



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
[G09B 23/28 \(2006.01\)](#)
[A61K 35/50 \(2015.01\)](#)
[A61P 1/16 \(2006.01\)](#)
(52) СПК
G09B 23/28 (2023.08)
A61K 35/50 (2023.08)
A61P 1/16 (2023.08)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 20.01.2024)
Пошлина: Установленный срок для уплаты пошлины за 3 год: с 04.02.2024 по 03.02.2025. При
уплате пошлины за 3 год в дополнительный 6-месячный срок с 04.02.2025 по 03.08.2025
размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: [2023102563](#), 03.02.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.02.2023

Дата регистрации:
18.01.2024

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 03.02.2023

(45) Опубликовано: [18.01.2024](#) Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2598351 C1, 20.09.2016. RU
2599040 C1, 10.10.2016. БИБИК Е.Ю. и др.
Влияние длительного избыточного
потребления пальмового масла на
органомерические индексы печени и
надпочечных желез в эсперименте /
Проблемы экологической и медицинской
генетики и клинической иммунологии.
Сборник научных трудов, Луганск, 2018,
вып. 3 (147), стр. 62-69.

ТКАЧУК В.В. и др. Профилактика
антидисбиотическим средством квертулин
неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) у
крыс / Вісник морської медицини, 2017,
стр. 103-109. DONG-HO BAK et al.
Anti-apoptotic effects of human placental
hydrolysate against hepatocyte toxicity in vivo
and in vitro / INTERNATIONAL JOURNAL
OF MOLECULAR ME DICINE, 2018, 42,
pages 2569-2583.

Адрес для переписки:
153012, Ивановская обл., г. Иваново,
Шереметевский пр-кт, 8, ФГБОУ ВО
"Ивановская государственная
медицинская академия"

(72) Автор(ы):

Богачева Татьяна Евгеньевна (RU),
Диброва Екатерина Александровна (RU),
Громова Ольга Алексеевна (RU),
Гришина Татьяна Романовна (RU),
Калачева Алла Геннадьевна (RU),
Демидов Вадим Игоревич (RU),
Торшин Иван Юрьевич (RU),
Томилова Ирина Константиновна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Ивановская
государственная медицинская академия"
Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)

(54) Способ лечения стеатогепатоза у экспериментальных животных

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к способу лечения стеатогепатоза у
экспериментальных животных. Для этого создают модель стеатогепатоза у крыс

путем введения в рацион пальмового масла в дозировке 30 г/кг/сут в течение 6 недель. На фоне модели стеатогепатоза в течение 6 недель внутримышечно вводят препарат «Лаеннек» в дозе 0,6 мл/кг массы тела в сутки. Изобретение обеспечивает гепатопротекторный эффект, снижение выраженности и распространенности стеатогепатоза. 6 ил., 1 табл., 2 пр.

Изобретение относится к медицине, а именно к созданию фармакологической модели стеатогепатоза у экспериментальных животных путем избыточного приема пальмового масла и оценки эффективности применения лекарственного препарата «Лаеннек».

Проблема несбалансированности пищевого рациона, в котором растет доля насыщенных растительных масел, крайне актуальна. Прием насыщенных жиров приводит к перегрузке жирового метаболизма печени, оксидативному стрессу, атерогенезу, хроническому системному воспалению и эндотелиопатии.

По данным литературы известны экспериментальные исследования по влиянию длительного избыточного применения пальмового масла твердой фракции (30 г/кг/сут, 6 недель) и вызываемые его потреблением метаболических сдвигов в организме экспериментальных животных (Янковская Н.С., Кежун Л.В., Слободская Н.С. и др. Влияние пальмового масла на риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Журнал Гродненского государственного медицинского университета, №4, 2016).

Пальмовое масло отличается от других растительных масел высоким содержанием насыщенных жирных кислот. Главными жирными кислотами пальмового масла являются насыщенная пальмитиновая кислота (41-50%) и мононенасыщенная (ω9) олеиновая кислота (35-45%). Содержание незаменимой полиненасыщенной ω6 линолевой кислоты в пальмовом масле достаточно мало (3-11%), а ω3 полиненасыщенные кислоты (линоленовая, докозагексаеновая, эйкозапентаеновая) отсутствуют.

Из-за несбалансированности состава жирных кислот пальмовое масло не является ценным пищевым продуктом и может применяться в питании только в комбинации с маслами, богатыми ω3 полиненасыщенными жирными кислотами (льняное, кедровое, оливковое, рыжиковое масла). Кроме того, избыток пальмитиновой кислоты приводит к образованию трипальмитинов, ферментативный гидролиз которых посредством липопроотеинлипазы весьма затруднен, что стимулирует развитие ожирения, атеросклероза, сахарного диабета 2-го типа и других хронических патологий.

Для объективной оценки эффективности различных гепатопротекторов необходимы разработка и повсеместное внедрение экспериментальных моделей поражения печени и/или других органов, которые были бы максимально приближены к реальности. Для моделирования поражения печени на крысах применяют гепатотоксины с различными механизмами патогенного действия:

- гепатотоксины тетрахлорметан, галотан, бромбензол, парацетамол, тетрациклин, изониазид, преобразуемые цитохром Р-450 монооксигеназами в свободные радикалы и в электрофильные интермедиаты;
- аллиловый спирт, окисляемый цитозольной и митохондриальной алкогольдегидрогеназой в электрофильный метаболит акролеин, повреждающий перипортальные гепатоциты вследствие дефицита в них восстановленного глутатиона;
- 4-пентеновую кислоту, нарушающую β-окисление средне- и длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях печени и орнитинный цикл синтеза мочевины с развитием эндогенной интоксикации и печеночной энцефалопатии;
- гепатотоксины, первично нарушающие синтез РНК и белка в гепатоцитах (D-галактозамин) - бромбензол, парацетамол, тетрациклин, изониазид;
- интоксикация гидразином, этанолом и др.

