

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ**

УДК 616.36-003.93:615.03

ДАНЧЕНКО Елена Олеговна

**ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ГЕПАТОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ
И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ**

03.00.04 - Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Гродно - 2001

Работа выполнена на кафедре биохимии Витебского государственного медицинского университета

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор
ЧИРКИН А.А.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, академик
КОНОПЛЯ Е.Ф.

доктор биологических наук, старший научный сотрудник
БУКО В.У.

доктор медицинских наук,
Заслуженный деятель науки,
профессор
КУХТА В.К.

Оппонирующая организация:

Институт биологической и медицинской химии РАНН

Защита состоится «30» марта 2001 года в 14.30 на заседании совета по защите диссертаций [Д 01.30.01] при Институте Биохимии НАН Беларуси [230017, Гродно, бульвар Ленинского комсомола 50, тел. 33-32-11].

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Биохимии НАН Беларуси

Автореферат разослан «28» февраля 2001 года

Ученый секретарь совета по
защите диссертаций,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник



П.С. Пронько



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Новые представления о молекулярных механизмах повреждения печени путем апоптоза и/или некроза требуют пересмотра и дополнения принципов фармакологического управления восстановительными процессами в органе [Carson D.A., 1993; Fawthrop D. et al., 1991; Kerr J.F.R., 1972-1994; Losser M.R. et al., 1996; Patel T., Gores G.J., 1995; Rosser B.G. et al., 1995]. Для совершенствования медицинских технологий лечения заболеваний печени кроме информации о фармакокинетики, фармакодинамике и терапевтическом диапазоне доз гепатотропных препаратов необходимы сведения о влиянии их на процессы физиологической и внутриклеточной регенерации, а также на метаболические потоки и их регуляцию.

Значительное число этиологических факторов физической, химической и биологической природы запускают в печени достаточно стереотипную последовательность патологических процессов [Логинов А.С. 1996; Коневалова Н.Ю., Чиркин А.А., 1994; Цыркунов В.М.и соавт., 1994; Gores R.J. et al. 1990; Losser M.R., 1996]. Поэтому сохраняет актуальность проблема дифференцированной терапии начальных этапов повреждения печени в зависимости от этиологического фактора и структурно-метаболического состояния клеток печени.

Одним из ведущих механизмов первичного повреждения печени является перекисная модификация мембран [Арчаков А.И., 1972; Конопля Е.Ф., Милютин А.А., 1987, 1992; Grotti A.W., 1985; Tribble D.L. et al. 1987]. Этот процесс может быть усилен гидрофобными желчными кислотами [Бушма М.И. и соавт., 1997-2000; Billington D. et al., 1980; Greim H. et al., 1972; Neuman D.M. et al., 1991; Rodrigues C.M.P. et al., 1999; Schmucker D.L. et al., 1990; Quist R.G. et al., 1991] и ослаблен эндогенными и экзогенными антиоксидантами [Буко В.У., 2000; Бунятян Н.Д. и соавт., 1999; Косых В.А., 1993-2000; Кухта В.К.и соавт., 1993; Морозкина Т.С.и соавт., 1996; Brzosko W. et al., 1999; Congreave I.A., 1988; Portugal V., 1993; Rice-Evans C.A. et al., 1993]. Нарушения структуры и биосинтеза белков в гепатоцитах при взаимодействии с липополисахаридными эндотоксинами, ацетальдегидом и другими токсикантами могут предупреждаться своевременным введением аминокислотных препаратов (S-аденозилметионин), аминокислотных смесей [Мараховский Ю.Х., 1996; Нефедов Л.И., 1999, 2000; Смирнов В.Ю., Л.А.Сазонова и соавт., 1999]. Развивающиеся в дальнейшем процессы липидоза печени и активацию жиронакапливающих клеток (Ito) можно затормозить применением полиненасыщенных жирных кислот и фосфатидилхолина, а на цирротическом этапе поражения печени необходимы дополнительные воздействия, например, глициерризиновой кислотой [Абакумова О.Ю. и соавт., 1993-1998; Арчаков А.И. и соавт., 1998].

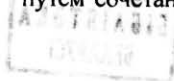


1986-1998; Ипатова О.М., Торховская Т.И.и соавт., 1998; Цыркунов В.М.и соавт., 2000; Gundermann K.J., 1993].

Таким образом, остается актуальной важная научно-практическая проблема управления восстановительными процессами в печени, хотя молекулярные механизмы регенераторных процессов в органе изучены достаточно детально [Лиознер Л.Д., 1972; Саркисов Д.С., 1976; Сидорова З.Ф. и соавт. 1966; Оболенская М.Ю., 1976-1999; Bucher N.L., 1964, 1966, 1971; Fausto N., 1975-1994; Michalopoulos G., 1984, 1990,1994]. В рамках данной проблемы целесообразным является дальнейшее развитие фармакологических технологий коррекции повреждений печени гепатотропными веществами в связи с постоянно увеличивающейся вероятностью неблагоприятных воздействий на орган механическими, физическими, химическими, токсическими и биологическими факторами.

Для понимания фармакодинамики гепатотропных веществ необходимо изучение их влияния на механизмы гибели гепатоцитов (апоптоз и/или некроз) и особенности метаболизма. Для этого, начиная с 1976 года, когда в США были впервые предложены правила добротной лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP), во многих странах мира продолжают работы по совершенствованию GLP. Основная цель GLP – обеспечение достоверности результатов доклинических испытаний потенциальных лекарственных препаратов, гарантирующих их безопасность для человека. В действующих Правилах доклинической оценки безопасности фармакологических средств (РД 64-126-91, Москва, 1992) основное внимание при изучении общетоксического действия, специфической токсичности, фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов уделяется экспериментам *in vivo* с использованием различных животных. Однако, к настоящему времени накопилось достаточно исследований, показывающих целесообразность включения в GLP исследований *in vitro* с использованием различных клеточных культур. На культурах клеток можно оценить механизм гибели (апоптоз, некроз), диапазоны цитотоксичности (возможная экстраполяция доз применительно к последующим наблюдениям *in vivo*) и клеточные механизмы фармакодинамики (влияние на число клеток, синтез ДНК, РНК, белков, изменение пула метаболитов и др.).

Связь работы с крупными программами, темами. Работа выполнена в рамках темы «Поиск способов коррекции изменений, вызванных ионизирующими излучениями и комбинированными радиационно-химическими воздействиями» раздела 3.3. Государственной программы Республики Беларусь по минимизации и преодолению последствий катастрофы на Чернобыльской АЭС за 1996-2000 г.г., темы соцзаказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Разработать метод вторичной профилактики атеросклероза путем сочетанного применения безафибрата и энтеросорбентов» (№ госреги-



страции 19942884) и «Экспериментально-клиническое обоснование и внедрение технологий коррекции метаболизма при дислипотеинемиях» (№ госрегистрации 1996252).

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в разработке новой концепции управления восстановительными процессами в печени, основанной на молекулярно-структурных механизмах цитотоксичности гепатотропных препаратов.

В соответствии с поставленной целью определены следующие задачи исследования:

1. Разработать метод оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов *in vitro* с помощью культур клеток (L929, L41, НГУК-1, липоциты, гепатоциты).
2. Изучить биохимические и морфологические особенности физиологической и репаративной регенерации печени при введении гепатотропных препаратов, не обладающих цитотоксичностью, а также характеризующихся разной выраженностью цитотоксического действия.
3. Изучить особенности реперфузионных и восстановительных процессов в частично или полностью ишемизированной печени при введении гепатотропных препаратов с разной степенью цитотоксического эффекта.
4. Исследовать молекулярные характеристики гепатотропного действия препаратов с отсутствием и разной степенью цитотоксичности при моделировании окислительного стресса (радиационно-индуцированная дислипотеинемия и хроническая алкогольная интоксикация).
5. Оптимизировать Правила GLP и GCP путем обоснования введения в них клеточных технологий оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов растительного происхождения.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования явились ткань печени, сыворотка крови и культуры клеток. Предметом исследования были метаболические механизмы и структурные характеристики процессов повреждения и восстановления клеток *in vitro* и *in vivo*. Для оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов использовались клетки с редуцированным эндоплазматическим ретикуломом (L929 и L41), клетки нейробластомы НГУК-1, жировые эпидидимальные клетки, перитонеальные макрофаги и первичная культура гепатоцитов.

Эксперименты поставлены на 1503 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г., у которых моделировали повреждение печени путем частичной гепатэктомии, ишемии и окислительного стресса.

У 142 пациентов с возрастными нарушениями метаболизма, острым абстинентным синдромом, хронической стресс-реакцией, признаками метаболического синдрома Х проводилась биохимическая оценка действия гепатотропных препаратов из травы солянки холмовой в рамках Правил GCP на основе результатов доклинических испытаний по Правилам GLP.

Гипотеза. Молекулярные механизмы действия гепатотропных веществ, включая лекарственные препараты, определяются отсутствием, наличием и степенью выраженности их цитотоксичности. Гепатотропные препараты можно разделить на 2 группы: не проявляющие цитотоксичности в терапевтическом диапазоне доз и обладающие разной степенью цитотоксичности, которая компенсируется гомеостатическими механизмами. К не проявляющим цитотоксичности гепатотропным веществам следует отнести эндогенные биорегуляторы пролиферации и дифференцировки гепатоцитов (ростовые вещества) и экзогенные низкомолекулярные вещества, способные включаться в специфичные для гепатоцита метаболические процессы. Экзогенные препараты оказывают прямое антинекрозогенное и/или антиапоптозогенное действие, которые могут сопровождаться опосредованными метаболическими эффектами на уровне других тканей (например, инсулиноподобные эффекты). Обладающие разной степенью цитотоксичности гепатотропные вещества оказывают микроповреждающее действие, вызывающее активацию механизмов регенерации, что обеспечивает более эффективное протекание восстановительных процессов в органе. Оценка цитотоксичности препаратов базируется на определении прямого цитотоксического эффекта с использованием культур клеток с редуцированным эндоплазматическим ретикулумом, опосредованных цитотоксических эффектов через продукцию цитокинов и выявлении действия на процессы апоптоза и/или некроза в изолированных гепатоцитах.

Методология и методы проведенного исследования. Для решения поставленных задач реализован комплексный молекулярно-структурный подход, базирующийся на оценке физиологической и репаративной регенерации печени при предварительном введении препаратов с различной цитотоксичностью. Для определения цитотоксичности гепатотропных веществ использовали: 1) оценку цитотоксичности *in vitro* посредством оригинального трехэтапного метода последовательного применения клеток с редуцированным эндоплазматическим ретикулумом, перитонеальных макрофагов и гепатоцитов; 2) определение скрытой цитотоксичности *in vivo* в митотическую фазу регенерации печени после ее повреждения; 3) выявление цитотоксических эффектов гепатотропных веществ через их влияние на интегральные показатели метаболизма.

Для исследования избраны три гепатопротектора: монопрепараты – урсодезоксихолевая кислота (УДХК), относительно гидрофобная желчная кислота, широко применяемая в гепатологии и тауроурсодезоксихолевая кислота (ТУДХК), гидрофильная желчная кислота, рассматриваемая как перспективная фармакологическая субстанция в гепатологии, а также поликомпонентный природный препарат – экстракт солянки холмовой (ЭСХ), эффективный гепатопротектор народной медицины.

Сочетание методов биохимии, световой и электронной микроскопии позволило классифицировать исследуемые гепатотропные вещества на три группы: 1) оказывающие микроальтерерирующее действие на уровне отдельных клеток (УДХК); 2) вызывающие микроповреждения на субклеточном уровне (ТУДХК); 3) не обладающие структурно-альтерерирующим действием, но способные воздействовать на метаболические потоки в клетке путем дополнительного внесения метаболитов и низкомолекулярных биорегуляторов (ЭСХ).

На моделях репаративной регенерации печени, частичной или полной ишемии органа, окислительного стресса (хроническая алкогольная интоксикация и однократное внешнее γ -излучение) сопоставлены механизмы гепатотропного действия изучаемых гепатопротекторов. Для оценки эффективности предложенных дополнений к Правилам GLP (оценка цитотоксичности *in vitro*) проводились клинико-лабораторные исследования гепатопротекторных свойств препаратов солянки холмовой у пациентов с нарушениями метаболизма различного генеза.

Научная новизна и значимость полученных результатов.

Впервые предложен трехэтапный метод оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов на клетках с редуцированным эндоплазматическим ретикулумом (прямой цитотоксический эффект), перитонеальных макрофагах (опосредованный цитотоксический эффект), первичной культуре гепатоцитов (апоптоз, некроз). Предложен метод оценки инсулиноподобного эффекта препаратов на изолированных липоцитах.

Впервые предложена классификация гепатотропных препаратов на не обладающие цитотоксичностью и обладающие разной степенью цитотоксичности в терапевтическом диапазоне доз. Новыми являются данные о том, что препарат УДХК в дозах, выше 100 мкг/мл, обладает цитотоксическими эффектами на культурах клеток L929, L41, НГУК-1, проявляющимися подавлением биосинтеза ДНК, белков и роста клеток в монослое; препарат ТУДХК обладает цитотоксичностью в дозах, превышающих 400 мкг/мл; препарат ЭСХ не обладает прямой цитотоксичностью в дозах до 1000 мкг/мл, а в дозах 50-200 мкг/мл проявляет инсулиноподобные эффекты (стимуляция биосинтеза

белка в клетках L929 и L41 и липидов из меченой глюкозы в жировых эпидермальных клетках).

Впервые показано, что препараты желчных кислот и ЭСХ не обладают опосредованной цитотоксичностью *in vitro* и не стимулируют секрецию цитокинов перитонеальными макрофагами мышей.

Впервые в экспериментах *in vitro* определены диапазоны доз гепатотропных препаратов, способных модулировать процессы апоптоза и/или некроза в гепатоцитах. Обнаружено, что препараты УДХК и ТУДХК обладают антиапоптозогенным действием (50-200 мкг/мл) при индукции апоптоза гликохенодезоксихолевой кислотой. Препараты ТУДХК (50-200 мкг/мл) и ЭСХ (200 мкг/мл) оказывают антинекрозогенный эффект.

