1 и снижал уровни внутриклеточных активных форм кислорода, что способствует снижению профибротических изменений печени при НАСГ [12].

НАСГ связан с гемосидерозом – патологическим отложением железа в тканях в виде оксидов и гидроксидов. Ранее, нами было показано, что длительное (2 мес) применение сульфата железа или железа в составе полимальтозного комплекса приводило к гемосидерозу печени и других органов у крыс. Применение Лаеннека приводило к снижению повреждений гепатоцитов, нормализации АЛТ и снижению гемосидероза печени, почек и головного мозга [13].

Была показана эффективность Лаеннека в терапии гемосидероза на фоне НАСГ: ГПЧ снижал повреждение печени, вызванное перегрузкой железом, подавляя воспаление, окислительный стресс и отложение железа, также усиливая экскрецию железа. Модель НАСГ у мышей воспроизводилась путем комбинирования диеты с дефицитом метиона/холина и диеты с перегрузкой железом (добавка ультрадисперсного металлического железа, т.н. карбонильного железа) для мышей линии C57BL/6. Уже через 1 неделю после начала эксперимента в срезах печени отмечалось отложение железа вокруг воротной вены, которое впоследствии распространялось по всей паренхиме. Концентрация железа в желчи была повышена в течение 12 недель эксперимента. Патологическая диета вызывала повышение сывороточного гепсидина, ускоряющего выведение железа из организма, и накопление F4/80-позитивных макрофагов. Отмечена повышенная печеночная экспрессия генов, связанных с воспалением и окислительным стрессом. Через 3–4 недели лечение ГПЧ приводило к заметному уменьшению гемосидероза печени, увеличению экскреции железа с желчью, снижению экспрессии генов оксидантного стресса и накопления макрофагов на 50% [14].

ГПЧ Лаеннек ослаблял гепатотоксичность метотрексата у крыс путем регулирования антиоксидантной и противовоспалительной реакции. Гистопатологические исследования показали, что метотрексат вызывал выраженные повреждения клеток, воспаление в тканях печени. Крысы, получавшие метотрексат, показали значительно повышенные уровни АСТ, АЛТ, ЩФ, общего билирубина, общего холестерина и триглицеридов. Подкожное введение ГПЧ снижало повышенные уровни этих маркёров дисфункции печени, уменьшало уровни МДА (как и в настоящем исследовании),

уровни провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-10 и тормозило снижение глутатиона (GSH) и улучшало гистологическую структуру печени [11].

Гистологический анализ срезов печени крыс, получавших метотрексат, выявил гепатоцеллюлярные повреждения с выраженной цитоплазматической вакуолизацией, расширениями и гиперемией синусов и центральных вен, диффузной перипортальной лейкоцитарной инфильтрацией

и увеличением количества клеток Купфера. В печени крыс, получавших метотрексат и ГПЧ, установлены минимальные морфологические изменения гистологических признаков во всех исследованных образцах. При этом гепатоциты выглядели нормально (полигональные, с четкими краями клеток и хорошо выраженной цитоплазмой и ядрами), что указывает на очевидную защитную роль ГПЧ против действия метотрексата [11].

Заключение

Применение ГПЧ Лаеннек проявляет отчетливый гепатопротекторный, нефропротекторный и кардиопротекторный эффекты и при остром лекарственном повреждении печени (парацетамол), и при хроническом поражении печени алкоголем. Гистологическая картина гепатопротекторного действия препарата Лаеннек подтверждается результатами биохимических исследований. У экспериментальных животных, которым вместе

с гепатотоксическим веществом (парацетамол, алкоголь) вводился ГПЧ, степень дистрофии или некроза гепатоцитов была достоверно значимо ниже, чем в контроле, а регенеративные изменения – достоверно значимо более выраженными. Поскольку парацетамол широко используется в терапии, снижение гепатотоксических эффектов парацетамола посредством ГПЧ весьма актуально, особенно у пациентов с хроническими заболеваниями печени.