Однако, перечисленные модели соответствуют поражению печени определенными химическими агентами и, как таковые, крайне нетипичны для повсеместной клинической практики (в которой отравления подобными веществами встречаются не столь уж часто и ограничены, как правило, производственной медициной). Поэтому, в настоящее время в экспериментальных исследованиях используются модели стеатогепатоза, индуцированные диетой:

Метионин-холин-дефицитная диета, позволяющая моделировать тяжелую степень стеатоза и некротические изменения с воспалительным ответом на 2-ой неделе эксперимента (Fan J.G., Qiao L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* - 2009. - V.8, No. 3. - Pp.233-240);

Модель с применением рациона, богатого фруктозой (70% фруктозы в диете), в которой макромолекулярный стеатоз и воспаление внутри долек возникает на 5-ой неделе (Anstee Q.M., Goldin R.D.

Mousemodelsinnonalchoholicfatty liverdiseasesteatohepatitisresearch // Int. J. Exp.Pathol. - 2006. - V.87, No. 1. -Pp.1-16);

Диета с высоким содержанием жиров (Оковитый С.В., Шустов Е.Б. Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных // Биомедицина. - 2018. - №4. - С.29-43).

Следующим шагом после разработки и подтверждения моделей стеатогепатоза, соответствующих реальной клинической практике, является выявление наиболее эффективных и безопасных подходов к нейтрализации негативных последствий такого диетарного стеатогепатоза. Перспективным направлением гепатопротекции является применение гидролизатов плаценты человека (ГПЧ), в т.ч. в составе препарата «Лаеннек» (пр-во Japan Bioproducts, Япония).

К настоящему времени, в базе данных PUBMED представлено более 5000 публикаций по фундаментальным и клиническим исследованиям ГПЧ. Исследования пептидного состава ГПЧ, проводимые методами современной протеомики, позволили предложить комплекс молекулярных механизмов воздействия ГПЧ при различных патологиях. ГПЧ полезны в терапии заболеваний печени, атопического дерматита, вирусных инфекций (герпеса, COVID-19, вирусного гепатита), болезней перегрузки железом и синдрома хронической усталости. Молекулярные механизмы гепатопротекторного действия ГПЧ включают (1) цитопротекцию, 2) восстановление чувствительности клеток к глюкозе, 3) нормализация артериального давления, 4) устранение дислипидемии, 5) противовоспалительный эффект, 6) антиоксидантный эффект (Громова О.А., Торшин И.Ю., Чучалин А.Г., Максимов В.А. Гидролизаты плаценты человека: от В.П. Филатова до наших дней. Терапевтический архив. 2022;94(3):. DOI: 10.26442/00403660.2022.03.201408).

Технический результат предлагаемого изобретения заключается в создании фармакологической модели стеатогепатоза при избыточном потреблении пальмового масла и оценке эффективности применения лекарственного препарата «Лаеннек» у экспериментальных животных с использованием доказательств путем оценки клинических, биохимических показателей функции печени, гистологических маркеров.

Разработка модели стеатогепатоза на основе пальмового масла и апробация гепатопротекторных эффектов ГПЧ «Лаеннек» были проведены на 48 белых крысах-самцах массой 200-300 г. Животные были разделены на 4 группы: первая группа (n=12) -интактный контроль; второй (n=12) и четвертой группе (n=12) крыс вводили препарат «Лаеннек» (регистрационный номер №013851/01, Джапан Био Продактс Ко. Япония) в дозе 0,6 мл/кг массы в сутки внутримышечно в течение 6 недель.

В третьей (n=12) и в четвертой группах животных воспроизводилась модель гепатостеатоза - особям в рацион питания добавляли рафинированное пальмовое масло (CandleM, Индонезия) в дозировке 30 г/кг/сут в течение 6 недель. На 43 день исследования животных всех групп наркотизировали, проводили забор крови для биохимического исследования и секционного материала (печени) для патогистологического исследования.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденным санитарным врачом РФ от 29.08.2014 №51 об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Животные содержались в поликарбонатных клетках, группами одного пола (самцы), на подстилке; клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. В качестве подстилки использовались опилки.

Корм для содержания лабораторных животных ЛБК-120, приготовленный по ГОСТ Р50258-92, давался ad libitum («по желанию») в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Данные о составе и качестве корма от производителя хранились в документации лаборатории и в файле исследования. Животным давалась вода, соответствующая ГОСТ Р51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества». Вода в стандартных поилках со стальными крышками-носиками, давалась ad libitum («по желанию»).

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18-26°C и относительной влажности воздуха 30-70%). В комнатах содержания животных поддерживался 12-ти часовой цикл освещения. Контроль условий окружающей среды

осуществлялся комбинированным измерителем Testo фирмы Testo AG (Германия) и фиксироваться в соответствующем журнале. Для акклиматизации лабораторные животные до начала исследования содержались 5 дней при одиночном содержании в клетках. Во время этого периода у животных ежедневно контролировалось клиническое состояние путем визуального осмотра. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями не были включены в экспериментальные группы.

При начале эксперимента животные были распределены по группам 1-4 так, чтобы индивидуальное значение массы тела не отклонялось от среднего по группе значения массы тела более чем на 20% (в пределах одного пола). Взвешивание осуществлялось на электронных весах для взвешивания крыс/мышей (пр-во Cas Corporation, Россия).