Впервые установлено, что гепатотропные препараты, обладающие определенной степенью цитотоксичности в терапевтическом диапазоне доз, вызывают единичные микроповреждения гепатоцитов, что стимулирует митотическое деление клеток и обеспечивает оптимальное протекание репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии, а также частичной и полной ишемии органа (УДХК – повреждение отдельных гепатоцитов, ТУДХК – повреждение мембранных внутриклеточных структур). Гепатотропные препараты, не обладающие цитотоксичностью (ЭСХ), могут проявлять опосредованное гепатопротекторное действие через инсулиноподобные эффекты на печень путем оптимизации метаболизма в клетке.

Новыми являются данные о том, что препарат УДХК обеспечивает синхронизацию митотического деления гепатоцитов, что регистрируется выявлением сдвига пика включения [³H]тимидина в ДНК на 3-6 часов к моменту операции частичной гепатэктомии. Препарат ЭСХ увеличивает включение [³H]тимидина в ДНК на протяжении всей митотической фазы регенерации печени без сдвига пика включения. Оба препарата оптимизируют течение метаболических процессов в гипертрофическую фазу регенерации печени.

Впервые увязаны цитотоксические свойства препаратов с характером их гепатопротекторного действия: препарат, оказывающий цитотоксическое действие на клеточном уровне (УДХК) способен усугублять патологию печени при тяжелых и сочетанных поражениях органа (алиментарная гиперхолестеринемия, сублетальное облучение, 180-минутная ишемия); препарат, не проявляющий цитотоксичности (ЭСХ) утрачивает положительные фармакодинамические эффекты при тяжелых и сочетанных поражениях печени. Новыми являются данные о механизме стимуляции внутриклеточной физиологической регенерации наиболее перспективного гепатотропного препарата – ТУДХК.

На моделях окислительного стресса (хроническая алкогольная интоксикация, действие ионизирующего излучения) получены новые данные, согласно которым препараты желчных кислот в дозах, не оказывающих цитотоксиче-

ского эффекта (5 мг/кг) действуют как антиоксиданты, а в дозах 50-100 мг/кг оказывают нормализующее влияние на обмен нуклеиновых кислот и синтез экспортных белков. Препарат ЭСХ в дозе 200 мг/кг частично предотвращает индуцированные этанолом нарушения метаболизма путем стимуляции реакций неокислительной ветви пентозофосфатного пути обмена углеводов.

Определено возможное место исследования цитотоксичности гепатотропных препаратов *in vitro* на этапе доклинических испытаний лекарственных препаратов.

Полученные данные являются основой для создания новой классификации гепатотропных препаратов по степени их цитотоксичности.

Практическая значимость полученных результатов. Предложенный метод оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов *in vitro* позволяет оценить клеточные механизмы цитотоксичности и может способствовать оптимизации правил доклинических испытаний лекарственных средств - GLP в Белоруссии (инструкция на метод № 160-00-11, утверждена МЗ РБ 8.02.2001). Предложен метод оценки опосредованных эффектов гепатотропных препаратов с использованием клеточных культур (липоциты, НГУК-1) (инструкция на метод № 161-00-11, утверждена МЗ РБ 8.02.2001) и экспериментов *in vivo*.

Изучены молекулярные механизмы действия гепатотропных препаратов, основанные на микроповреждающем эффекте или изменении метаболического гомеостаза, что стимулирует процессы репаративной регенерации печени. Эти данные следует использовать при определении обоснованной терапии гепатопротекторами в зависимости от типа поражения печени.

Предложены конкретные методики коррекции нарушений метаболизма при использовании не обладающего цитотоксичностью гепатопротектора – экстракта солянки холмовой; показания к применению препарата определены его аминокислотным составом.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В пределах терапевтического диапазона доз гепатотропные препараты могут не обладать цитотоксичностью, и воздействовать на метаболические потоки и их регуляцию; обладать цитотоксичностью и действовать через стимуляцию регенераторных процессов гепатоцитов на клеточном и внутриклеточном уровнях.

2. Для оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов следует применять исследования на клетках с редуцированным эндоплазматическим ретикуломом (прямое цитотоксическое действие), перитонеальных макрофагах (опосредованное цитотоксическое действие) и гепатоцитах (действие через механизмы некроза или апоптоза). Явление скрытой цитотоксичности может

исследоваться в митотическую фазу репаративной регенерации печени в эксперименте.

3. Препарат урсодезоксихолевой кислоты, обладая цитотоксичностью в терапевтическом диапазоне доз, вызывает повреждения отдельных гепатоцитов и через синхронизацию вступления клеток печени в митотическое деление обеспечивает более быстрое и совершенное течение процессов репаративной регенерации печени. Однако при грубом повреждении печени этот препарат может усиливать альтерационные эффекты.

4. Препарат тауроурсодезоксихолевой кислоты может усиливать регенерацию внутриклеточных структур, например, митохондрий, стимулировать метаболизм и ускорять течение восстановительных процессов в печени.

5. Экстракт солянки холмовой не обладает повреждающим действием на клетки печени в терапевтическом диапазоне доз и стимулирует восстановительные процессы, благодаря доставке аминокислот с разветвленным радикалом, аминокислот, необходимых для осуществления антиоксидантной функции печени и других низкомолекулярных метаболитов и биорегуляторов. Инсулиноподобное действие экстракта солянки холмовой исчезает при сочетанных поражениях печени, например, при облучении и холестериновой диете. Клиническое применение экстракта солянки холмовой оправдано при заболеваниях, сопряженных с поражением печени и инсулинорезистентностью и реализуется через восстановление метаболических функций печени, продукцию проинсулина, С-пептида и лептина.

Личный вклад соискателя. Автором диссертации создана стратегия и тактика исследования, включающая исследования *in vitro* на культурах клеток, исследования *in vivo* на экспериментальных животных и клинко-лабораторные наблюдения. Соискателем лично выполнена основная часть исследовательской работы, проведен анализ современной литературы по проблеме, обработан фактический материал, сделаны научно-обоснованные выводы, оформлена диссертационная работа. Методическую и практическую помощь в проведении исследований оказывали сотрудники кафедры биохимии Витебского государственного медицинского университета, Института радиобиологии НАН Беларуси, ЦНИЛ Гродненского государственного университета, Института биохимии НАН Беларуси, Института Биомедицинской химии РАМН и Йенского Института Патобиохимии (Германия, грант WEI-002-97). Их участие в некоторых лабораторных исследованиях отражено в совместных публикациях.

Апробация результатов работы. Основные положения работы представлены в материалах и обсуждены на: VII Всероссийском симпозиуме «Эко-

лого-физиологические проблемы адаптации» (Москва, 1994); Hepatology Conference «Interdisciplinary problems of liver transplantation» (Szczecin, 1994); Falk Symposium № 78 «Cytokines and the Liver» (Freiburg, 1994); 29th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (Athens, 1994); 11st Congress of Polish Hepatology Association (Szczecin, 1995); конференции «Витамины и здоровье населения Беларуси и смежных регионов» (Гродно, 1995); X International Congress of Liver Diseases. Acute and Chronic Liver Disease: Molecular Biology And Clinics (Basel, 1995); 11th IFCC European Congress of Clinical Chemistry (Tampere, 1995); 1st European Congress of Pharmacology (Milan, 1995); международной конференции, посвященной 5-летию образования Гомельского государственного медицинского института (Гомель, 1995); международном симпозиуме гастроэнтерологов (Минск, 1995); II Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 1995); 5th Congress of the European Society for Biochemical Research on Alcoholism (Stuttgart, 1995); 15th European Workshop on Drug Metabolism (Jena, 1996); II Белорусском симпозиуме гепатологов Беларуси (Гродно, 1996); Фальк-симпозиуме № 92 «Новые направления в гепатологии» (Санкт-Петербург, 1996); Falk Symposium № 103 «Liver and Nervous System» (Freiburg, 1997); 2-м белорусско-российском симпозиуме «Биохимические механизмы эндогенной интоксикации» (Гродно, 1997); 6th Congress of the European Society for Biochemical Research on Alcoholism (Stockholm, 1997); Symposium «Evening Primrose and Other Containing N-6 or N-3 Fatty Acids in Prevention and Treatment» (Sulejow, 1998); III Белорусском симпозиуме «Актуальные вопросы гепатологии» (Гродно, 1998); East-West Symposium on Biomedical Research of Alcoholic-related Disease (Grodno, 1998); Международной научной конференции «Фундаментальные прикладные аспекты радиобиологии: биологические эффекты малых доз и радиоактивное загрязнение среды» (Минск, 1998); Республиканской научно-практической конференции «Медицинская наука и ее связь с практическим здравоохранением» (Витебск, 1998); 1-й Республиканской конференции «Клинико-лабораторные аспекты липидологии» (Витебск, 1998); Всероссийской конференции с международным участием «Проблемы противолучевой защиты» (Москва, 1998); 7th Congress of the European Society for Biochemical Research on Alcoholism (Barcelona, 1999); Международной конференции «Клинико-лабораторные аспекты метаболической терапии» (Витебск, 1999); юбилейной конференции «Качество и эффективность применяемых медицинских технологий» (Витебск, 1999); научно-практической конференции «Биологически-активные добавки к питанию и лекарственные препараты на натуральной основе в профилактике, лечении и реабилитации» (Москва, 2000); 55-й научной сессии ВГМУ (Витебск, 2000); IV съезде Белорусского общественного объединения «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2000); Междуна-

родной научной конференции «Биологически активные соединения в регуляции метаболического гомеостаза» (Гродно, 2000); 6th Alps-Adria Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Zagreb, 2000).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 65 работ, в том числе монография, 33 статьи (14 – в научных журналах (из них 4 – в зарубежных), 19 – в сборниках научных работ), 19 abstracts (из них 9 – в зарубежных журналах), 12 тезисов. Всего опубликовано 232 страницы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов, 5-ти глав экспериментальных исследований, анализа и обобщения полученных результатов, заключения и списка использованных источников. Работа изложена на 317 страницах машинописного текста, содержит 105 таблиц, 53 рисунка и 2-х приложений (40 листов). Список использованной литературы включает 134 отечественных и 541 иностранных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты поставлены на 1503 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Гепатотропные препараты УДХК и ТУДХК предоставлены фирмой Dr. Falk Pharma GmbH (Германия), экстракт солянки холмовой (ЭСХ) и препараты солянки холмовой – научно-производственной фирмой «Фитос» (Москва), гликохенодезоксихолевая кислота (ГХДХК) производства фирмы Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Исследование цитотоксичности проводили с использованием клеточных линий L929 и L41, которые культивировались в среде 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и антибиотиков. Препараты добавляли к монослою клеток в диапазоне доз 50-1000 мкг/мл среды и инкубировали в течение 1-4 суток. Подсчет клеток в монослое производили по методике Gillies R.J. (1986), синтез ДНК оценивали по включению [³H]тимидина (2,5 мКи/мл), белка – [¹⁴C]аминокислот (40 мКи/мл). Для культивирования клеток НГУК-1 использовали среду RPMI-1640 с добавлением 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки.

Секрецию фактора некроза опухоли определяли по методу Fish H. и Gifford G.E. (1983). Оценка липогенеза осуществляли по методу Rodbell M. (1964) по включению [¹⁴C]глюкозы в липиды жировых эпидидимальных клеток.

Для получения гепатоцитов использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200-250 г. Гепатоциты выделяли с помощью раствора коллагеназы (тип I, Seromed^R, Biochrom KG, Berlin, Germany), согласно методике Zimmerman T. и соавт. (1992). Использовали суспензии с количеством жизнеспособных гепатоцитов > 85%. Суспензию клеток ($0,5 \times 10^6$ клеток/мл) в среде William's E (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), содержащей 10% фетальной сыворотки телят, 26 ммоль NaHCO_3 и 50 мкг/мл гентамицина, пассировали в покрытые коллагеном 12-луночные культуральные плашки и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . Через 2 часа культивирования среду заменяли новой и добавляли исследуемые препараты (25-400 мкг/мл). Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной среде определяли с помощью наборов фирмы Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Активность общей ЛДГ оценивали после обработки монослоя гепатоцитов 0,1% раствором тритона X-100. Биосинтез ДНК определяли по включению [$6\text{-}^3\text{H}$]тимидина в ДНК (1 мкКи/луночка) по Gardner M.J. (1996) через 12 часов инкубации клеток с препаратами. Для определения количества ДНК клетки снимали с плашек инкубацией с раствором коллагеназы, лизировали буфером (0,1% додецилсульфата, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис, pH 7,4) и определяли ДНК флюорометрически после окрашивания красителем Hoechst 33258, используя в качестве стандарта ДНК тимуса телят. Количество белка определяли ВСА-микрометодом, синтез белка – по включению [^3S]метионина (40 мкКи) через 3 часа инкубации клеток с препаратами. Определение радиоактивности проводили на β -сцинтилляционном счетчике фирмы Beckman (Германия).

Биохимические признаки апоптоза исследовали по фрагментации ДНК методом электрофореза. Через 4 часа инкубации гепатоцитов ($0,5 \times 10^6$ клеток/мл) с препаратами клетки промывали холодным фосфатным буфером, лизировали смесью, содержащей 100 мМ/л Трис-HCl (pH 8,0), 200 мМ/л NaCl, 5 мМ/л ЭДТА и 0,2% додецилсульфата натрия, и механически снимали с плашек. Затем к гепатоцитам добавляли протеиназу К (20 мг/мл) и смесь инкубировали в течение ночи при 56°C. ДНК экстрагировали дважды смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1), промывали 70% этанолом, высушивали, суспензировали в 10 мМ Трис-HCl и обрабатывали рибонуклеазой А (10 мг/мл) в течение 30 минут при 37 °C. Электрофорез ДНК (5 мкг) осуществляли в 1,5% агарозном геле, окрашенном SYBR Green II, при 35 V в течение 4 ч. Наличие апоптоза оценивали по межнуклеосомной фрагментации ДНК.

Морфологические признаки апоптоза выявляли путем определения конденсации хроматина с использованием флюоресцентного микроскопа Olympus AX 70 после окраски гепатоцитов Hoechst 33342. Подсчитывали 500 клеток и количество апоптотических клеток выражали в процентах. Для выявления

некроза гепатоциты окрашивали пропидиум йодидом и проводили подсчет клеток, используя флюоресцентный микроскоп.