Литература | References

- Reference book of medicines Vidal. Moscow. Astra-PharmService, 2021, 1298 P. (in Russ.)
Справочник лекарственных средств Видаль, М.: АстраФармСервис, 2021, – 1298 С
- Gromova O.A., Torshin I. Yu., Zgoda V.G., Tomilova I. K. Molecular mechanisms of action of the drug Laennec against the formation of metabolic syndrome and obesity. *Therapy*. 2017. No. 5. pp. 73–83. (in Russ.)
Громова О. А., Торшин И. Ю., Згода В. Г., Томилова И. К. Молекулярные механизмы действия препарата Лаеннек против формирования метаболического синдрома и ожирения. *Терапия*. 2017. № 5. С. 73–83.
- Tohda C., Kogure C., Nomoto K., de Toledo A., Yang X., Hirano E. A Novel Heptapeptide, GPPGPAG Transfers to the Brain, and Ameliorates Memory Dysfunction and Dendritic Atrophy in Alzheimer's Disease Model Mice. *Front Pharmacol*. 2021;12:680652. Published 2021 May 14. doi:10.3389/fphar.2021.680652
- Maksimov V. A., Torshin I. Yu., Chuchalin A. G., Lazebnik L. B., Tkacheva O. N., Strazhesko I. D., Gromova O. A. Efficacy and safety of the polypeptide drug (Laennec) in therapy for COVID-19. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2020;178(6): 55–63. (in Russ.) doi: 10.31146/1682–8658-ecg-178–6–55–63
Максимов В. А., Торшин И. Ю., Чучалин А. Г., Лазебник Л. Б., Ткачева О. Н., Стражеско И. Д., Громова О. А. Эффективность и безопасность полипептидного препарата (Лаеннек) в терапии COVID-19. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020;178(6): 55–63. doi: 10.31146/1682–8658-ecg-178–6–55–63.
- Sayfutdinov R. R., Maksimov V. A., Khasanov R., Akhmedov R. U., Salyakhova E. V., Sayfutdinov R. G. Possibilities of Using Placenta Hydrolysate in Patients with COVID-19. *EC Gastroenterology and Digestive System*. 2021;8(11): 91–101. (in Russ.)
- Khatriev R. U. Guidelines for conducting clinical trials of new drugs. *Medicine Publ.*, 2005, 360 p. (in Russ.)
Хабриев Р. У. Руководство по проведению клинических исследований новых лекарственных средств. Изд. Медицина, 2005, – 360 С.
- Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow. Grif and K. Publ., 2012. 944 p. (in Russ.)
Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
- Tkachuk V. A. Clinical biochemistry. Moscow. Medicine Publ., 2004, 515 P. (in Russ.)
Ткачук В. А., Клиническая биохимия, М.: Медицина, 2004, – 515 С.
- Gartner L. P. Color Atlas of Histology, 2008, 462 P.
- Kubota R., Kinoshita K., Yamagata K., Hirakawa Y., Minato T., Saito T., Ozaki I., Dojima R. Inhibitory effect of human placental extract on liver fibrosis in a NASH rat model. The 24th Annual Meeting of the Japanese Society of Hepatology. 2020, vol. 61, suppl. 2.
- Ghoneum M., El-Gerbered M.S.A. Human placental extract ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via regulating antioxidative and anti-inflammatory responses. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021;88(6):961–971. doi:10.1007/s00280–021–04349–4
- Yamauchi A., Tone T., Toledo A., et al. Placental extract ameliorates liver fibrosis in a methionine- and choline-deficient diet-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biomed Res*. 2020;41(1):1–12. doi: 10.2220/biomedres.41.1. PMID: 32092735.
- Nazarenko O. A., Gromova O. A., Grishina T. R., et al. Laennec's correction of chronic iron overload in the liver, kidneys, and brain. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2017; 2:39–44. (in Russ.)
Назаренко О. А., Громова О. А., Гришина Т. Р., Торшин И. Ю., Демидов В. И., Томилова И. К., Алексахина Е. Л., Гоголева И. В. Коррекция Лаеннеком хронической перегрузки железом печени, почек и головного мозга. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2017; 2: 39–44.
- Yamauchi A., Kamiyoshi A., Sakurai T., et al. Development of a mouse iron overload-induced liver injury model and evaluation of the beneficial effects of placenta extract on iron metabolism. *Heliyon*. 2019 May 10;5(5): e01637. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01637. PMID: 31193082

К статье

Экспериментальный лекарственный гепатит.