Наблюдения за животными проводились ежедневно; фиксировались общее состояние, аппетит, особенности поведения, интенсивность и характер двигательной активности, частота и глубина дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенция фекальных масс.

В сыворотке крови определяли активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), ксантиноксидазы, уровни общего белка, прямого и общего билирубина (с помощью стандартных наборов Ольвекс), малонового диальдегида (МДА) по методу Jagi (Ткачук В.А., Клиническая биохимия, М.: Медицина, 2004, - 515 С.). В группах сравнения проводилось определение интенсивности процесса перекисного окисления липидов в сыворотке крови методом индуцированной хемолюминисценции.

Патогистологическое исследование секционного материала (печени крыс). После эвисцерации печень фиксировалась в 10% растворе нейтрального формалина, через 1 сутки орган препарировался, выделались фрагменты правой и левой доли, которые повторно фиксировались. После вторичной фиксации и промывки материала проводка (обезжизнение) ткани печени осуществлялась с помощью 99% изопропилового спирта. В дальнейшем кусочки заливались парафином и изготовленные на санном микротоме «Місгом» гистологические срезы толщиной 5-6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Оценка патологических изменений печени крыс при моделировании стеатоза учитывала структурные изменения гепатоцитов, степень расстройства кровообращения, особенности ответной воспалительной реакции. Микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа «Micros» МС-200 и цифровой окулярной камеры DCM 900.

Результаты исследования: воспроизведение модели стеатогепатоза на пальмовом масле.

Исследованные биохимические параметры отражают функциональное состояние печени. При повреждении гепатоцитов происходит потеря гепатоцитами билирубина, ферментов АСТ, АЛТ, ксантиноксидазы, так что уровни этих биохимических маркеров в крови возрастают. Изменения уровня общего белка является признаком грубой патологии печени и нарушением ее синтетической функции.

Результаты определения биохимических показателей крови показали, что внесение в пищевой рацион избытка пальмового масла в течение 6 недель приводило к поражению печени: отмечались достоверные повышения уровней трансаминаз АЛТ, АСТ, а также ксантиноксидазы и билирубина (Рис. 1).

В частности, уровни трансаминаз АСТ и АЛТ в крови являются индикаторами цитолиза гепатоцитов: ведь в норме ферменты АСТ и АЛТ присутствуют в значительных количествах в печени и почках, а их концентрации в крови невелики. Уровни АСТ и АЛТ достоверно повышались при воспроизведении модели на пальмовом масле (АСТ: пальмовое масло - 1.08 ± 0.17 ммоль/ч*л; контроль - 0.78 ± 0.19 ммоль/ч*л; АЛТ: пальмовое масло - 1.08 ± 0.34 ммоль/ч*л; контроль - 0.27 ± 0.18 ммоль/ч*л)

Билирубин - маркер экскреторной и антиоксидантной функции печени - билирубин, один из промежуточных продуктов распада гемоглобина, происходящего в гепатоцитах. Отмечено достоверное повышение уровней билирубина («прямой» билирубин: пальмовое масло - 1.57 ± 0.73 мкмоль/л; контроль - 0.81 ± 0.43 мкмоль/л, «общий» билирубин: пальмовое масло - 5.46 ± 1.33 мкмоль/л; контроль - 0.52 ± 0.44 мкмоль/л).

Ксантиноксидаза, катализирующая окисление гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту, в сопряженной реакции восстанавливает кислород до супероксид-аниона, спонтанно дисмутирующего в перекись водорода. Таким образом, в процессе реакции образуются реактивные формы кислорода, способные вызвать окислительный стресс. Кроме этого активность ксантиноксидазы в крови

используется как показатель распада клеток печени, так как этот фермент является внутриклеточным и в норме практически отсутствует в крови. Уровни ксантиноксидазы достоверно возрастали в модели на пальмовом масле (пальмовое масло - 0.16 ± 0.03 у.е./л, контроль - 0.12 ± 0.01 у.е./л).

Малоновый диальдегид (МДА) возникает в организме при деградации полиненасыщенных жиров и является маркером оксидативного стресса. Особенностью данной модели является то, что при поражениях печени не отмечено достоверного увеличения уровней малонового диальдегида (МДА: пальмовое масло - 8.05 ± 1.26 нмоль/мл; контроль - 6.05 ± 1.04 нмоль/мл, $P > 0.05$).

Таким образом, добавление в рацион питания рафинированного пальмового масла в дозировке 30 г/кг ежедневно в течение 6 недель нарушает целостность гепатоцитов, что подтверждается достоверным изменением биохимических показателей (АЛТ, АСТ, прямой и общий билирубин, ксантиноксидаза).

Предлагаемая модель имела гистологическое подтверждение стеатогепатоза, возникающего на фоне приема пальмового масла в дозе 30 г/кг. В условиях избыточного поступления жирных кислот в организм лабораторных животных (группа 3) структурные изменения печени нашли отражение во всех случаях наблюдений, но имели различную степень выраженности.

Нарушение кровообращения характеризовалось умеренно выраженным полнокровием печеночных вен и синусоидов центральных отделов печеночных долек (Рис. 2а). Структурные повреждения гепатоцитов характеризовались наличием оптически прозрачных вакуолей в цитоплазме со смещением ядра на периферию клетки (рис. 2б). В 10-ти наблюдениях жировая дистрофия гепатоцитов была ограничена перипортальными зонами печеночных долек (рис. 2в). В 2-х наблюдениях отмечено субтотальное крупно-мелкокапельное ожирение гепатоцитов, сопровождающееся дисконкомплексацией печеночных балок, деформацией и неравномерным полнокровием синусоидов (Рис. 2 г).