Для оценки физиологической регенерации препараты УДХК, ТУДХК и ЭСХ вводили интрагастрально в дозе 200 мг/кг в течение 20 дней. Контрольные животные получали 1% раствор метилцеллюлозы (МЦЛ). Части животных через сутки после последнего введения выполнялась 70 % частичная гепатэктомия (ЧГЭ) или ишемия печени. ЧГЭ проводили в утренние часы под эфирным наркозом в соответствии с классическим методом Хиггинса и Андерсона (1931). Частичную ишемию печени воспроизводили под эфирным наркозом путем окклюзии микрозажимом центральной и левой боковой долей печени в течение 20, 60 или 180 минут, тотальную – в течение 30 минут. Контрольные животные подвергались ложной операции (лапаротомия и зашивание брюшной стенки). Однократное внешнее γ -облучение осуществлялось на установке ИГУР с мощностью дозы $2,7 \times 10^4$ Гр/с и фокусным расстоянием 3 м в дозах 0,25 Гр и 5,0 Гр в Институте радиобиологии НАН Беларуси. Исследуемые препараты вводились с период развития транзиторной радиационно-индуцированной дислипотеинемии (ДЛП) с 10 по 17 сутки (Чиркин А.А. и соавт. 1990-1994). Часть животных получала УДХК (50 мг/кг) и ТУДХК (50 мг/кг) в период регрессии ДЛП (17- 23 сутки) и после ЧГЭ в дозе 5 мг/кг, проводимой на 17-е сутки после облучения.

Хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ) моделировалась интрагастральным введением 25% раствора этанола в дозе 3,5 г/кг массы на протяжении 56 дней с 10 до 11 часов утра. Контрольным животным вводили эквивалентное количество воды. В данной серии ЭСХ вводился в те же дни с 15 до 16 часов. Алиментарную гиперхолестеринемии воспроизводили путем содержания крыс на атерогенной диете, содержащей 3,5% холестерина, 0,2% метилтиоурацила и 20% прогретого подсолнечного масла/100 г стандартного корма.

Интенсивность синтеза ДНК в гепатоцитах оценивали по включению [^3H]тимидина, который вводили в дозе 40 мКи на крысу за 2 часа до декапитации [Абакумова О.Ю. и соавт., 1989]. Количество ДНК и РНК в гомогенатах и ядрах определяли по методу Blobel и Potter (1968), основанному на спектрофотометрическом определении ДНК при λ 270 и 290 нм и РНК при λ 270. Ядра гепатоцитов получали методом дифференциального центрифугирования [Абакумова О.Ю., 1977]. Для определения радиоактивности ДНК соответствующую фракцию осаждали 10% ТХУ на миллиметровые фильтры и подсчитывали количество импульсов за 1 минуту на β -счетчике фирмы Beckmann. Удельную радиоактивность рассчитывали как импульсы/минуту/1 мг ДНК.

Содержание холестерина в печени определяли по методу Bragdon J. (1960). Триглицериды определяли с помощью стандартных наборов фирмы «Lachema».

Активность ферментов углеводного обмена определяли в микросомально-цитоплазматической фракции печени, полученной центрифугированием гомогенатов в рефрижераторной центрифуге при 12000 g. Гомогенаты готовили при 2-4 °C на растворе, содержащем 0,05 М Трис-НСl, 0,15 М хлористый калий и 0,001 М ЭДТА [рН 7,8]. В ткани печени определяли активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1.) и глюкокиназы (КФ 2.7.1.2.) – мкмоль НАДФ/1 г·1 ч при 25 °C [Salas M. et al., 1963], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.43) – мкмоль НАДФ/1 г·1 ч при 25 °C [Захарьин Ю.Л., 1967, 1968], рибозо-5-фосфатметаболизирующих ферментов – мкмоль Р-5-Ф/1 г·1 мин при 37°C по убыли рибозо-5-фосфата в соответствии с предложениями Р.-М.Р.Шатинскене и А.И.Колотиловой (1970), а также А.М.Каразе и А.И.Колотиловой (1973), транскетолазы (КФ 2.2.2.1) – мкмоль С-7-Ф/1 г·1 мин при 37 °C по прибыли седогептулозо-7-фосфата [Головацкий И.Д., 1965, Bruns F.H., 1958], глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9) – мкмольРн/1 г·1 мин при 37 °C [Harper A.E. et al., 1958].

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли по И.Д.Стальной (1977) и выражали в нмоль/г с использованием молярного коэффициента экстинкции $2,2 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) (ТБК-позитивных веществ) в печени определяли по И.Д.Стальной и Т.Г.Гаришвили (1977) и выражали в нмоль/г с использованием молярного коэффициента экстинкции $1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹. Активность СОД в печени изучали по методу R. Fried (1975) и выражали в условных единицах на 1 г печени. Скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах печени оценивали по скорости образования МДА за 1 ч инкубации и выражали в нмоль МДА/1 г/час.

Основные биохимические параметры сыворотки крови и активность ферментов определяли с помощью стандартных наборов фирмы «Кормей ДиАна». Концентрацию лептина, проинсулина, С-пептида и IGF-1 определяли с помощью ELISA метода с использованием стандартных наборов фирмы «DRG Instruments GmbH» (США).

Морфологические исследования проводили в парафиновых срезах печени, окрашенных гематоксилин-эозином. Для электронномикроскопических исследований кусочки печени фиксировали 1% раствором четырехокси осмия на 0,1 М буфере Миллонига при рН 7,4 и температуре 4 °C в течение 2 ч, затем дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне и заливали в смесь эпона и аралдита. Срезы, изготовленные на ультратоме LKB-III, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-100 при увеличениях 4,6 и 10 тысяч [Millonig G.A., 1961, Reynolds E.S., 1963, Watson M.L., 1958].

Аминокислотный состав препаратов солянки холмовой изучали методом катионообменной хроматографии в одноколоночном варианте на автома-

тическом анализаторе аминокислот ААА-Т-339М (Чехия) [Бенсон Д. и соавт., 1974]. В ряде экспериментов параллельно оценивали спектр свободных аминокислот с помощью ВЭЖХ на приборе “Waters-206” фирмы “Millipore-Waters” (США). Воспроизводимость использованных методов составила $\pm 1,5\%$. Количество аминокислот и низкомолекулярных азотсодержащих веществ печени выражали в мкмоль/кг, в препаратах солянки холмовой в мкмоль/л разведения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы были проведены исследования цитотоксичности исследуемых препаратов в диапазоне доз 50-1000 мкг/мл на культурах клеток с редуцированным эндоплазматическим ретикуломом L929 и L41.

Препарат УДХК в дозах 50 и 100 мкг/мл не обладал цитотоксическим эффектом на клетки L929. При дозах УДХК 400 и 1000 мкг/мл отмечалось уменьшение числа клеток в монослое и через 48 часов инкубации количество клеток составило 74,2% и 81,5% соответственно. Степень цитотоксичности увеличивалась в процессе инкубации и имела дозозависимый характер (рис. 1). Через 96 часов инкубации наиболее выраженный ингибирующий эффект отмечался при дозах препарата 200-1000 мкг/мл.

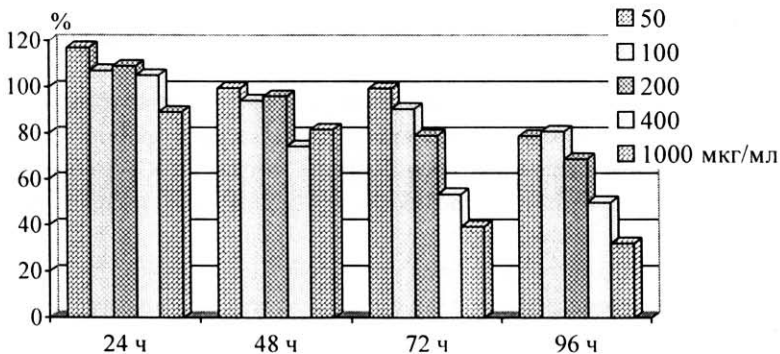


Рис. 1. Влияние УДХК на рост клеток L929.

Через 48 часов инкубации клеток L929 с УДХК скорость включения [^3H]тимидина в ДНК снижалась на 62%, 99,1% и 99,4% при дозах препарата 200, 400 и 1000 мкг/мл, соответственно (рис. 2). Данный эффект сохранялся через 96 часов эксперимента. При инкубации клеток линии L41 с препаратом УДХК в дозах выше 100 мкг/мл выявлено уменьшение числа клеток в монослое, ингибирование биосинтеза ДНК на 16,6%- 93,6% (48 часов) и 19,5%-

95,03% (96 часов) при всех исследуемых дозах препарата. После инкубации клеток L929 и L41 с препаратом УДХК отмечено выраженное снижение биосинтеза белка при дозах препарата 200-1000 мкг/мл (рис. 3).

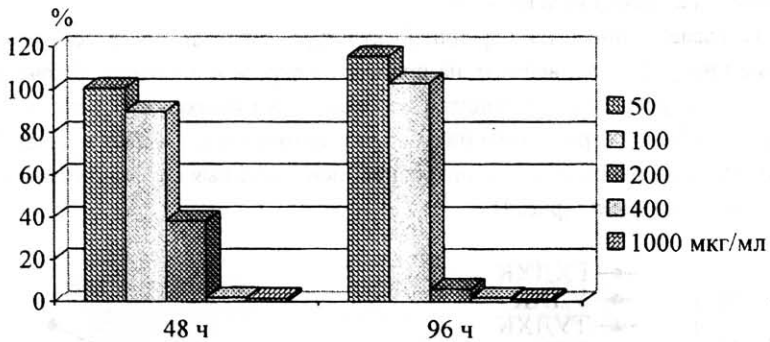


Рис. 2. Влияние УДХК на включение [³H]тимидина в ДНК клеток L929.

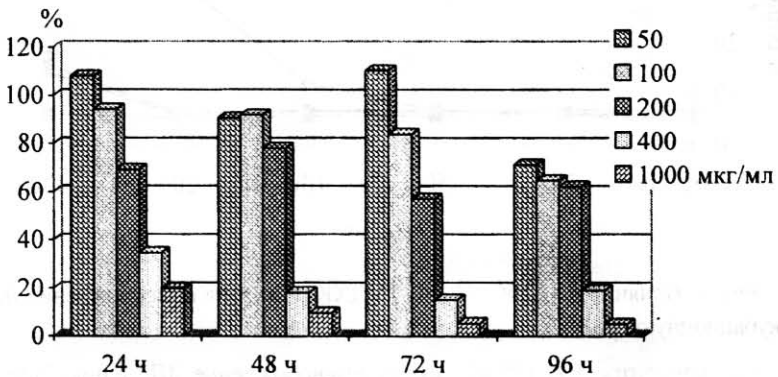


Рис. 3. Влияние УДХК на биосинтез белков в клетках L929.

При инкубации клеток L929 с препаратом ТУДХК в диапазоне доз 50-1000 мкг/мл не обнаружено изменения числа клеток в монослое в течение всего периода эксперимента, снижения включения [³H]тимидина в ДНК и меченой смеси аминокислот в белки клеток L929 при дозах 50-400 мкг/мл. ЭСХ не обладал прямой цитотоксичностью на данных культурах клеток в диапазоне концентраций 50-1000 мкг/мл, а в дозах 50-200 мкг/мл стимулировал биосинтез белков на 20-50% в клетках L929, а в клетках линии L41 через 24 часа инкубации при дозах 200 и 400 мкг/мл на 20% и 62%, соответственно.

С помощью жировых эпидидимальных клеток крыс установлен инсулиноподобный эффект препарата ЭСХ, проявляющийся в стимуляции липогенеза из ¹⁴C-глюкозы. Все три исследуемых препарата не оказывали опосредован-

ного цитотоксического эффекта на пролиферацию клеток через секрецию фактора некроза опухоли перитонеальными макрофагами мышей. Аналогичную степень цитотоксичности препараты проявляли и при инкубации с клетками невриномы Гассерова узла НГУК-1.

В исследованиях на первичной культуре гепатоцитов крыс изучено влияние гепатотропных веществ на процессы некроза и апоптоза. В качестве индуктора повреждения гепатоцитов использовали гликохенодезоксихолевую кислоту (ГХДХК). Через 4 часа инкубации гепатоцитов с ГХДХК в дозах 25-50 мкг/мл по активности ЛДГ в инкубационной среде выявлены признаки цитолитического эффекта (рис. 4).

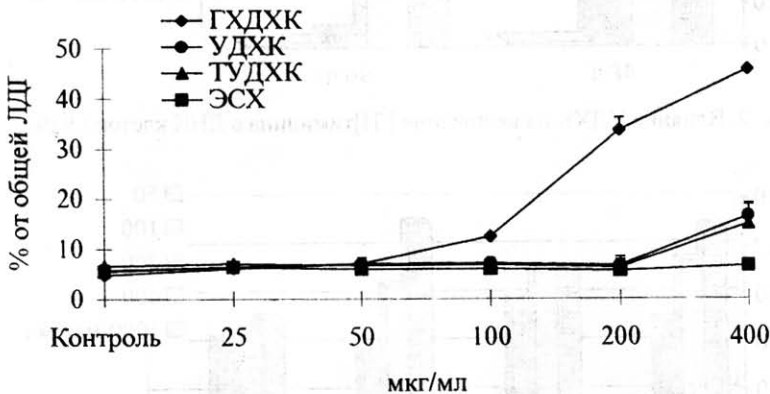


Рис. 4. Влияние ГХДХК, УДХК, ТУДХК и ЭСХ на высвобождение ЛДГ в инкубационную среду.

При концентрациях 100–400 мкг/мл высвобождение ЛДГ в инкубационную среду увеличивалось с $4,89 \pm 0,19\%$ (контроль) до $45,7 \pm 0,19\%$ (400 мкг/мл) ($P < 0,05$). Увеличение активности ЛДГ при инкубации с препаратами УДХК и ТУДХК обнаружено только при концентрации 400 мкг/мл. Препарат ЭСХ не обладал цитотоксичностью в изученном диапазоне доз. Препарат ТУДХК уменьшал цитолитический эффект ГХДХК и при концентрации 200 мкг/мл полностью предотвращал его, что согласуется с данными других исследователей [Benz Ch. et al., 1998]. Препарат УДХК в дозах выше 50 мкг/мл потенцировал некрозогенный эффект ГХДХК, увеличивая высвобождение ЛДГ. Препарат ЭСХ не обладал протективным эффектом при всех применяемых дозах.

При изучении биосинтеза ДНК выявлено, что ГХДХК (25–400 мкг/мл) уменьшала, препараты УДХК и ТУДХК не влияли, а препарат ЭСХ в дозах 50–100 мкг/мл стимулировал включение $[6-^3\text{H}]$ тимидина в ДНК изолированных гепатоцитов. Препарат ТУДХК обладал дозозависимым протективным эффек-

том и предотвращал ингибирование включения предшественника в ДНК, вызванное ГХДХК.