Гепатопротекторные эффекты препарата Лаеннек

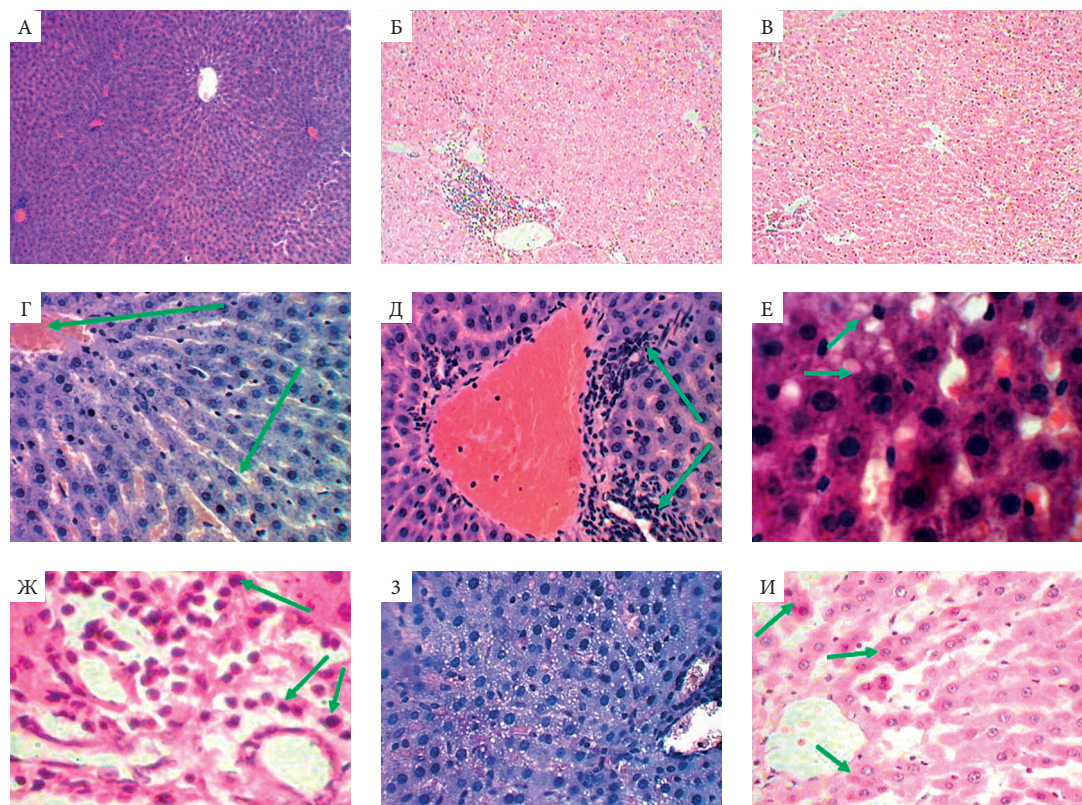
на моделях токсического повреждения печени парацетамолом или алкоголем (стр. 86–92)

To article

Experimental medicinal hepatitis. Hepatoprotective effects of the drug Laennec in models of toxic liver injury with paracetamol or alcohol (p. 86–92)

Рисунок 1.

Figure 1.



Гистология печени при воспроизведении моделей токсического поражения печени. (Б, В) – поражение печени алкоголем, (Г–И) – поражение печени парацетамолом. А) Структура неизменной печеночной дольки. Окраска гематоксилин/эозин, увеличение $\times 120$. Б) Лейкоцитарная инфильтрация портального тракта в алкогольной модели. Окрашивание на гиалин по Маллори, увеличение $\times 120$. В) Центроlobулярный некроз гепатоцитов в алкогольной модели. Окраска гематоксилин/эозин, увеличение $\times 120$. Г) Поражение печени парацетамолом: центральная вена и синусоиды в состоянии умеренно выраженного полнокровия, увеличение $\times 480$. Д) Лимфо-гистиоцитарная инфильтрация стромы портального тракта на фоне выраженного полнокровия портальной вены. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 480$. Е) Гидропическая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$. Ж) Воспалительно-клеточный инфильтрат стромы портального тракта с большим количеством эозинофилов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$. З) Субтотальная вакуольная дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 480$. И) Включения желчных пигментов в цитоплазме отдельных гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 480$.

Histology of the liver when reproducing models of toxic liver damage. (B, C) – liver damage by alcohol, (G–I) – liver damage by paracetamol. A) The structure of the unchanged hepatic lobule. Hematoxylin/eosin staining, $\times 120$ magnification. B) Leukocyte infiltration of the portal tract in the alcohol model. Hyaline staining according to Mallory, $\times 120$ magnification. C) Centrilobular necrosis of hepatocytes in the alcohol model. Hematoxylin/eosin staining, $\times 120$ magnification. D) Damage to the liver with paracetamol: the central vein and sinusoids are in a state of moderately pronounced plethora, $\times 480$ magnification. E) Lymph-histiocytic infiltration of the stroma of the portal tract against the background of pronounced plethora of the portal vein. Stained with hematoxylin and eosin, $\times 480$ magnification. F) Hydropic degeneration of hepatocytes. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 1200$. G) Inflammatory cell infiltrate of the stroma of the portal tract with a large number of eosinophils. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 1200$. H) Subtotal vacuolar dystrophy of hepatocytes. Stained with hematoxylin and eosin, $\times 480$ magnification. I) Inclusions of bile pigments in the cytoplasm of individual hepatocytes. Stained with hematoxylin and eosin, $\times 480$ magnification.