Гистологические подтверждения стеатогепатоза, вызванного приемом 30 г/кг пальмового масла в течение 6 недель, а) Полнокровие вены и синусоидов центральной зоны печеночной дольки при отсутствии структурных изменений гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$. б) Крупнокапельное ожирение гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$. в) Жировая дистрофия гепатоцитов в перипортальных зонах (А), в центре дольки гепатоциты интактны (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$. г) Жировая дистрофия гепатоцитов с нарушением гистоархитектоники печеночной дольки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$. д) Желчные пигменты в цитоплазме гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$. е) Пролиферация купферовских клеток (А), лимфоцитарный инфильтрат в зоне портального тракта (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$.

Наряду с жировой дистрофией гепатоцитов в 3-х наблюдениях имелись признаки нарушенной секреции конъюгированного билирубина в виде фокального внутриклеточного холестаза (рис. 2д). Мезенхимально-клеточная реакция на повреждение гепатоцитов характеризовалась умеренно выраженной пролиферацией звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) и лимфоцитарной инфильтрацией стромы портальных трактов (рис. 2е). Все вышеописанные изменения имели большую степень выраженности правой доли печени. Все вышеописанные изменения имели большую степень выраженности правой доли печени.

В целом, созданная в результате эксперимента модель стеатогепатоза имела морфологическое подтверждение во всех группах наблюдений и характеризовалась развитием жировой дистрофии гепатоцитов с локализацией преимущественно в перипортальной зоне печеночной дольки, умеренно выраженной мезенхимально-клеточной реакцией.

Примеры воспроизведения модели стеатогепатоза на пальмовом масле
Крыса №2.1

До исследования масса крысы №2.1 (самец) составила 283 гр, белый окрас, гладкую блестящую шерсть, чистый кожный покров. Крыса активная, потребление корма - не ниже установленных норм кормления. В начале эксперимента (1-ая неделя) животное отказывалось от приема пищи с пальмовым маслом, но привыкло ко 2-ой неделе. На третьей неделе исследования на диете с использованием пальмового масла масса тела достигла 305 гр. У крысы увеличились периоды двигательной пассивности, а в периоды двигательной активности крыса стала более агрессивной

(пыхтение, нападение боком, шерсть была «взъерошенной»), атаковал на других крыс. К концу наблюдения самец добился «доминирования» в группе крыс, переползал через других животных и др.

Измеренные значения биохимических показателей: АСТ (ммоль/ч*л) - 1,23; АЛТ (ммоль/ч*л) - 1,56; общий белок сыворотки крови (г/л) - 58,56; МДА (нмоль/мл) - 5,58; ксантинооксидаза (у.е./л) - 0,1646; Билирубин прямой (мкмоль/л) - 0,91; билирубин общий (мкмоль/л) - 2,15. Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ): Y max - 116, S - 999, S1max - 901, a - 0,114, t - 8,612, Z1 max - 7,767, tg2 - (-28,5), Dec - (-0,28).

При патогистологическом исследовании у крысы 2.1 выявили структурные повреждения гепатоцитов, которые характеризовались наличием оптически прозрачных вакуолей в цитоплазме со смещением ядра на периферию клетки, жировой дистрофии гепатоцитов с ограниченными перипортальными зонами печеночных долек (рис. 3а). В зоне портальных трактов отмечена умеренно выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация.

Примеры гистологической картины воспроизведения модели стеатогепатоза, вызванного пальмовым маслом (Рис. 3). Увеличение x480. а) крыса №2.1. Жировая дистрофия гепатоцитов в перипортальных зонах (А), в центре дольки гепатоциты интактны (Б). Окраска гематоксилином и эозином, б) Крыса №2.2. Распространенная жировая дистрофия гепатоцитов с нарушением гистоархитектоники печеночной дольки. Окраска гематоксилином и эозином, в) Крыса №2.3. Крупно-мелкокапельное ожирение гепатоцитов в перипортальных и срединных зонах печеночной дольки (А), лимфогистиоцитарный инфильтрат в зоне портального тракта (Б). Окраска гематоксилином и эозином.

Крыса №2.2

До начала исследования масса крысы 2.2 (самец) составила 272 гр, шерсть была чистая, блестящая, кожный покров без внешних признаков заболеваний. Крыса активная, потребление корма - в норме. На третьей неделе масса крысы достигла 316 гр. и, тем не менее, повысилась двигательная активность, крыса стала больше потреблять корма с пальмовым маслом, проявляла агрессивно-оборонительное поведение. Значение биохимических показателей: АСТ (ммоль/ч*л) - 1,19; АЛТ (ммоль/ч*л) - 1,47, общий белок сыворотки крови (г/л) - 54,76; МДА (нмоль/мл) - 7,46, ксантинооксидаза (у.е./л) - 0,129; билирубин прямой (мкмоль/л) - 0,8, билирубин общий (мкмоль/л) - 1,1633. Показатели ПОЛ: Y max - 134, S - 1600, S1max - 1470, a - 0,199, t - 11,94, Z1 max - 10,97, tg2 - (-34,5), Dec - (-0,618). В образцах печени от крысы 2.2 отмечено субтотальное крупно-мелкокапельное ожирение гепатоцитов, сопровождающаяся дисконкомплексацией печеночных балок, деформацией и неравномерным полнокровием синусоидов (рис. 3б).

Крыса №2.3

До начала исследования масса крысы (самец) составила 264 гр, шерсть чистая, кожный покров без внешних признаков заболеваний. Крыса активная, потребление корма - не ниже установленных норм кормления. На четвертой неделе исследования масса крысы достигла 290 гр., у крысы на правом боку отмечается выдранный клочок шерсти, проявлял беспокойство, делал «стойку» в ответ на стресс-факторы (громкие звуки, яркий свет, приближение других крыс).