ГХДХК (25-400 мкг/мл) вызвала дозозависимое снижение синтеза клеточных протеинов на 30,5-70,8% и секретируемых – на 24-50,3%. Препарат ТУДХК обладал слабым ингибирующим эффектом только при высокой концентрации, что согласуется с данными Lin Y. et al. (1994), показавшими отсутствие влияния тауриновых конъюгатов желчных кислот на синтез и секрецию белка. В то же время препарат УДХК индуцировал уменьшение биосинтеза клеточных протеинов на 17,7-61% и экспортных белков приблизительно на 50% при всех используемых дозах, что возможно обусловлено наличием специфических сайтов связывания желчных кислот в молекулах белков [Hillaire S. et al., 1995]. Препарат ЭСХ стимулировал включение [³⁵S]метионина в клеточные и секретируемые протеины при всех исследуемых дозах. Выявлен незначительный протективный эффект препарата ТУДХК на биосинтез клеточных протеинов при совместной инкубации с ГХДХК (100 мкг/мл).

Инкубация гепатоцитов с 50 мкг/мл ГХДХК индуцировала апоптоз с образованием типичной ДНК «лестницы» при электрофорезе (рис. 5), конденсацией хроматина и фрагментацией ядра (рис. 7Б). После инкубации с ГХДХК количество апоптотических клеток повышалось с 0,67±0,8% в контроле до 15,2±3,49% в экспериментальной группе (табл. 1). Препараты ТУДХК, УДХК и ЭСХ не вызывали ни апоптоз, ни некроз гепатоцитов (рис. 5, 7, табл. 1). Желчные кислоты оказывали антиапоптозогенный эффект (рис. 6, 7), а препараты ЭСХ и ТУДХК обладали антинекрозогенным эффектом, характеризующимся уменьшением числа клеток, окрашенных пропидиум йодидом (табл.1).

Таблица 1. Влияние препаратов на апоптоз и некроз гепатоцитов.

Препарат и доза (мкг/мл)	% апоптоза	% некроза
Контроль	0,67±0,8	1,90±1,01
ГХДХК 50	15,2±3,49*	6,28±1,0*
ТУДХК 50	1,73±0,42†	2,1±1,13†
ТУДХК 200	1,87±0,50†	2,77±0,67†
УДХК 50	1,07±0,46†	1,7±0,82†
УДХК 200	1,80±0,72†	2,63±0,67†
ЭСХ 50	0,93±0,31†	2,4±1,06†
ЭСХ 200	1,87±0,42†	2,33±0,23†
ГХДХК 50+ТУДХК 50	4,17±1,35*†	2,90±0,79†
ГХДХК 50+ТУДХК 200	2,33±1,67†	1,67±0,70†
ГХДХК 50+УДХК 50	7,2±0,35*†	7,0±0,2*
ГХДХК 50+УДХК 200	5,43±0,75*†	8,93±3,91*
ГХДХК 50 + ЭСХ 50	13,57±2,15*	5,43±0,78*
ГХДХК 50 + ЭСХ 200	12,57±2,05*	5,20±0,61*†

Примечание: * - P < 0,05 по сравнению с контролем,
† - P < 0,05 по сравнению с ГХДХК.

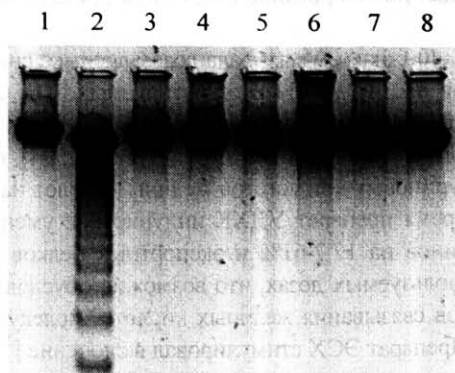


Рис. 5. Влияние ГХДХК, ТУДХК, УДХК и ЭСХ на межнуклеосомную фрагментацию ДНК. 1 – контроль, 2 – ГХДХК (50 мкг/мл), 3 – ТУДХК (50 мкг/мл), 4 – ТУДХК (200 мкг/мл), 5 – УДХК (50 мкг/мл), 6 – УДХК (200 мкг/мл), 7 – ЭСХ (50 мкг/мл), 8 – ЭСХ (200 мкг/мл).

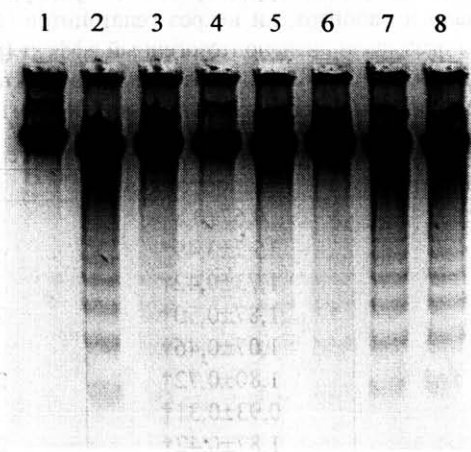


Рис. 6. Влияние УДХК, ТУДХК и ЭСХ на межнуклеосомную фрагментацию ДНК при инкубации с ГДХК (50 мкг/мл). 1 – контроль, 2 – ГХДХК 50 мкг/мл, 3 – ГХДХК + ТУДХК 50 мкг/мл, 4 – ГХДХК + ТУДХК 200 мкг/мл, 5 – ГХДХК + УДХК 50 мкг/мл, 6 – ГХДХК + УДХК 200 мкг/мл, 7 – ГХДХК + ЭСХ 50 мкг/мл, 8 – ГХДХК + ЭСХ 200 мкг/мл.

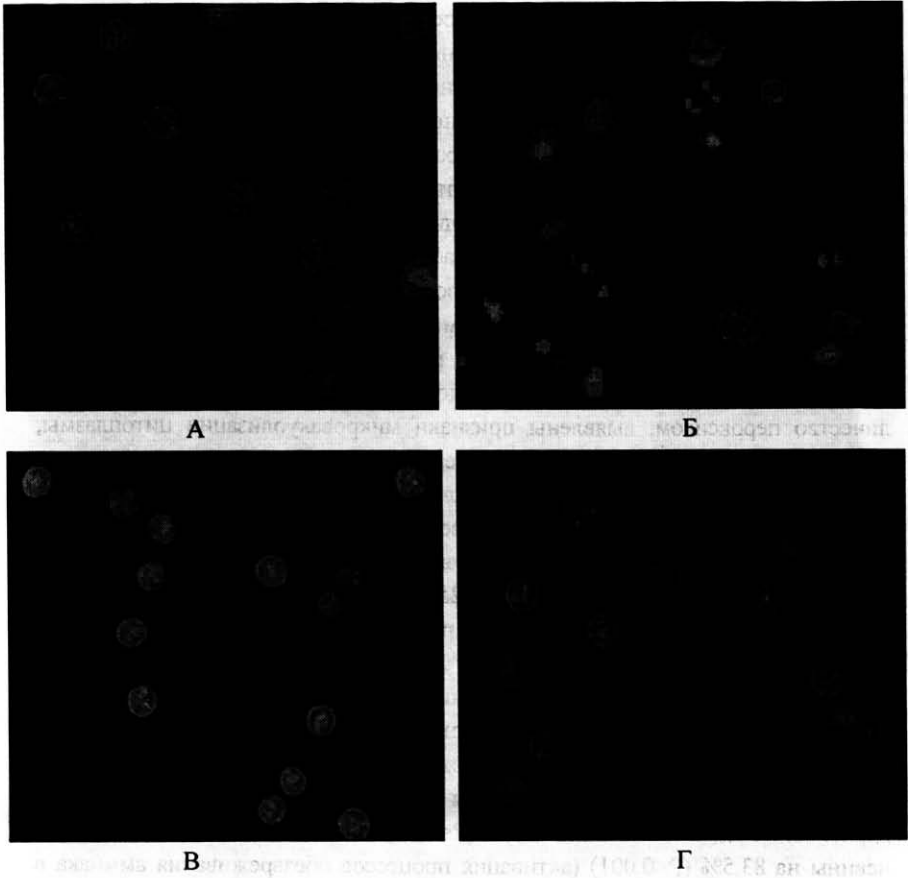


Рис. 7. Влияние препаратов на конденсацию хроматина и фрагментацию ядер гепатоцитов: А – контроль, Б – ГХДХК, 50 мкг/мл, В – ЭСХ 200 мкг/мл, Г – ГХДХК 50 мкг/мл + ТУДХК 50 мкг/мл

Таким образом, исследуемые препараты по цитотоксическому эффекту *in vitro* можно разделить на три типа: обладающий прямой цитотоксичностью в дозах, превышающих 100 мкг/мл препарат УДХК, не обладающий цитотоксичностью препарат ТУДХК, и не обладающий цитотоксичностью и стимулирующий пролиферацию и биосинтетические процессы препарат ЭСХ. В целом эффекты, проявляемые препаратом ЭСХ *in vitro*, можно охарактеризовать как инсулиноподобные.

По мнению Д.С.Саркисова (1976) «действие любого вещества, в конечном счете, оказывает влияние на процесс физиологической внутриклеточной регенерации ультраструктур, отражающий собой непрерывное обновление вещества клетки на молекулярном уровне». Поэтому, мы исследовали действие препаратов с различной цитотоксичностью сначала на процессы физиологической, а затем и репаративной регенерации печени.

Введение препарата УДХК интактным животным вызвало появление в печени единичных клеток с вакуольной дистрофией, лизисом и пикнозом ядер, а также единичных микронекрозов, слабо выраженных признаков воспалительной реакции. При электронной микроскопии не выявлено изменений ядер и ядрышек, однако, количество крист в митохондриях, число свободных рибосом было сниженным, число связанных рибосом, гантелеобразных (делящихся) и мелких (новообразованных) митохондрий было увеличено, снижено количество пероксисом, выявлены признаки микровакуолизации цитоплазмы, что свидетельствует о повреждении препаратом УДХК ультраструктур гепатоцитов. Такое микроповреждающее действие стимулировало восстановительные процессы в печени, что подтверждается результатами светооптической морфометрии. Показано увеличение количества митозов ($0,28 \pm 0,032\%$), двуядерных ($80,7 \pm 8,25\%$) и гиперхромных ($2,5 \pm 0,08\%$) клеток в печени крыс, получавших препарат УДХК, по сравнению с интактными животными ($0,03 \pm 0,012\%$, $23,5 \pm 4,5\%$ и $0,97 \pm 0,07\%$, $P < 0,001$). По всей видимости, микроповреждающее действие УДХК можно рассматривать как адекватный стимул синхронного вступления гепатоцитов в деление. На уровне интегральных биохимических параметров сыворотки крови этот процесс характеризовался увеличением в сыворотке крови содержания мочевой кислоты на $46,7\%$ ($P < 0,05$) (антиоксидантный эффект), мочевины на $83,5\%$ ($P < 0,001$) (активация процессов обезвреживания аммиака в печени), уменьшением уровня холестерина на $50,7\%$ ($P < 0,01$) (использование холестерина для построения клеточных мембран), триацилглицеринов на $28,9\%$ ($P < 0,01$) (источник энергии), снижением синтетических процессов в печени (уменьшение ХС ЛПВП в 1,92 раза и ХС ЛПОНП в 1,71 раза, $P < 0,001$).

Таким образом, мембранотропное действие УДХК при хроническом применении препарата реализовалось в виде комплекса микроповреждающих эффектов, обеспечивающих включение восстановительных процессов на структурном и функциональном уровнях, что и определяет терапевтическую фармакодинамику препарата.

Введение интактным животным препарата ЭСХ не оказало влияния на морфологическую картину срезов печени при световой и электронной микроскопии. Количество митозов, двуядерных и гиперхромных клеток в печени

этих крыс не отличалось от контрольной группы. Содержание нуклеиновых кислот в печени уменьшалось при введении препарата ЭСХ, что может быть результатом увеличения гидратации ткани в результате стимуляции белоксинтезирующей функции гепатоцитов. На это указывает повышение содержания белкового компонента липопротеинов, синтезируемых в печени. Уменьшение содержания в сыворотке крови ХС ЛПВП в 2,85 раза ($P < 0,001$) обусловлено общим гипохолестеринемическим эффектом ЭСХ. В условиях *in vivo* проявлялся инсулиноподобный эффект препарата ЭСХ: увеличение содержания триацилглицеринов в печени в 2,2 раза ($P < 0,001$) и снижение в плазме крови в 1,32 раза ($P < 0,05$), уменьшение уровня глюкозы в 1,4 раза ($P < 0,001$), повышение синтеза экспортных белков апопротеинов ЛПВП на 54,9% ($P < 0,001$) и альбуминов на 6,7% ($P < 0,05$). В сыворотке крови отмечалось увеличение содержания мочевины на 33,7% ($P < 0,001$). Данные эффекты препарата ЭСХ могут быть обусловлены наличием в его составе полного набора аминокислот, включая незаменимые, и аминокислот с разветвленным радикалом [Чиркин А.А., Шейбак В.М. и др., 1998], необходимых для мочевинообразования, синтеза белков и проявления инсулиноподобного эффекта [Cahill G.F., 1970].

После интрагастрального введения препарата ТУДХК, не обладающего цитотоксичностью, при световой микроскопии срезов печени крыс не выявлено микроповреждающих эффектов. При морфометрическом анализе обнаружено достоверное увеличение количества гиперхромных ($1,32 \pm 0,12\%$ (ТУДХК) и $0,97 \pm 0,07\%$ (МЦЛ), $P < 0,05$) и двуядерных клеток ($39,5 \pm 1,27\%$ (ТУДХК) и $23,5 \pm 4,50\%$ (МЦЛ), $P < 0,01$), что является признаком активации внутриклеточной регенерации [Карташова О.Я., 1985]. При электронной микроскопии выявлены признаки повреждения ультраструктур, характеризующиеся наличием многочисленных полиморфных митохондрий и гантелеобразных (делящихся) форм митохондрий (клетки с такими митохондриями рассматриваются как клетки, находящиеся в состоянии специфической деятельности) [Бекетова Т.Н., 1976], множество свободных рибосом (признак активации биосинтеза белка для собственных нужд клетки). В некоторых случаях в митохондриях просматривались осмиофильные гранулы (представляют собой скопления катионов кальция и магния и их присутствие свидетельствует о способности митохондрий накапливать катионы, необходимые для функционирования митохондриальных ферментов). Исследование холестеринового спектра сыворотки крови выявило менее выраженную гипохолестеринемию по сравнению с препаратом УДХК, причем уменьшение происходило за счет ЛПНП. Биохимические параметры сыворотки крови - мочевины, мочевого сахара, билирубин, альбумин, активность сывороточных ферментов - не отличались от интактных животных. Полученные результаты позволяют констатировать микроповреждающие эффекты препарата ТУДХК на уровне ультра-

структур клетки. Это, вероятно, обеспечивает повышение напряженности клеточных систем и увеличению функционального потенциала клетки.