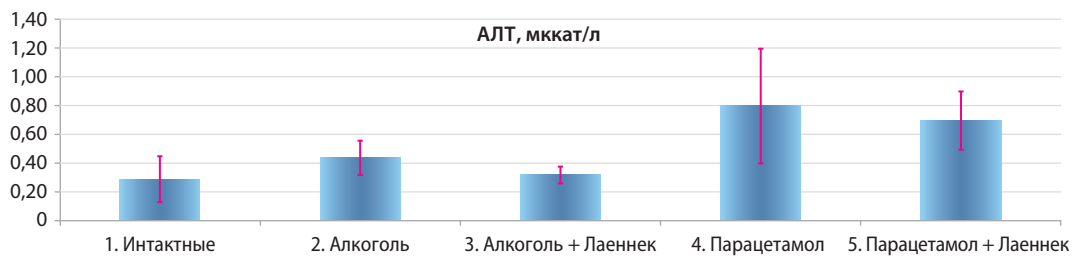
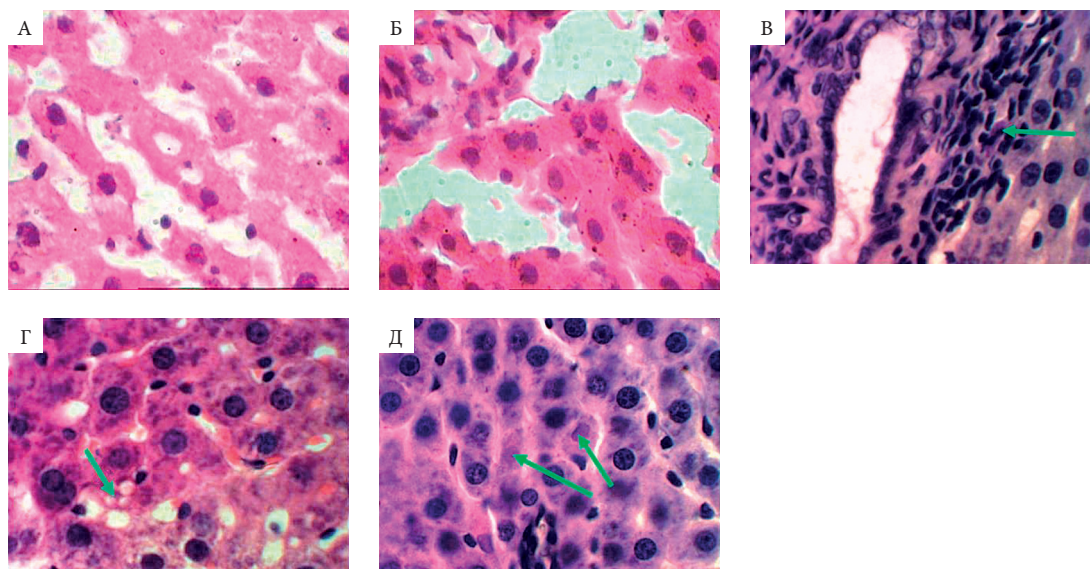


Рисунок 2.
Значения биохимических маркёров дисфункции печени при токсическом поражении печени и при использовании ГПЧ Лаеннек.

Figure 2.
Values of biochemical markers of liver dysfunction in toxic liver damage and when using Laennec HSP.

Рисунок 3.
Figure 3.



Гистология тканей печени в парацетамоловой модели поражения печени. А). Контрольная группа (парацетамол), мелкокапельное ожирение гепатоцитов. Б) Группа на ГПЧ Лаеннек, регенерация гепатоцитов. В) Единичные эозинофилы в составе лимфоги- стиоцитарного инфильтрата, увеличение $\times 1200$. Г) Вакуолизация цитоплазмы гепатоцита. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$. Д) Гепатоциты со слабо окрашенной цитоплазмой, окрашивание реактивом Шиффа, увеличение $\times 1200$.

Histology of liver tissues in the paracetamol model of liver damage. BUT). Control group (paracetamol), small droplet obesity of hepatocytes. B) Group on HSP Laennec, regeneration of hepatocytes. C) Single eosinophils in the composition of the lymphohistiocytic infiltrate, $\times 1200$ magnification. D) Vacuolization of the hepatocyte cytoplasm. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 1200$. E) Hepatocytes with weakly stained cytoplasm, stained with Schiff's reagent, $\times 1200$ magnification.

Рисунок 4.
Фиброз печени у мышей dB/dB. (А) Окрашивание Сириусом красным срезов печени мышей, получавших обычную диету или диету с дефицитом метионина и холина (ДМХ). Шкала 100 мкм. (Б) Количественное определение площади окрашивания Сириусом красным срезов печени. Площадь фиброза в срезах мышей, получавших диету ДМХ без ГПЧ, была оценена как 1. $\dagger P < 0,05$, $\dagger\dagger\dagger P < 0,001$

Figure 4.
Liver fibrosis in dB/dB mice. (A) Sirius red staining of liver sections of mice fed a normal or methionine-choline- deficient (DMC) diet. Scale 100 μm . (B) Quantification of the area of Sirius red staining of liver sections. Fibrosis area in sections of mice fed the DMX diet without HPH was scored as 1. $\dagger P < 0.05$, $\dagger\dagger\dagger P < 0.001$