Биохимические данные: АСТ (ммоль/ч*л) - 0,89, АЛТ (ммоль/ч*л) - 0,84, Общий белок сыворотки крови (г/л) - 59,0; МДА (нмоль/мл) - 5,02, ксантинооксидазу (У.е./л) - 0,1303, Билирубин прямой (мкмоль/л) - 0,1335, Билирубин общий (мкмоль/л) - 0,3814. Показатели ПОЛ: Y max - 85, S - 1212, S1max - 1150, a - 0,238, t - 14,259, Z1 max - 13,529, tg2 - -24,0, Dec - (-0,25).

Гистологический анализ показал, что жировая дистрофия гепатоцитов локализовалась в перипортальных зонах с распространением на срединные отделы печеночной дольки с умеренно выраженным нарушением гистоархитектоники и лимфогистиоцитарной инфильтрацией стромы портальных трактов (рис. 3в).

Таким образом, разработанная модель стеатогепатоза у крыс имела морфологическое подтверждение во всех наблюдениях и характеризовалась развитием жировой дистрофии гепатоцитов (с локализацией преимущественно в перипортальной зоне печеночной дольки и умеренно выраженной мезенхимально-клеточной реакцией). Результаты определения биохимических показателей крови показали, что пищевой рацион, в течение 6 недель обогащенный пальмовым маслом, приводил к поражению печени: наблюдалось повышение трансаминаз АЛТ, АСТ, прямого и общего билирубина в плазме крови, снизилось содержание общего белка

сыворотки крови. Особенностью данной модели является то, что при поражениях печени не происходит увеличение уровней малонового диальдегида.

Результаты исследования: терапия стеатогепатоза гидролизатом плаценты человека.

Курсовое введение гидролизата плаценты человека (ГПЧ, препарат «Лаеннек») в течение 6 недель в дозе 0,6 мл/кг массы тела в сутки внутримышечно на фоне модели гепатостеатоза, достоверно снизил уровень АЛТ, что подтверждает уменьшение цитолиза гепатоцитов. В группе животных, получавших «Лаеннек» в течение 6 недель на фоне модели гепатостеатоза, достоверно снизился уровень АЛТ (интактный контроль - 0.27 ± 0.18 ммоль/ч*л, пальмовое масло - 1.08 ± 0.34 ммоль/ч*л, «Лаеннек»+пальмовое масло - 0.51 ± 0.21 ммоль/ч*л), ксантиноксидазы (интактный контроль - 0.12 ± 0.01 у.е./л, пальмовое масло - 0.16 ± 0.03 у.е./л, «Лаеннек»+пальмовое масло - 0.12 ± 0.01 у.е./л), билирубина прямого (интактный контроль - 0.81 ± 0.43 мкмоль/л, пальмовое масло - 1.57 ± 0.73 мкмоль/л, «Лаеннек»+пальмовое масло - 0.67 ± 0.13 мкмоль/л) и билирубина общего (интактный контроль - 0.52 ± 0.44 мкмоль/л, пальмовое масло - 5.46 ± 1.33 мкмоль/л, «Лаеннек»+пальмовое масло - 1.85 ± 0.83 мкмоль/л), что подтверждает уменьшение цитолиза гепатоцитов (Рис. 4).

Результаты определения интенсивности процесса перекисного окисления липидов представлены в таблице 1. Показатели, наиболее информативные для оценки хемилюминесценции: I_{max} - максимальная интенсивность, которая отражает потенциальную способность биологического объекта к свободно-радикальному окислению; S - светосумма, отражает содержание радикалов RO_2 , соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления комплекс соединений, обладающих как антиоксидантным, так и прооксидантным действием. Показатель I_{max} значительно отличается в третьей группе (пальмовое масло) по сравнению с первой группой (интактный контроль) ($p=0,0009$).

Антиоксидантный потенциал обследуемой пробы коррелирует с показателем tg_2 и коэффициентами α и Z . Чем выше значения показателя tg_2 , тем выше антиоксидантная активность и, наоборот, чем выше значения α и Z , тем ниже активность антиоксидантной системы. Показатель tg_2 достоверно ниже в третьей группе (пальмовое масло) по сравнению с первой группой (интактный контроль) ($p=0,003$). При использовании «Лаеннек» у животных на модели гепатостеатоза (четвертая группа) все показатели ПОЛ сохраняются на уровне показателей третьей группы (пальмовое масло) и значительно отличаются от коэффициентов у животных первой группы (интактный контроль).

(Таблица 1): примечание: значимые отличия: * - между группами 1 и 3; # - между группами 1 и 4; @ - между группами 2 и 4; & - между группами 3 и 4; значимость различий (тест Манна-Уитни): $p < 0,05$.

Результаты патогистологического исследования секционного материала (печени крыс).

Во всех наблюдениях контрольной группы (группа 1) и группы животных, получавших «Лаеннек» (группа 4), микроскопическая картина ткани печени соответствовала норме. В контроле, 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. 5а).

При моделировании стеатогепатоза и параллельном введении препарата «Лаеннек» у лабораторных животных (группа 4) жировая дистрофия гепатоцитов обнаруживалась только в перипортальных зонах печеночных долек и носила очаговый характер, при этом большая часть печеночных клеток не имела видимых структурных повреждений (рис. 5б). В 5-ти наблюдениях этой группы ожирение гепатоцитов имело фокальный характер (рис. 5в). Лишь в одном наблюдении 4-й группы повреждения печени оказались минимальными в виде единичных гепатоцитов, в цитоплазме которых обнаруживались мелкие капли липидов (рис. 5 г). Во всех наблюдениях отмечалась слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы портальных трактов (рис. 5д).