Для оценки репаративной регенерации печени после 20-дневного введения препаратов УДХК и ЭСХ производили 70% ЧГЭ для синхронизации вступления гепатоцитов в деление. Предварительное 20-дневное введение УДХК стимулировало репаративную регенерацию печени, что подтверждалось динамикой содержания нуклеиновых кислот, смещением пика синтеза ДНК на 18-24 часа после ЧГЭ (контрольная группа 24-30 ч) (рис. 8).

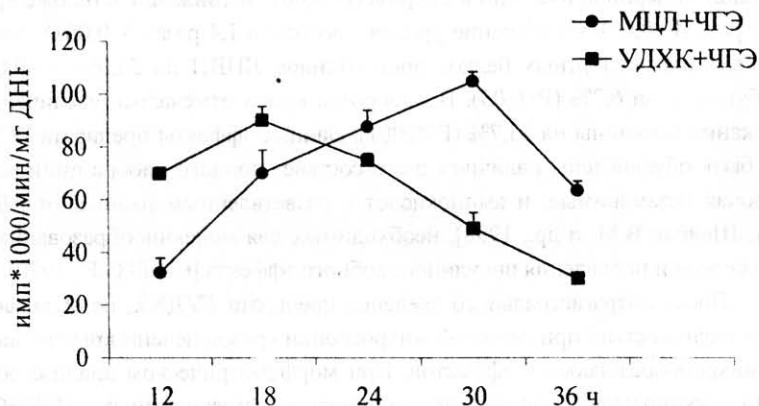


Рис. 8. Влияние УДХК на включение [^3H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов в течение 36 часов после частичной гепатэктомии.

Через 96 часов после ЧГЭ в сыворотке крови подопытной группы отмечены признаки более выраженных нарушений функционального состояния гепатоцитов, чем в контроле: снижение содержания ХС ЛПВП в 1,25 раза ($P < 0,02$) и увеличение ХС ЛПНП в 2 раза ($P < 0,001$), что может быть обусловлено снижением специализированных функций печени (синтез липопротеинов и рецепторов) в условиях стимулированной пролиферации [Wilson, Spelsberg, 1976]. Однако, через 10 суток после ЧГЭ отмечена тенденция к нормализации основных биохимических параметров сыворотки крови и печени подопытных животных. В митотическую фазу репаративной регенерации печени (1-4 сутки после ЧГЭ) у крыс, предварительно получавших УДХК, митотическая активность гепатоцитов была достоверно выше ($12,3 \pm 1,86\%$), чем у крыс, получавших МЦЛ ($7,24 \pm 0,76\%$, $P < 0,001$). В гипертрофическую фазу репаративной регенерации печени (6-10 сутки после ЧГЭ) у подопытных крыс митотический индекс был достоверно ниже ($0,15 \pm 0,0156\%$ - $0,30 \pm 0,026\%$, $P < 0,001$), а морфологические изменения в регенерирующих гепатоцитах были выражены в

меньшей степени, чем у контрольных животных. Таким образом, микроальтерационное действие препарата УДХК стимулировало процессы регенерации в ткани печени. Удаление 70% ткани печени в этот период сопровождалось более выраженной репаративной регенерацией органа.

В печени крыс, получавших ЭСХ, через 24 часа после ЧГЭ митотический индекс составил $9,25 \pm 0,06\%$, количество гиперхромных клеток - $1,22 \pm 0,03\%$, что превышало значения этих параметров у крыс, получавших МЦЛ ($7,24 \pm 0,76\%$, $P < 0,05$ и $0,54 \pm 0,06\%$, $P < 0,001$, соответственно). Репаративная регенерация печени у крыс, предварительно получавших ЭСХ, характеризовалась увеличением включения [^3H]тимидина в ДНК на 49,2% в гомогенатах и на 110,4% в ядрах гепатоцитов через 24 часа после ЧГЭ и была достоверно выше в течение 36 часов после ЧГЭ. Учитывая, что введение интактным животным ЭСХ приводит к накоплению общего пула аминокислот в печени [Шейбак В.М., 1999], стимуляция репаративной регенерации печени ЭСХ обуславливается, вероятно, доставкой низкомолекулярных субстратов, в том числе аминокислот, необходимых для биосинтеза нуклеиновых кислот, а также регуляторной ролью аминокислот на метаболизм [Нефедов Л.И., 2000]. Репаративная регенерация печени после ЧГЭ на фоне введения ЭСХ сопровождалась гипогликемией и мембраностабилизирующим эффектами препарата.

При воспроизведении алиментарной гиперхолестеринемии параллельное введение УДХК уменьшало накопление холестерина в печени на 57,2% ($P < 0,001$) и триацилглицеринов - на 29,2% ($P < 0,02$), а также препятствовало снижению содержания ДНК в гомогенатах и ядрах гепатоцитов. Однако, выявлены более выраженные нарушения липидтранспортной системы (уменьшение ХС ЛПВП, ХС ЛПОНП и увеличение ХС ЛПНП) сыворотки крови подопытной группы животных. Обнаружен положительный эффект препарата УДХК на активность сывороточных АлАТ, ГГТ и ЩФ. Препарат УДХК нормализовал биосинтез ДНК, а также содержание белков и липидов в регенерирующей печени крыс в условиях алиментарной гиперхолестеринемии, обладал незначительным гипогликемическим эффектом. В условиях воспроизведения алиментарной гиперхолестеринемии у крыс инсулиноподобный эффект ЭСХ практически полностью утрачивался, за исключением стимуляции синтеза белкового компонента ЛПВП. Это указывает на то, что метаболические эффекты препарата ЭСХ, не обладающего цитотоксичностью, и заключающиеся в поддержании метаболизма экзогенными низкомолекулярными метаболитами и биорегуляторами, не могут обеспечить защиту метаболизма при моделировании относительно грубых нарушений обмена веществ.

Стимуляция репаративной регенерации печени через первичное микроальтерационное действие при применении препарата УДХК была доказана на модели ишемии печени. Предварительное введение препарата УДХК ускорило

течение регенераторных процессов после 20-минутной частичной ишемии левой и центральной долей печени, что доказано более быстрой нормализацией содержания нуклеиновых кислот в печени и параметров липидтранспортной системы к 10-м суткам, основных биохимических параметров сыворотки крови - к 4-м суткам реперфузионного периода. Увеличение содержания мочевой кислоты (в 1,4 раза, $P < 0,001$), уменьшение содержания альбумина (на 15,2%, $P < 0,05$) и общего белка (на 12,2%, $P < 0,001$) в сыворотке крови к концу ишемического периода у крыс, получавших УДХК, косвенно свидетельствует о включении восстановительных процессов в печени до ишемии. Репаративная регенерация печени после 60-минутной частичной ишемии печени характеризовалась смещением пика включения [^3H]тимидина в ДНК на 18 ч после ишемии у крыс, получавших препарат УДХК (контрольная группа – 24 ч), более выраженным увеличением содержания РНК в ранние сроки регенерации и нормализацией содержания ДНК к 4-м суткам реперфузионного периода. Предварительное введение препарата УДХК способствовало увеличению степени гипохолестеринемии после ишемии и в постишемическом периоде, более быстрой нормализации липидного спектра сыворотки крови и проявлению мембраностабилизирующего эффекта. Двадцатидневное введение препарата УДХК предотвращало уменьшение скорости биосинтеза ДНК в ишемизированных долях печени через 12 часов и увеличивало интенсивность биосинтеза ДНК в 1,46 раза через 24 часа и в 1,34 раза через 30 часов после 180-минутной частичной ишемии печени. Однако, в этих условиях препарат УДХК не оказал закономерного позитивного влияния на основные биохимические параметры сыворотки крови и усугублял нарушения липидтранспортной системы в ранний постишемический период. Предварительное введение препарата ТУДХК способствовало увеличению удельной радиоактивности ДНК ядер гепатоцитов ишемизированных долей печени после 180-минутной частичной ишемии в 1,21-1,36 раза на протяжении всего постишемического периода, но без смещения пика биосинтеза ДНК (рис. 9). В отличие от препарата УДХК, при 180-минутной частичной ишемии обнаружен выраженный мембраностабилизирующий и нормолипидемический эффекты препарата ТУДХК. Электронномикроскопическое исследование показало более значительные изменения ультраструктур гепатоцитов на 4-е сутки восстановления кровотока после 180-минутной ишемии на фоне применения препарата УДХК и признаки усиления функциональной напряженности клеточных структур. Предварительное введение препарата ТУДХК вызвало менее выраженные изменения ультраструктур клеток печени после 180-минутной ишемии по сравнению с контрольными животными. К 20-м суткам восстановления кровотока ультраструктура гепатоцитов большинства крыс, получавших ТУДХК, в основном соответствовала нормальной печени.

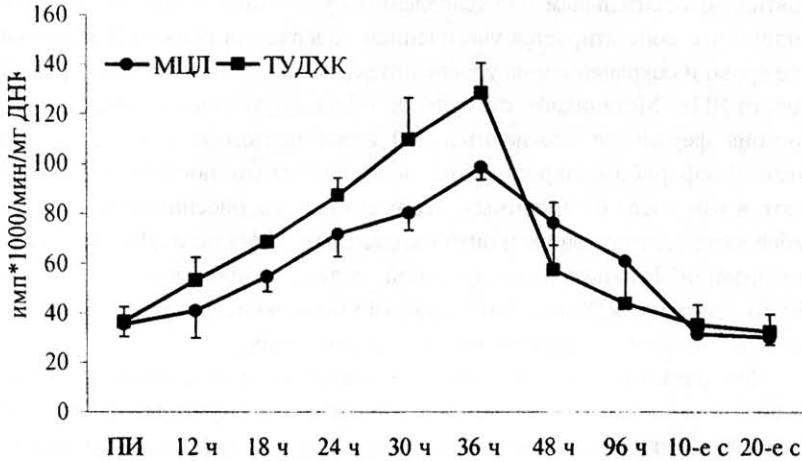


Рис. 9. Влияние ТУДХК на включение [^3H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов крыс после 180-минутной частичной ишемии. ПИ - после ишемии.

Позитивный эффект препарата УДХК на репаративную регенерацию печени выявлен при 30-минутной общей ишемии: увеличение включения [^3H]тимидина в ДНК ядер гепатоцитов через 24 и 48 часов после ишемии, нормализация содержания РНК, гипохолестеринемический в первые сутки и нормолипидемический эффекты к 10-м суткам реперфузии, ускорение нормализации антиоксидантной системы, структуры мембран и основных биохимических параметров сыворотки крови. Предварительное введение препарата ТУДХК способствовало ускорению нормализации содержания нуклеиновых кислот и скорости биосинтеза ДНК в печени крыс после 30-минутной общей ишемии. В реперфузионном периоде выявлены гомеостатические эффекты препарата ТУДХК на систему ПОЛ (уменьшение содержания ДК и МДА) в печени, активность ферментов и основные биохимические показатели сыворотки крови. Приведенные результаты доказывают, что включение процессов регенерации печени при введении препарата УДХК лежит в основе репаративной регенерации при нарушении печеночного кровотока. Препарат ТУДХК стимулирует процессы репаративной регенерации печени, возможно, путем ультрамикрoальтерационных механизмов, а также антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия.

В следующей серии экспериментов было оценено влияние гепатотропных препаратов на процессы регенерации печени в условиях стимуляции окислительного стресса при хронической алкогольной интоксикации и однократном внешнем γ -облучении. Применение ЭСХ при ХАИ у крыс привело к

уменьшению содержания нуклеиновых кислот в ткани печени, являющимся, вероятно, относительным и обусловленным усилением белоксинтезирующей функции, что констатируется увеличением содержания общего белка в сыворотке крови и сохранением на уровне интактных животных удельной радиоактивности ДНК. Механизмом стимуляции обмена нуклеиновых кислот являлась активация ферментов неокислительной ветви пентозофосфатного пути для синтеза фосфорибозилпирофосфата, дополнительным поступлением аминокислот, в том числе незаменимых, необходимых для биосинтеза нуклеотидов, мембраностабилизирующим и антиоксидантным эффектами. Доказательством нормализации функции поджелудочной железы и проявления инсулиноподобного действия ЭСХ при ХАИ является уменьшение активности амилазы и снижение глюкозы в сыворотке крови этих животных.

При развитии транзиторной радиационно-индуцированной ДЛП, обусловленной воздействием однократного внешнего γ -облучения, препарат ЭСХ в дозе 200 мг/кг обладал гипохолестеринемическим эффектом при дозе 0,25 Гр, выраженным нормолипидемическим действием при сублетальной дозе облучения (5,0 Гр), который обуславливался нормализацией содержания липидов в печени, обеспечивал нормализацию содержания нуклеиновых кислот в печени и активность маркерных ферментов в сыворотке крови. Инсулиноподобный эффект ЭСХ у облученных животных практически не проявлялся, за исключением увеличения синтеза апопротеинов в печени облученных крыс. Введение препарата ЭСХ интактным животным в дозе 100 мг/кг характеризовалось уменьшением содержания холестерина атерогенных классов липопротеинов и тенденцией к увеличению ХС ЛПВП, что определяет гепатопротекторные эффекты препарата. Аналогичные изменения обнаружены в сыворотке крови облученных крыс в периоде развития (10-17 сутки) и регрессии (17-23 сутки) радиационно-индуцированных ДЛП. В используемой дозе препарат ЭСХ сохранял инсулиноподобные свойства, которые характеризовались ускорением регенераторных процессов в печени, нормализацией содержания нуклеиновых кислот, увеличением биосинтеза белков, гипогликемическим и мембраностабилизирующим эффектами.