Эффекты ГПЧ «Лаеннек» на гистологию печени. Слайды (а, б) - увеличение $\times 120$, слайды (в, г, д) - увеличение $\times 480$. а) Структура неизменной печеночной дольки (контроль). Окраска гематоксилином и эозином. б) Жировая дистрофия гепатоцитов в перипортальных зонах (А), гепатоциты прецентрального отдела и центров долек не имеют видимых повреждений (Б). Окраска гематоксилином и эозином, в) Фокальная жировая дистрофия гепатоцитов перипортальной зоны печеночной дольки, умеренно

выраженное полнокровие синусоидов. Окраска гематоксилином и эозином, г) Перипортальная зона печеночной дольки с сохраненной гистоархитектоникой, гепатоциты без признаков жировой дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином, д) Воспалительно-клеточный инфильтрат стромы портального тракта, фокальная жировая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином.

Таким образом, в контрольной группе и группе животных, получавших «Лаеннек», микроскопическая картина ткани печени соответствовала норме. Использование препарата «Лаеннек» в качестве гепатопротектора в 4-ой группе наблюдений оказало отчетливый гепатопротекторный эффект и снизило выраженность и распространенность жировой дистрофии печени (стеатогепатоза), которая приобрела форму фокального и мелкоочагового ожирения гепатоцитов без нарушения гистоархитектоники органа.

Примеры крыс из группы 4 (пальмовое масло+«Лаеннек»)

Крыса №4.2

До исследования масса крысы 272 гр, (самец) шерсть белая, чистая, гладкая, кожный покров без внешних признаков заболеваний. На протяжении всего эксперимента крыса активная, потребление корма - не ниже установленных норм кормления. Биохимия: АСТ (ммоль/ч*л) - 0,83, АЛТ (ммоль/ч*л) - 0,62, Общий белок сыворотки крови (г/л) - 58,66, МДА (нмоль/мл) - 6,96, Ксантинооксидаза (У.е./л) - 0,1065, Билирубин прямой (мкмоль/л) - 0,035, Билирубин общий (мкмоль/л) - 2,19. Показатели ПОЛ: Y_{max} - 83, S - 1036, $S1_{max}$ - 964, a - 0,208, t - 12,482, $Z1_{max}$ - 11,614, tg2 - (-19,5), Dec - (-0,294).

У крысы 4.2 при патогистологическом исследовании жировая дистрофия гепатоцитов обнаруживалась только в перипортальных зонах печеночных долек и носила очаговый характер, при этом большая часть печеночных клеток не имела видимых структурных повреждений (рис. 6а).

Примеры гистологической картины лечения стеатогепатоза, вызванного пальмовым маслом, посредством ГПЧ «Лаеннек». а) Жировая дистрофия гепатоцитов в перипортальных зонах (А), гепатоциты прецентрального отдела и центров долек не имеют видимых повреждений (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 120$. б) Фокальная жировая дистрофия гепатоцитов перипортальной зоны печеночной дольки, умеренно выраженное полнокровие синусоидов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$. в) Перипортальная зона печеночной дольки с сохраненной гистоархитектоникой, гепатоциты без признаков жировой дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$.

Крыса №4.3

До исследования масса крысы (самец) 296 гр., шерсть чистая, кожный покров без внешних признаков заболеваний. Крыса активная, потребление корма - не ниже установленных норм кормления. На четвертой неделе исследования крыса стала пассивной, меньше потреблять корм, масса крысы 274 гр. Биохимические показатели данного животного: АСТ (ммоль/ч*л) - 1,0, АЛТ (ммоль/ч*л) - 0,42, Общий белок сыворотки крови (г/л) - 53,45, МДА (нмоль/мл) - 9,33, Ксантинооксидаза (У.е./л) - 0,1094, Билирубин прямой (мкмоль/л) - 0,0572, Билирубин общий (мкмоль/л) - 0,763. Показатели ПОЛ: Y_{max} - 150, S - 1288, $S1_{max}$ - 1191, a - 0,143, t - 8, 587, $Z1_{max}$ - 7,94, tg2 - (-34,5), Dec - (-0,407). Ожирение гепатоцитов имеет фокальный характер с локализацией в перипортальной зоне печеночной дольки (рис. 6б).

Крыса №4.5

До исследования масса крысы 4.5 имела массу 298 гр, белый окрас, гладкую блестящую шерсть, чистый кожный покров. Крыса активная, потребление корма - не ниже установленных норм кормления. По биохимическим показателям получили следующие данные: АСТ (ммоль/ч*л) - 0,88, АЛТ (ммоль/ч*л) - 0,39, Общий белок сыворотки крови (г/л) - 59,91, МДА (нмоль/мл) - 6,97, ксантинооксидаза (У.е./л) - 0,14 билирубин прямой (мкмоль/л) - 0,1, билирубин общий (мкмоль/л) - 1,735. Показатели ПОЛ: Y_{max} - 150, S - 1288, $S1_{max}$ - 1191, a - 0,143, t - 8,587, $Z1_{max}$ - 7,94, tg2 - (-46,0), Dec - (-0,385). В данном наблюдении повреждения печени оказались минимальными в виде единичных гепатоцитов, в цитоплазме которых обнаруживались мелкие капли липидов (рис. 6в).

Таким образом, использование препарата «Лаеннек» в качестве гепатопротектора во всех наблюдениях оказало влияние на выраженность и распространенность жировой дистрофии печени (стеатогепатоза), которая приобрела форму фокального и мелкоочагового ожирения гепатоцитов без нарушения гистоархитектоники органа. Курсовое введение препарата «Лаеннек» в течение 6 недель в дозе 0,6 мл/кг массы

тела в сутки внутримышечно на фоне модели гепатостеатоза, достоверно снизил уровень АЛТ, что подтверждает уменьшение цитолиза гепатоцитов.

Способ оценки эффективности применения
лекарственного препарата «Лаеннек»
при создании фармакологической модели
стеатогепатоза у экспериментальных животных

Показатели интенсивности процесса перекисного окисления липидов в плазме крови в группах сравнения.

Группы наблюдений	ПОЛ							
	Y max, мВ	S, мВХсек	S ₁ max, мВХсек	α	Z, сек.	Z ₁ max, сек.	tg ₂ , мВ/сек.	Dec
Контроль интактный	63,80±6,6	888,4±165,3	842,0±156,78	0,23±0,04	13,73±2,12	13,01±2,01	-18,30±1,45	-0,54±0,09
Лаеннек	64,40±6,48	1202,6±80,53	1153,4±76,31	0,31±0,03	18,57±1,54	17,83±1,54	-15,60±1,99	-0,27±0,1
Пальмовое масло	115,0±8,3*	1225,2±100,54	1136,4±93,42	0,17±0,02	10,83±1,04	10,07±1,03	-31,8±3,05*	-0,44±0,08
Пальмовое масло+ «Лаеннек»	117,4±11,34 ^{#@}	1160,6±40,2	1084,0±36,0	0,17±0,01 [@]	10,15±0,7 [@]	9,48±0,7 [@]	-34,5±4,6 ^{#@}	-0,41±0,04

Табл.1

Формула изобретения

Способ лечения стеатогепатоза у экспериментальных животных, заключающийся в том, что создают модель стеатогепатоза у крыс путем введения в рацион пальмового масла в дозировке 30 г/кг/сут в течение 6 недель, на фоне модели стеатогепатоза в течение 6 недель внутримышечно вводят препарат «Лаеннек» в дозе 0,6 мл/кг массы тела в сутки.

Изменения уровней маркёров дисфункции печени при воспроизведении модели стеатогепатоза на основании пальмового масла.

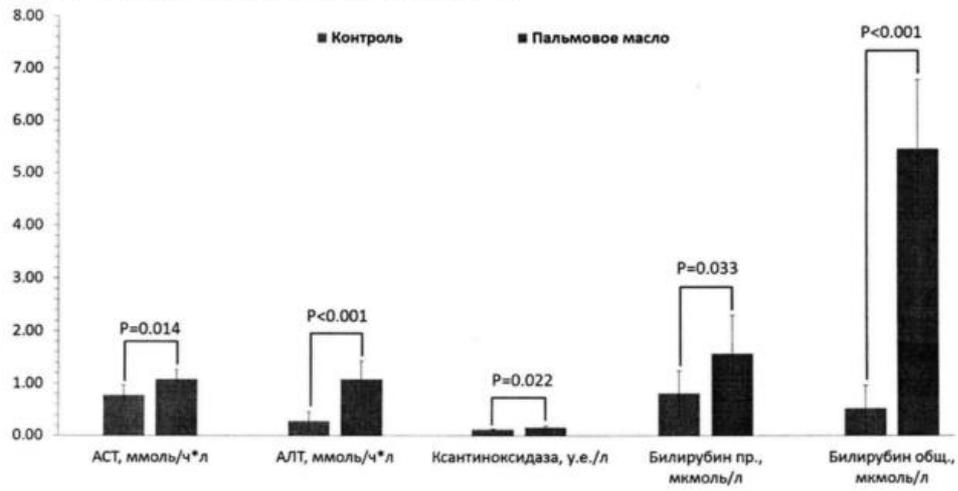


Рис. 1

Гистологические подтверждения стеатогепатоза, вызванного приёмом 30 г/кг пальмового масла в течение 6 недель

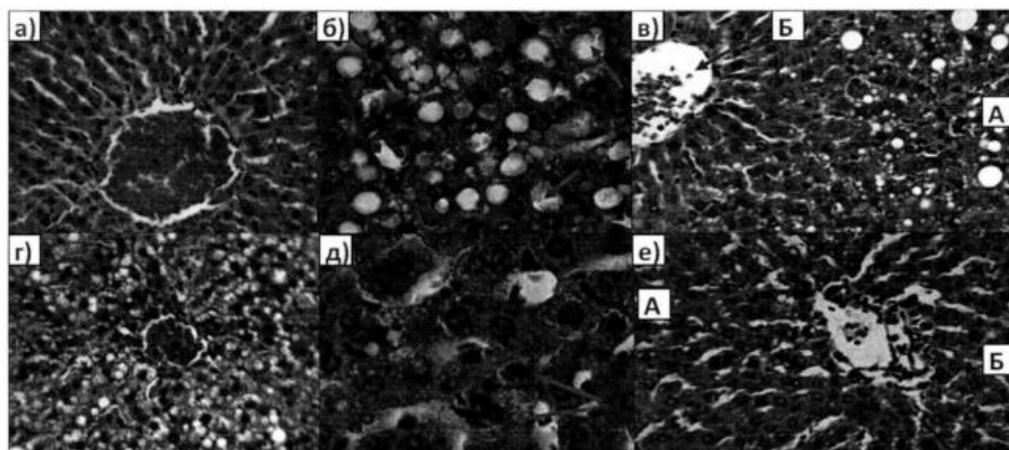


Рис. 2

Примеры гистологической картины воспроизведения модели стеатогепатоза, вызванного пальмовым маслом