Препарат УДХК в дозе 200 мг/кг обладал нормохолестеринемическим действием при малой дозе внешнего γ -облучения (0,25 Гр). При сублетальной дозе облучения 5,0 Гр препарат усугублял нарушения липидтранспортной системы, что подтверждает наличие цитотоксического эффекта. Препарат УДХК препятствовал накоплению липидов в печени облученных крыс, нормализовал содержание нуклеиновых кислот, обладал положительным мембранотропным действием и не оказывал негативного влияния на содержание глюкозы, мочевины и билирубина в сыворотке крови. При интрагастральном введении препарата УДХК интактным животным в дозах 50 и 100 мг/кг не выявлено при-

знаков цитотоксического эффекта. В периоде развития и регрессии радиационно-индуцированной ДЛП при сублетальной дозе облучения обнаружена нормализация некоторых параметров липидтранспортной системы при применении препарата УДХК в дозе 50 мг/кг. У интактных животных отмечено увеличение содержания альбумина и общего белка в сыворотке крови.

Применение препарата УДХК в малой дозе (5мг/кг) не влияло на содержание нуклеиновых кислот и течение регенераторных процессов в митотическую и гипертрофическую фазы регенерации печени после 70% ЧГЭ у интактных животных, а также при введении облученным крысам. Однако в сыворотке крови облученных крыс отмечен гипохолестеринемический эффект, обусловленный уменьшением содержания атерогенных липопротеинов. 7-кратное применение препарата УДХК после ЧГЭ у интактных крыс не оказало влияния на течение регенераторных процессов в печени, что доказывается параметрами содержания нуклеиновых кислот в печени, основных биохимических параметров и липидного спектра в сыворотке крови. Позитивный эффект препарата УДХК (5 мг/кг) на содержание соотношение основных классов липопротеинов в некоторых экспериментальных группах может быть обусловлен выявленным антиоксидантным и мембраностабилизирующим эффектами.

Применение препарата ТУДХК в дозе 50 мг/кг в периоде развития ДЛП способствовало нормализации содержания нуклеиновых кислот в печени облученных животных и снижению содержания холестерина за счет атерогенных фракций в сыворотке крови при обеих дозах облучения. Введение препарата на 17-23 сутки после облучения обеспечило гипохолестеринемический эффект у крыс, облученных в дозе 0,25 Гр, но за счет ХС ЛПВП, при дозе 5,0 Гр – за счет ХС ЛПНП. У интактных крыс и облученных в обеих дозах отмечены стимуляция белоксинтезирующей функции гепатоцитов, проявляющаяся в увеличении содержания общего белка и альбумина в сыворотке крови, гипогликемический и гипоферментемический эффекты.

В результате применение препарата ТУДХК в дозе 5 мг/кг у интактных животных отмечены признаки биостимулирующего эффекта, который выражался в увеличении содержания РНК в гомогенатах и уменьшении в ядрах гепатоцитов. При репаративной регенерации печени после ЧГЭ предварительное введение препарата ТУДХК способствовало ускорению регенераторных процессов, что подтверждалось снижением включения [³H]тимидина в ДНК по сравнению с крысами, получавшими МЦЛ, через 24 часа после гепатэктомии и нормализацией к этому сроку содержания нуклеиновых кислот и уровня мочевого кислоты в сыворотке крови до значений интактных животных. Не исключено, что вероятной причиной этого эффекта является сдвиг включения меченого тимидина по времени из-за более синхронного вступления гепатоцитов в деление. У облученных крыс в дозах 0,25 Гр и 5,0 Гр не выявлено зако-

номерных изменений в содержании нуклеиновых кислот. При малой дозе облучения введение препарата ТУДХК в периоде развития радиационно-индуцированной ДЛП снижало уровень общего холестерина в 1,83 раза ($P < 0,001$) и ХС ЛПНП в 4,6 раза ($P < 0,001$); при сублетальной дозе облучения (5,0 Гр) отмечалась практически полная нормализация содержания основных классов липопротеинов и увеличение по сравнению с контролем содержания ХС ЛПВП в 1,24 раза ($P < 0,01$). При регенерации печени после 70% ЧГЭ у облученных крыс введение препарата ТУДХК способствовало частичной нормализации содержания нуклеиновых кислот в печени и следующим позитивным изменениям в холестеринном спектре сыворотки крови: уменьшение ХС ЛПОНП на 48,8% ($P < 0,01$) при введении интактным животным и увеличение уровня ХС ЛПВП на 63,4% ($P < 0,01$) у крыс, облученных в дозе 0,25 Гр. Во всех экспериментальных группах обнаружен антиоксидантный эффект препарата ТУДХК, который проявился уменьшением содержания продуктов ПОЛ в печени и увеличением общей антиоксидантной активности. Изучение биохимических параметров сыворотки крови крыс, получавших препарат ТУДХК показало, что препарат обладал гипогликемическим и гиперурикемическим эффектами, что возможно, является отражением стимуляции препаратом азотистого обмена и обмена нуклеиновых кислот. Это подтверждалось увеличением содержания мочевины в сыворотке крови подопытных крыс в гипертрофическую фазу регенерации. Наиболее общим в действии препарата ТУДХК в процессе регенерации являлось увеличение содержания мочевой кислоты, вносящей существенный вклад в систему антиоксидантной системы организма. Нормализация обмена нуклеиновых кислот может быть обусловлена мембраностабилизирующим эффектом препарата, о чем свидетельствуют показатели активности ферментов в сыворотке крови.

Таким образом, проведенные исследования показали, что все три исследуемых препарата обладают гепатопротекторными свойствами, но реализующихся через различные механизмы. Препарат УДХК вызывает микроальтерирующее действие на клеточном уровне, препарат ТУДХК – на внутриклеточном уровне, что приводит к активации физиологической и репаративной регенерации печени. Препарат ЭСХ не обладает цитотоксичностью в рекомендуемом диапазоне доз и его гепатопротекторный эффект обусловлен дополнительной доставкой аминокислот и низкомолекулярных веществ, оптимизирующих метаболический пул клетки. Препарат ТУДХК занимает промежуточное положение по проявлениям цитотоксичности и гепатотропным эффектам. Его применение при экспериментальной и клинической патологии, по всей видимости предпочтительно.

Для оценки выявленных инсулиноподобного и гепатопротекторного эффектов ЭСХ была проведена клинико-лабораторная оценка эффективности

препаратов ЭСХ у пациентов с нарушением метаболизма различного генеза. У лиц с возрастными изменениями обмена веществ препараты солянки холмовой (чай из сухой травы, лохейн и экстракол) оказывали нормализующее влияние на содержание ХС ЛПВП, индекс атерогенности, билирубина, активность маркерных ферментов сыворотки крови и уменьшал уровень глюкозы, что свидетельствует о гепатопротекторном, мембраностабилизирующем и гипогликемическом эффектах. Предложен энтеральный путь выведения пациентов из абстинентного синдрома сочетанным применением 3% спиртового раствора ЭСХ в сочетании с энтеросорбентом, который обладает аналогичной эффективностью с общепринятой дезинтоксикационной терапией. Использование сиропа ЭСХ у лиц с признаками хронической стресс-реакции способствовало уменьшению концентрации ХС ЛПНП, уровня билирубина и глюкозы, что характеризует гепатотропное и инсулиноподобный эффекты препарата ЭСХ. У пациентов с признаками метаболического синдрома Х препарат ЭСХ (аскохол) вызвал снижение индекса массы тела (ИМТ), уровня лептина, проинсулина и глюкозы в крови за счет инсулиноподобного действия (табл. 2).

Таблица 2. Влияние аскохола на индекс массы тела, содержание лептина и проинсулина в сыворотке крови

Показатель	До применения	После применения
ИМТ	36,2±6,24	33,3±2,15 [†]
Лептин (нг/мл)	13,67±0,71	11,26±0,61 ^{†††}
Проинсулин (пмоль/л)	13,06±1,74	9,67±1,59 ^{†††}
Глюкоза, ммоль/л	6,57±1,71	5,65±0,62 ^{††}

Примечание: [†] - достоверное различие по сравнению с группой «до применения». [†] - P<0,05, ^{†††} - P<0,001.

Выявлено повышение содержания мочевины, уменьшение уровня билирубина и нормализация активности ферментов сыворотки крови этих пациентов как проявление гепатотропного и мембраностабилизирующего действия препарата. Проведенные результаты свидетельствуют о возможности использования выявленных эффектов ЭСХ в клинике для профилактики и коррекции нарушений обмена веществ при развитии различных патологических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основании анализа молекулярно-структурных механизмов повреждения и восстановления печени предложен и экспериментально обоснован новый классификационный признак гепатотропных препаратов, а именно, наличие или отсутствие цитотоксичности в терапевтическом диапазоне доз: 1) препараты, обладающие цитотоксичностью на клеточном уровне, действуют посредством стимуляции процессов репаративной регенерации (например,

УДХК); 2) препараты, обладающие микроальтерационными эффектами на уровне субклеточных мембранных структур, стимулируют процессы физиологической регенерации и повышают адаптивные свойства гепатоцитов (например, ТУДХК); 3) препараты, не обладающие цитотоксичностью, воздействуют на обмен веществ посредством изменения метаболических потоков и их регуляции (например, ЭСХ) [1, 6, 8, 9, 15, 19, 29, 32].

2. Предложен трехэтапный метод оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов путем определения прямого цитотоксического эффекта на культурах клеток со сниженной способностью метаболизировать эти препараты, опосредованных цитотоксических эффектов через продукцию цитокинов макрофагами и выявления особенностей действия посредством механизмов апоптоза и/или некроза в изолированных гепатоцитах. Проведенные испытания на 6 гепатотропных препаратах (УДХК, флакозид, ТУДХК, танафлон, полиненасыщенный фосфатидилхолин, экстракт солянки холмовой) позволили рекомендовать включение данного метода в Правила GLP (доклинические испытания) [1, 8, 23, 24, 27, 32, 33, 41, 60, 62].

3. Препарат УДХК в дозах, превышающих 100 мкг/мл, оказывает цитотоксическое действие на клетки с редуцированным эндоплазматическим ретикуломом (L929, L41), в основе которого лежит прямое действие на метаболизм, проявляющееся в снижении биосинтеза ДНК и белка и уменьшении числа клеток в монослое. Препарат ТУДХК оказывает аналогичный эффект в дозах, превышающих 400 мкг/мл. Препарат ЭСХ в дозах до 1000 мкг/мл не проявляет прямой цитотоксичности, а в дозах 50-200 мкг/мл активирует биосинтез белка. Все исследуемые препараты не стимулируют секрецию фактора некроза опухоли перитонеальными макрофагами [1, 7, 9, 11, 13, 32, 45, 46, 49-52, 58].

4. Препарат УДХК проявляет цитотоксическое действие на изолированные гепатоциты, характеризующееся ингибированием биосинтеза белка (>100 мкг/мл), потенцирует негативный эффект гидрофобных желчных кислот (> 50 мкг/мл), обладает антиапоптозогенным действием. Препарат ЭСХ в дозах 50-200 мкг/мл стимулирует биосинтез белка, ДНК и обладает антинекрозогенным эффектом. Препарат ТУДХК не оказывает цитотоксического действия на изолированные гепатоциты, препятствует развитию вызываемых ГХДХК повреждений гепатоцитов (> 50 мкг/мл), антинекрозогенным и антиапоптозогенным эффектами (> 50 мкг/мл). Препарат ЭСХ стимулирует синтез липидов в жировых эпидидимальных клетках. Исследуемые препараты (50-1000 мкг/мл) по степени цитотоксичности в экспериментах *in vitro* классифицируются на три типа: обладающий цитотоксичностью в дозах больше 100 мкг/мл препарат УДХК, не обладающий цитотоксичностью препарат ТУДХК, не обладающий цитотоксичностью, стимулирующий пролиферацию клеток и био-

синтетические процессы и оказывающий инсулиноподобное действие препарат ЭСХ [1, 7, 9, 20, 26, 30-33, 48, 49, 61].

5. Препарат УДХК при двадцатидневном введении по 200 мг/кг вызывает морфологически регистрируемое микроповреждение ткани печени в виде единичных микронекрозов, что стимулирует включение восстановительных процессов через увеличение митотической активности гепатоцитов. Препарат ТУДХК при интрагастральном введении на протяжении 20 дней по 200 мг/кг вызывает повреждение внутриклеточных мембранных структур, регистрируемое электронной микроскопией, что стимулирует процессы внутриклеточной регенерации и повышение функциональной активности гепатоцитов. Аналогичное введение препарата ЭСХ оптимизирует синтез белков и оказывает системное инсулиноподобное действие (гипогликемия, накопление триацилглицеринов в печени, увеличение синтеза экспортных белков в печени) [1, 13, 15, 17, 19, 26, 32, 55].

6. Препарат УДХК стимулирует репаративную регенерацию печени в митотическую фазу после ЧГЭ за счет смещения пика синтеза ДНК на 3-6 часов (синхронизация вступления клеток в митоз) и ускоряет функциональное восстановление гепатоцитов в гипертрофическую фазу регенерации печени. Репаративная регенерация печени после введения препарата ЭСХ (усиление биосинтеза ДНК в печени в течение 36 часов после ЧГЭ на фоне гипогликемии) характеризуется признаками инсулиноподобного и мембраностабилизирующего эффектов. Сделано заключение, что первичное микроальтерационное действие препарата УДХК, обладающего цитотоксичностью, необходимо для активации репаративной регенерации печени. Ускорение репаративной регенерации печени под действием препарата ЭСХ, не обладающего цитотоксичностью, обеспечивается изменением метаболического гомеостаза клетки за счет дополнительной доставки низкомолекулярных субстратов и проявления инсулиноподобного эффекта [1-3, 9, 13, 15, 17, 19, 28, 32, 35, 36, 55].

7. При алиментарной гиперхолестеринемии препарат УДХК проявляет положительную фармакодинамику по отношению к содержанию липидов и нуклеиновых кислот в печени, активности маркерных ферментов в сыворотке крови, однако, усугубляет нарушения липидтранспортной системы. Препарат УДХК препятствует снижению скорости биосинтеза ДНК в митотическую фазу регенерации в условиях алиментарной гиперхолестеринемии и вызывает более быструю нормализацию содержания липидов и нуклеиновых кислот в регенерирующей печени крыс. В условиях алиментарной гиперхолестеринемии инсулиноподобный эффект препарата ЭСХ практически полностью утрачивается. Обосновано положение, что препарат ЭСХ, не обладающий цитотоксичностью, не оказывает протективного действия при относительно грубых нарушениях метаболизма [11, 17, 19, 25, 32, 56].