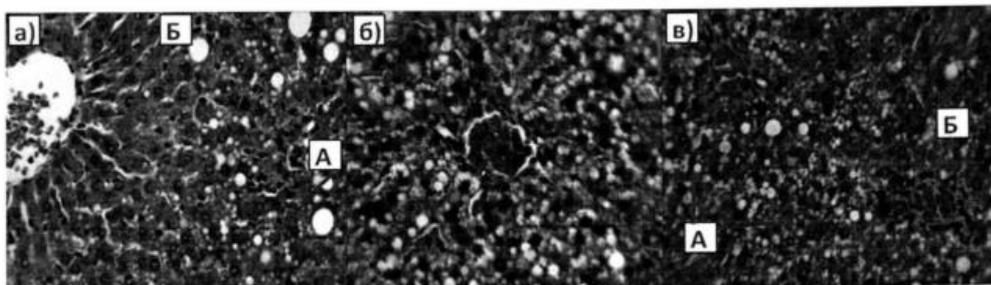


Рис. 3

Динамика биомаркёров функции печени у животных с моделью стеатогепатоза, вызванного пальмовым маслом, получавших гидролизат плаценты человека (препарат «Лаеннек»)

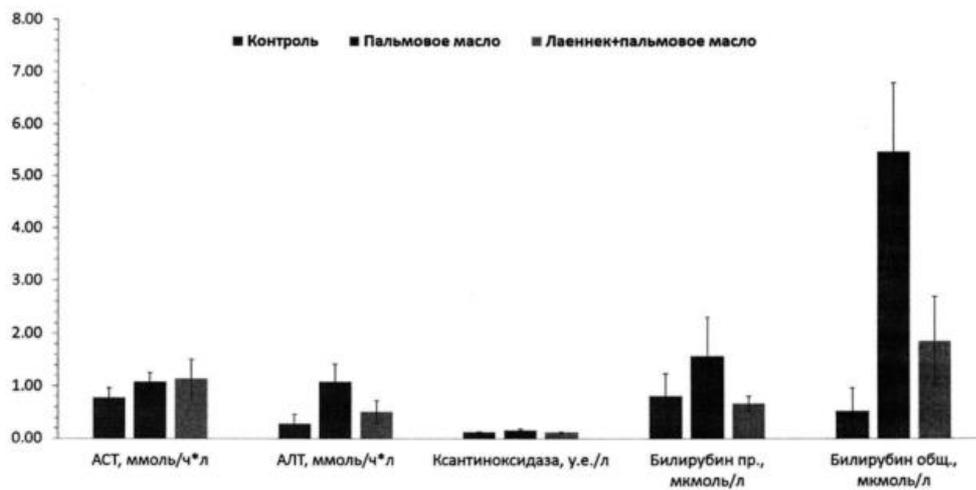


Рис. 4

Эффекты гидролизата плаценты человека (препарат «Лаеннек») на гистологию печени.

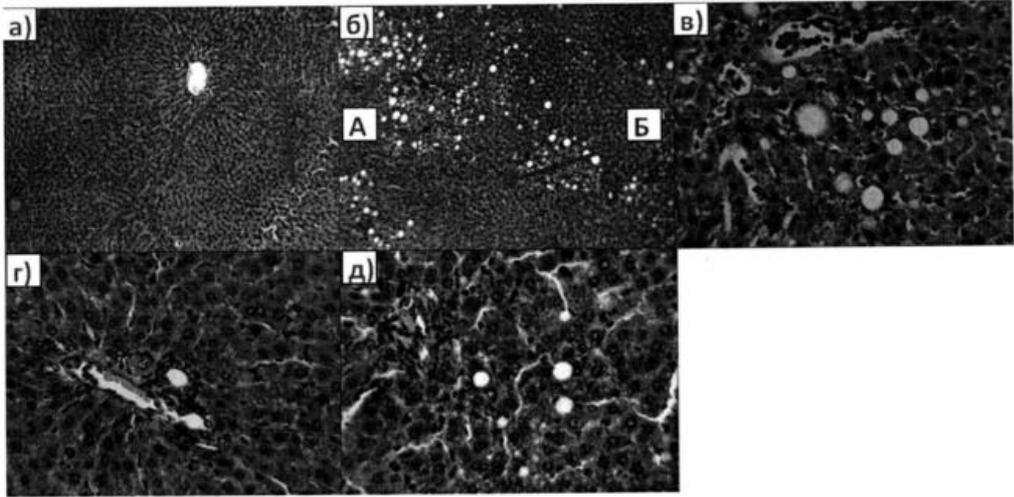


Рис. 5

Примеры гистологической картины лечения стеатогепатоза, вызванного пальмовым маслом, посредством гидролизата плаценты человека (препарат «Лаеннек»)

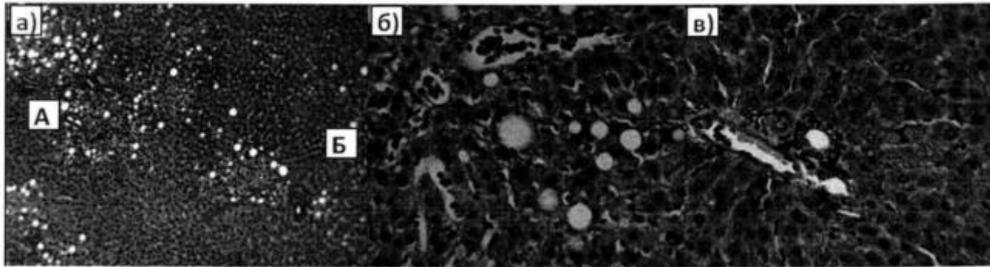


Рис. 6