8. Препарат УДХК ускоряет течение регенераторных процессов в печени после 20, 60-минутной частичной и 30-минутной полной ишемии печени, что доказывается более быстрым восстановлением обмена нуклеиновых кислот, антиоксидантной защиты и основных параметров липидтранспортной системы, однако не влияет на восстановление функционального состояния гепатоцитов при 180-минутной ишемии. При 180-минутной частичной ишемии препарат ТУДХК стимулирует восстановление структуры печени и увеличивает удельную радиоактивность ДНК ядер гепатоцитов ишемизированных долей печени на протяжении всего постишемического периода, но без смещения пика биосинтеза ДНК. На основании структурно-молекулярных исследований доказана более высокая эффективность препарата ТУДХК [13, 18, 19, 32, 34, 57].

9. Препарат ЭСХ частично предотвращает нарушение биосинтеза ДНК при хронической алкогольной интоксикации, активируя ферменты пентозофосфатного пути, а при радиационно-индуцированных ДЛП оказывает положительное действие на липидтранспортную систему, сохраняя инсулиноподобные эффекты. Препарат УДХК в дозе 200 мг/кг обладает нормохолестеринемическим эффектом при малой дозе облучения (0,25 Гр), усугубляет нарушения липидтранспортной системы при сублетальной дозе облучения (5,0 Гр), нормализует содержание нуклеиновых кислот и липидов в печени; при меньших дозах препарат УДХК не проявляет цитотоксического действия, не влияет на течение регенерации печени у облученных крыс и обладает антиоксидантным эффектом. Препарат ТУДХК, начиная с дозы 5 мг/кг, оказывает стимулирующее влияние на обмен нуклеиновых кислот в печени интактных крыс и при репаративной регенерации печени у необлученных животных; в процессе репаративной регенерации печени на фоне облучения способствует частичной нормализации содержания нуклеиновых кислот в печени, липидов в сыворотке крови, активирует систему антиоксидантной защиты. Применение препарата ТУДХК в дозах 50 мг/кг в период развития радиационно-индуцированной ДЛП способствует нормализации обмена нуклеиновых кислот в печени и холестерина в сыворотке крови [1, 3-5, 13, 14, 19, 21, 26, 28, 32, 37-40, 42-44, 47, 49-51].

10. На основе химического состава, включая спектр аминокислот, препаратов солянки холмовой обоснованы и апробированы методики их применения для профилактики и коррекции нарушений метаболизма при возрастных нарушениях обмена веществ, признаках метаболического синдрома X, абстинентном синдроме и нарушениях липидтранспортной системы крови. Экспериментально обосновано, что наиболее оптимальным препаратом для коррекции нарушений метаболизма и управления восстановительными процессами в печени может быть препарат тауроурсодезоксихолевая кислота [1, 6, 9-12, 16, 22, 29, 32, 53, 59, 63, 64].

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

МОНОГРАФИЯ

1. Данченко Е.О., Чиркин А.А. Метаболические эффекты солянки холмовой. М.: «Медицинская наука», 2001. – 126 с.

СТАТЬИ

2. Каянвалова Н.Ю., Данчанка Е.О., Чыркіна І.А., Чыркін А.А. Эстэрыфікацыя халестэрыну у крывяносным русле пры рэгенератарнай гіпертрафіі печані у пацукоу // Весці АН БССР, сер. біял. навук, 1989, № 4. - С. 86-90.
3. Данченко Е.О., Осочук С.С. Действие биофлавоноидов на обмен нуклеиновых кислот в регенерирующей печени крыс при активации процессов свободно-радикального окисления // Влияние загрязнения радионуклидами окружающей среды на здоровье населения: Сб. ст. - Витебск, 1993. - С.31-37.
4. Особенности физиологической регенерации печени у облученных крыс / Чиркина И.А., Ольшанникова В.В., Осочук С.С., Данченко Е.О. // Влияние загрязнения радионуклидами окружающей среды на здоровье населения: Сб. ст. - Витебск, 1993. – С. 65-69.
5. Данченко Е.О., Осочук С.С. Пролиферация клеток, обмен нуклеиновых кислот и концепция радиационно-индуцированного атеросклероза // Радиационно-индуцированные дислиппротеинемии и атеросклероз: Матер. Респ. пленума и семинара специалистов клинической лабораторной диагностики. – Минск, 1995. – С. 48-59.
6. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Шейбак В.М. Аминокислотный состав препаратов солянки холмовой и их применение для коррекции возрастных изменений метаболизма // Вестник фармации. - 1998. - № 4. - С. 24-30.
7. Chirkin A.A., Danchenko E.O., Dargel R. Apoptosis, necrosis and hepatotropic preparations // Medical Science. - 1999. - Vol.5, Suppl. 1. - P. 109-115.
8. Данченко Е.О. Лабораторные методы оценки апоптоза и некроза клеток // Медицинская панорама (лабораторная медицина). – 1999, № 3. – С. 18-19.
9. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Луняк Н.К. Метаболическая терапия препаратами солянки холмовой. М.: «Фитос», 1999, 46 с.
10. Марченко А.А., Данченко Е.О., Шваренок В.В. Применение сиропа с экстрактом солянки холмовой и аскохола для коррекции метаболизма в условиях промышленного санатория-профилактория // Клинико-лабораторные аспекты метаболической терапии: Сб. ст. респ. конф. - Витебск, 1999. - С. 133-137.

11. Данченко Е.О. Фармакодинамика экстракта солянки холмовой // Клинико-лабораторные аспекты метаболической терапии: Сб. ст. респ. конф. - Витебск, 1999. - С. 119-123.
12. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Демин Э.С. Комбинация энтеросорбента и гепатопротектора при лечении абстинентного синдрома // Качество и эффективность применяемых медицинских технологий: Сб. научн. тр. конф. - Витебск, 1999. - С. 185-187.
13. Данченко Е.О. Фармакодинамика урсодезоксихолевой кислоты // 40 лет фармацевтическому факультету: Сб. научн. тр. - Витебск, 1999. - С. 303-308.
14. Данченко Е.О. Действие гепатопротекторов на развитие радиационно-индуцированной дислиппротеинемии // Биологическая активность и транспорт лекарственных веществ: Сб. ст. - Гродно, 1999. - С. 47-53.
15. Роль микроальтерации в механизме фармакологической стимуляции регенерации печени / Чиркин А.А., Чиркина И.А., Данченко Е.О., Кравчук Р.И. // Биологическая активность и транспорт лекарственных веществ: Сб. ст. - Гродно, 1999. - С. 172-186.
16. Метаболическая терапия препаратами солянки холмовой / Чиркин А.А., Данченко Е.О., Доценко Э.А., Луняк Н.К. // Биологически-активные добавки к питанию и лекарственные препараты на натуральной основе в профилактике, лечении и реабилитации: Матер. научно-практич. конф. - Москва, 2000. - С. 214-217.
17. Данченко Е.О. Влияние экстракта солянки холмовой на регенерацию печени после частичной гепатэктомии // Биохимические аспекты жизнедеятельности биологических систем: Сб. научн. тр. - Гродно, 2000. - С. 87-91.
18. Данченко Е.О. Действие урсодезоксихолевой кислоты на регенераторные процессы в печени после ишемии // Биохимические аспекты жизнедеятельности биологических систем: Сб. научн. тр. - Гродно, 2000. - С. 91-95.
19. Данченко Е.О. Гипотеза молекулярных механизмов действия гепатотропных веществ // Биологически активные соединения в регуляции метаболического гомеостаза: Матер. междунар. науч. конф. - Гродно, 2000. - С. 130-135.
20. Данченко Е.О. Влияние препаратов желчных кислот на апоптоз и некроз гепатоцитов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - № 1. - С. 34-40.
21. Использование иммобилизованной на ваулене урсодезоксихолевой кислоты для коррекции радиационно-индуцированных нарушений метаболизма / Куликов В.А., Данченко Е.О., Морозова А.А., Гребенников И.Н., Бобр О.А., Лагутчев В.В., Ганкович Л.В., Гаврилович В.Н., Лицкевич Н.М., Чиркин А.А. // Биологически активные соединения в регуляции метаболиче-

- ского гомеостаза: Матер. междунар. науч. конф. - Гродно, 2000. - ч. I, С. 286-289.
22. Проинсулин, С-пептид, IGF-1 и лептин в сыворотке крови при ожирении / Данченко Е.О., Марченко А.А., Костин Г.М., Чиркин А.А. // Медицинская панорама (лабораторная медицина). – 2000. – № 2 (6). – С. 27-28.
 23. Данченко Е.О. Использование клеточных культур для оценки цитотоксического эффекта препаратов // Медицинская панорама (лабораторная медицина). – 2000. - № 2(6). – С. 20-23.
 24. Chirkin A.A., Danchenko E.O. Laboratory evaluation of cytotoxic effect of bile acid preparations and total ischemia of liver // *Biochemica Medica*. – 2000. – Vol. 10, № 1-2. – P. 89-90.
 25. Данченко Е.О. Влияние урсодезоксихолевой кислоты на регенерацию печени при алиментарной гиперхолестеринемии // Актуальные вопросы медицины и новые технологии медицинского образования: Сб. научн. тр. – Гомель: Из-во Мозырь: «Белый ветер», 2000. – т.1, С. 151-154.
 26. Данченко Е.О. Влияние экстракта солянки холмовой на белоксинтезирующую функцию гепатоцитов // Актуальные вопросы медицины и новые технологии медицинского образования: Сб. научн. тр. – Гомель: Из-во Мозырь: «Белый ветер», 2000. – т.1, С. 154-157.
 27. Danchenko E.O., Chirkin A.A. Methods of laboratory evaluation of a pharmacological preparation cytotoxic effect // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 1999. – Vol. 37, № 1. - S. 306.
 28. Данченко Е.О. Влияние экстракта солянки холмовой на репаративный синтез ДНК и активность ферментов углеводного обмена в печени крыс при хронической алкогольной интоксикации // Вестник фармации. – 2000. - № 3-4. – С. 25-29
 29. Влияние способа экстрагирования на спектр аминокислот сухого экстракта травы солянки холмовой / А.А.Чиркин, Е.О.Данченко, Е.М.Дорошенко, Н.К.Луняк // Вестник фармации. – 2000. - № 3-4. – С. 25-29.
 30. Данченко Е.О. Влияние препаратов желчных кислот на синтез и секрецию белков гепатоцитами // Патогенез, клиника, диагностика и фармакотерапия заболеваний человека: Тр. сотр. Витебского гос. мед. университета. – Витебск, 2000. – С. 20-23.
 31. E. Danchenko, H. Petermann, A. Chirkin, R. Dargel Effect of bile acids on the proliferative activity and apoptosis of rat hepatocytes // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2001 (in press).
 32. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Молекулярные механизмы действия гепатотропных веществ // Кремлевская медицина. – 2000. – № 4, прил. 1. – С.
 33. Данченко Е.О. Влияние препаратов желчных кислот на биосинтез ДНК, апоптоз и некроз гепатоцитов // *Вопр. мед. химии*. – 2001. – № 2

34. Данченко Е.О. Модуляция тауроурсодезоксихолевой кислотой пролиферации гепатоцитов ишемизированной печени крыс // *Вопр. мед. химии.* – 2001. – № 3

ABSTRACTS И ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

35. Hepatotropic growth factor isolated from pancreatic and liver cell stimulate rat liver regeneration / Abakumova O.Yu., Chirkin A.A., Kutsenko N.G., Podobed O.V., Osochuk S.S., Danchenko E.O., Chirkina I.A. // *J. Hepatol.* - 1994. - Vol. 21, Suppl.1. - S. 152.
36. Serum lipid transport system state and liver growth regulation / Chirkin A.A., Abakumova O.Yu., Konevalova N.Yu., Danchenko E.O. // *J. Hepatol.* – 1994. - Vol. 21, Suppl.1. - S. 153.
37. Liver regeneration in chronic alcoholic intoxication and application of hepatotropic pharmacologic preparations / Chirkina I.A., Danchenko E.O., Gundermann K.-J., Chirkin A.A // *Progress and prospects in liver diseases treatment: Abstracts of the 1-st Congress of Polish Hepatology Association.* - Szczecin, 1995. - P. 35.
38. The role of liver in the pathogenesis of radiation-ecological dyslipoproteinemias and hepatotropic pharmacotherapy / Chirkin A.A., Konevalova N.Yu., Voronov G.G., Saraev Yu.V., Osochuk S.S., Kulikov V.A., Grebennikov I.N., Danchenko E.O. // *Progress and prospects in liver disease treatment: Abstracts of the 1-st Congress of Polish Hepatology Association.* - Szczecin, 1995. - P.35.
39. Chirkin A.A., Danchenko E.O., Gundermann K.-J. Chronic alcoholic intoxication and liver regeneration // *Alcohol and Alcoholism.* - 1995. - Vol.30, № 4. - P. 515.
40. Liver regeneration in chronic alcoholic intoxication and application of hepatotropic pharmacological preparations / Chirkina I.A., Danchenko E.O., Konevalova N.Yu., Gundermann K.-J. // *X International Congress of Liver Diseases. Acute and Chronic Liver Diseases: Molecular Biology and Clinics.* – Basel, 1995. – P. 232.
41. Chirkin A.A., Danchenko E.O., Abakumova O.Yu. Evaluation of cytotoxicity of hepatotropic and hypolipidemic preparations by means of cell lines with reduced endoplasmatic reticulum // *X International Congress of Liver Disease. Acute and Chronic Liver Diseases: Molecular Biology and Clinics.* – Basel, 1995. - P. 259.
42. Laboratory morpho-biochemical characteristics of liver regeneration in chronic alcoholic intoxication / Chirkina I., Danchenko E.O., Gundermann K.-J., Chirkin A. // *Proceeding of the Laboratory Medicine' 95. 11th IFCC European Congress of Clinical Chemistry.* - Tampere, 1995. – P. 854.

43. Pharmacologic correction of radiation-ecological dyslipoproteinemias (DLP) / Chirkin A.A., Konevalova N., Voronov G., Saraev Yu., Osochuk S., Kulikov V., Grebennikov I., Danchenko E., Gundermann K.-J. // *Pharmacol. Res.* – 1995. - Vol. 31, Suppl. - P. 229.
44. Danchenko E.O., Chirkin A.A., Chirkina I.A. Liver nucleic acid metabolism in chronic alcoholic intoxication and usage of hepatotropic preparations // *Metabolism of alcohol and its clinical consequences to gastrointestinal and liver diseases. Therapy and prevention of alcohol abuse.* - Prague, 1996. - P. 40.
45. Effect of ursodeoxycholic acid on cell proliferation and nucleic acid metabolism / E.O.Danchenko, O.Yu.Abakumova, A.A.Chirkin, I.A.Chirkina, E.N.Nechaichik, H.-D. Tauschel // *Progress in liver disease diagnostics: Abstracts of the Polish association for the study of the liver.* - Szczecin, 1996. - P.36.
46. A.A.Chirkin, E.O.Danchenko, H.-D.Tauschel. *Salsola collina*: effect on nucleic acid metabolism and cell proliferation // *Progress in liver disease diagnostics: Abstracts of the Polish association for the study of the liver.* - Szczecin, 1996. - P.37.
47. Danchenko E.O., Abakumova O.Yu., Chirkin A.A. Cytotoxicity of hepatotropic preparations and hepatocytes proliferation in tetrachlormethane and ethanol intoxication // *Exp. Toxic. Pathol.* - 1996. - Vol. 48, № 5. - p. 342.
48. Determination of a insulin-like effect of extract *salsola collina* by means of epididymal lipocytes and regenerating hepatocytes / Danchenko E.O., Chirkin A.A., Kutsenko N.G., Abakumova O.Yu., Tauschel H.-D // *Exp. Toxic.Pathol.* - 1996. - Vol. 48, № 5. P. 342.
49. Действие экстракта *Salsola collina* на метаболизм и пролиферацию клеток *in vitro* и *in vivo* / Данченко Е.О., Чиркин А.А., Чиркина И.А., Гребенников И.Н., Таушел Х.Д. // II съезд гепатологов Белоруссии: Тез. докл. - Гродно, 1996. - С. 47.
50. Действие урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) на метаболизм нуклеиновых кислот и содержание липидов в регенерирующей печени / Чиркин А.А., Данченко Е.О., Нехайчик Е.Н., Чиркина И.А., Куликов В.А., Таушел Х.Д. // II съезд гепатологов Белоруссии: Тез. докл. - Гродно, 1996. - С.85.
51. Действие урсодезоксихолевой кислоты на пролиферацию клеток и метаболизм нуклеиновых кислот / Данченко Е.О., Абакумова О.Ю., Чиркин А.А., Таушел Х.-Д. // *Новые направления в гепатологии. Фальк-симпозиум № 92:* Тез. докл. Июнь 21-22, 1996. – С.-Петербург, Россия. – С. 323.
52. Chirkin A.A., Danchenko E.O., Abakumova O.Yu. Effects of the hepatotropic preparations on the DNA metabolism and proliferation of neurinoma cells *in vitro* // *Liver and nervous system: Abstract, Part III of the Liver Week Freiburg 1997, Falk Symposium № 103, Freiburg, 1997.* - P.11.

53. Enteral way of treatment of acute alcoholic intoxication: a combination of enterosorbent and hepatoprotector / Danchenko E.O., Demin E.S., Lunyak N.K., Chirkin A.A. // Alcohol and Alcoholism. - 1997. - Vol.32, № 3. - P.414.
54. Chirkina I.A., Danchenko E.O. Correlation between cytotoxic and hepatoprotective effects of drugs in chronic alcoholic intoxication // Alcohol and Alcoholism. - 1997. - Vol.32, № 3. - P.413.
55. Данченко Е.О. Цитотоксичность гепатотропных препаратов и восстановительные процессы в печени // Биохимические механизмы эндогенной интоксикации: Тез. докл. 2-го белорусско-российского симпозиума. - Гродно, 1997. - С.67.
56. Применение урсодезоксихолевой кислоты при алиментарной гиперхолестеринемии у крыс / Чиркин А.А., Гребенников И.Н., Данченко Е.О., Коневалова Н.Ю., Куликов В.А., Осочук С.С., Сараев Ю.В., Филипенко Г.В. // Проблемы современной медицины и фармации: Тез. докл. - Витебск, 1998. - Ч.1. - С. 26.
57. Чиркина И.А., Данченко Е.О., Кравчук Р.И. Действие урсодезоксихолевой и тауроурсодезоксихолевой кислот на структурные изменения гепатоцитов при ишемии печени // Актуальные вопросы гепатологии: Тез. докл. 3-го Бел. симпозиума гепатологов. - Гродно, 1998. - С. 53.
58. Данченко Е.О. Гепатотропные препараты и метаболизм нервной ткани // Актуальные вопросы гепатологии: Тез. докл. 3-го Бел. симпозиума гепатологов, Гродно, 1998. - С. 27.
59. A combination of enterosorbent and hepatoprotector as an enteral way of treating of acute alcoholic intoxication / Danchenko E.O., Chirkin A.A., Demin E.S., Efimov V.V., Lunjak N.K. // East-West Symposium on Biomedical Research of Alcoholic-related Disease. - Grodno, 1998. - P.10.
60. Данченко Е.О. Биохимические методы оценки апоптоза и их использование при изучении фармакодинамики препаратов желчных кислот / Медицинская наука и ее связь с практическим здравоохранением: Тез. докл. респ. научно-практич. конференции. - Витебск, 1998. - С. 37.
61. Данченко Е.О. Метод оценки влияния гепатотропных препаратов на липогенез in vitro // Клинико-лабораторные аспекты липидологии: Матер. 1-ой Респ. конфер. Витебск, 1998. - С. 3.
62. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Абакумова О.Ю. Метод лабораторной оценки цитотоксичности фармакологических препаратов // Паллиативная медицина и реабилитация. - 1998, № 2-3. - С. 25.
63. Клинико-экспериментальный опыт сочетанного применения энтеросорбента и гепатопротектора для стабилизации гепатобилиарной системы / Луняк Н.К., Чиркин А.А., Данченко Е.О., Луняк Ю.С. // Проблемы проти-

волучевой защиты: Матер. Всероссийской конф. с междунар. участием. - Москва, 1998. - С. 135.

64. Chirkin A.A., Danchenko E.O., Demin E.S. Enteral way of treating of acute alcoholic intoxication // Alcohol and Alcoholism. – 1999. – Vol. 34, № 3, (137). - P. 455.
65. Данченко Е.О. Методология изучения действия желчных кислот с различными физико-химическими свойствами на апоптоз и некроз гепатоцитов // Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем: Тез. докл. IV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. - Минск, 2000. - С. 302.

ИНСТРУКЦИИ НА МЕТОД

1. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Исследование цитотоксичности гепатотропных препаратов с использованием клеточных культур: Инструкция на метод № 160-00-11. Утверждена МЗ Республики Беларусь 08.02.2001 г. / Витебский гос. мед. ун-т. - 12 с.
2. Данченко Е.О. Изучение влияния гепатотропных препаратов на липогенез in vitro: Инструкция на метод № 161-00-11. Утверждена МЗ Республики Беларусь 08.02.2001 г. / Витебский гос. мед. ун-т. - 5 с.



Данчанка Алена Алегаўна

ЦЫТАТАКСІЧНАСЦЬ ГЕПАТАТРОПНЫХ ПРЭПАРАТАУ І АДНАУЛЕНЧЫЯ ПРАЦЭСЫ У ПЕЧАЊІ

Ключавыя словы: печань, цытатаксічнасць, культуры клетак, гепатапра-тэктары, апаптоз, некроз, рэгенерация.

Аб'екты даследавання: печань, сываратка крыві, культуры клетак.

Мэта работы: распрацоўка новай канцэпцыі кіравання аднаўленчымі пра-цэсамі ў печані, заснаванай на малекулярна-структурных механізмах цы-тытаксічнасці гепататропных прэпаратаў.

Метады даследавання: біяхімічныя, марфалагічныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: створана новая класіфікацыя гепата-тропных прэпаратаў па ступені іх цытатаксічнасці. Упершыню прапанаваны трохэтапны метад ацэнкі гепататаксічнасці гепататропных прэпаратаў з выкарыстаннем клетачных культур на этапе даклінічных даследаванняў лекавых прэпаратаў. Упершыню устаноўлена, што гепататропныя прэпара-ты, якія валодаюць пэўнай ступенню цытатаксічнасці ў тэрапеўтычным дыяпазоне доз, вызываюць падзінкавыя пашкоджанні гепатацытаў, што стымулюе мітатычнае дзеленне клетак і забяспечвае аптымальнае праця-канне рэпаратывнай рэгенерцыі печані; гепататропныя прэпараты, якія не валодаюць цытатаксічнасцю, могуць праяўляць апасродкаванае гепатапра-тэктарнае дзеянне праз інсулінападобныя эфекты шляхам аптымізацыі ме-табалізму ў клетцы. Цытатаксічныя ўласцівасці прэпаратаў звязаны з ха-рактарам іх гепатапратэктарнага дзеяння; прэпарат урсадэзоксіхолевай кіслаты, які аказвае цытатаксічнае дзеянне на клетачным узроўні, можа па-вялічыць паталогію печані пры цяжкіх і спалучальных паражэннях органа; экстракт салянкі халмавой, які не праяўляе цытатаксічнасці, губляе станоўчыя фармакадынамічныя эфекты пры цяжкіх і спалучальных паражэннях печані. Абаснаван аптымальны гепататропны прэпарат – таўраурсадэзоксіхолева кіслата, якая прадухіляе гібель гепатацытаў па механізмах некроза і апаптоза і стымулюе працэсы унутрыклетачнай рэге-нерцыі.

Рэкамендацыі па выкарыстанню: атрыманыя вынікі патрэбна выкары-стоўваць пры вызначэнні абгрунтаванай тэрапіі гепатапратэктарамі за-хворванняў печані ў залежнасці ад этыялагічнага фактара і структура-функцыянальнага стану гепатацытаў.

Вобласць выкарыстання: біяхімія, гепаталогія, радыяцыйная медыцына, эндакрыналогія, наркалогія, тэрапія

Данченко Елена Олеговна

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ГЕПАТОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ

Ключевые слова: печень, цитотоксичность, культуры клеток, гепатопротекторы, апоптоз, некроз, регенерация.

Объект исследования: печень, сыворотка крови, культуры клеток.

Цель работы: разработка новой концепции управления восстановительными процессами в печени, основанной на молекулярно-структурных механизмах цитотоксичности гепатотропных препаратов.

Методы исследования: биохимические, морфологические, статистические

Полученные результаты и их новизна: создана новая классификация гепатотропных препаратов по степени их цитотоксичности. Впервые предложен трехэтапный метод оценки цитотоксичности гепатотропных препаратов с использованием клеточных культур на этапе доклинических испытаний лекарственных препаратов. Впервые установлено, что гепатотропные препараты, обладающие определенной степенью цитотоксичности в терапевтическом диапазоне доз, вызывают единичные микроповреждения гепатоцитов, что стимулирует митотическое деление клеток и обеспечивает оптимальное протекание репаративной регенерации печени; гепатотропные препараты, не обладающие цитотоксичностью, могут проявлять опосредованное гепатопротекторное действие через инсулиноподобные эффекты путем оптимизации метаболизма в клетке. Цитотоксические свойства препаратов связаны с характером их гепатопротекторного действия: препарат урсодезоксихолевой кислоты, оказывающий цитотоксическое действие на клеточном уровне, способен усугублять патологию печени при тяжелых и сочетанных поражениях органа; экстракт солянки холмовой, не проявляющий цитотоксичности, утрачивает положительные фармакодинамические эффекты при тяжелых и сочетанных поражениях печени. Обоснован оптимальный гепатотропный препарат – тауроурсодезоксихолевая кислота, которая предотвращает гибель гепатоцитов по механизмам некроза и апоптоза и стимулирует процессы внутриклеточной регенерации.

Рекомендации по использованию: полученные результаты следует использовать при определении обоснованной терапии гепатопротекторами заболевавшей печени в зависимости от этиологического фактора и структурно-функционального состояния гепатоцитов.

Область применения: биохимия, гепатология, радиационная медицина, эндокринология, наркология, терапия.

SUMMARY

Danchenko Elena Olegovna

CYTOTOXICITY OF HEPATOTROPIC PREPARATIONS AND RESTORATION PROCESSES IN THE LIVER

Key words: liver, cytotoxicity, cell cultures, hepatoprotectors, apoptosis, necrosis, regeneration.

Object of investigation: liver, blood serum, cell cultures.

Aims: development of a new concept of regulation of the restoration processes in the liver based on the molecular-structural mechanisms of hepatotropic preparation cytotoxicity.

Methods: biochemical, morphological, statistical

The obtained results and their novelty: a new classification of hepatotropic preparations according to the degree of their cytotoxicity is created. For the first time a three-step method of estimating hepatotropic preparations cytotoxicity with the use of cell cultures at the stage of preclinical tests of medicinal preparations is offered. For the first time it is established that hepatotropic preparations having a certain degree of cytotoxicity in therapeutic range of doses cause individual microdamages of hepatocytes, which stimulates the mitotic division of cells and provides the optimum course of the liver reparative regeneration; hepatotropic preparations having no cytotoxicity can show indirect hepatoprotective action through insulin-like effects due to optimization of metabolism in the cell. The cytotoxicity properties of preparations are related to the character of their hepatoprotective action: the ursodeoxycholic acid rendering cytotoxic action at the cell level, is capable to aggravate a pathology of liver in heavy and combinative damages of liver; the extract of *salsola collina*, not showing cytotoxicity, loses positive pharmacological effects in heavy and combinative damage of liver. The optimum of hepatotropic preparation – tauroursodeoxycholic acid – is proved, which prevents destruction due to mechanisms of necrosis and apoptosis and stimulates the processes of intracellular regeneration.

Recommendations for usage: the results received should be used in choosing the appropriate therapy with hepatoprotectors in case of liver diseases depending on etiological factor and structural-functional condition of hepatocytes.

Field of application: biochemistry, hepatology, radiation medicine, endocrinology, narcology, therapy.



Подписано в печать 27.02.2001. Формат 60x84 1/16.
Бумага типографская №2. Компьютерный набор. Усл. печ. листов 2,76.
Заказ № 287. Тираж 100 экз.

Издательство Витебского государственного медицинского университета.
210602, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. Лицензия ЛВ № 91 от 22.12.97 г.

Отпечатано на ризографе в Витебском государственном
медицинском университете.
210602, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. Лицензия ЛП № 326 от 05.01.99 г.

L AG 49990



8000000229 1447