

УДК:616-053.2-036.2

ОЦЕНКА АНТИФИБРОЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Ахунджанова Л.Л., Арипов А.Н., Набиев А.У., Хамроев Т.Т.
Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр педиатрии

ХУЛОСА

Тадқиқот мақсади: сурункали экспериментал гепатитда жисгар фиброзининг ҳолатини ўрганиши, сурункали жисгар касалликларида фиброгенезнинг асосий механизмларини аниқлаш ва экспериментал гепатитда фармацевтик таркибнинг антифибротик фаоллигини баҳолаш.

Материаллар ва тадқиқот усуллари. Тадқиқот объекти сифатида 100 ± 10 г тана оғирлиги бўлган 110 та оқ каламушлардан фойдаланилди, жисгар фиброзини қўзғатиш учун схема бўйича гелиотрин юқори захарли дозаларда юборилди. Жисгар фиброзининг дастлабки босқичида антифибротик фаоллик ўрғанилган композиция гепалипин ва полифеноллар синфи - проантацианидиндан иборат. *Alhagi pseudalhagi* ўсимлигидан олинган проантоцианидинлар (шартли янтацин). Гепалипин 100 мг га нисбатда: 84,4 мг - Липоид 80,06 мг - ликопен, 5 мг - экдистен, 10 мг - глицирризин кислотадан иборат.

Натижалар. Тадқиқот натижасидан олинган маълумотларни умумлаштирган ҳолда: сурункали гепатит шароитида фиброгенезни асосий механизми бўлган оқсил ҳосил қилувчи, липид жисгар функциясининг бузилиши белгилари мавжуд деган хулосага келдик, жисгар тўқимаси, яъни жисгардаги репаратив регенерация жараёнларини секинлаштирганини ва натижада оғир жисгар циррози эҳтимолига олиб келувчи омилларни ўрганиб чиқдик. Толали тўқималарнинг ривожланишига йўл қўймаслик учун биз гепатопротектор хусусиятларга эга бўлган жисгардаги метаболит жараёнларни яхшилайдиган, патогенларга қаршиликни оширадиган ва турли касалликларда уларнинг фаолиятини тиклашга ёрдам берадиган биологик композицияси таъсирини ўрганиб чиқдик. Улар организмдаги метаболит жараёнларни тиклайди ва яхшилайдди, липид пероксидациясини оксидланишини секинлаштиради ва антигипоксик фаолликка эга.

Хулоса. Шундай қилиб, гепалипин ва янтацин комплекс препаратининг таъсири ва флавоноид

SUMMARY

The aim of study: to study the state of fibrosis in chronic experimental hepatitis, to determine the set of laboratory parameters that reflect the main mechanisms of fibrogenesis in chronic liver diseases, and to assess the antifibrotic activity of pharmaceutical composition in experimental conditions.

Materials and research methods. 110 mongrel white male rats with a body weight of 100 ± 10 g were used as the object of the study. All experimental animals were in the same care and feeding conditions. In the early stage of hepatic fibrosis, antifibrotic activity has been studied, the composition of the composition consists of hepalipin and a class of polyphenols – proanthocyanidine. Proanthocyanidin (conditional yantacin) *Alhagi pseudalhagi*, from the plant. Hepalipin at a ratio of 100 mg: Contains 84.4 mg 80.0 lipoids; 6 mg lycopene; 5 mg ecdystene, 10 mg glycyrrhizine acid.

Results. We came to the conclusion that in chronic hepatitis there are signs of a protein-forming, impaired liver function, which is the main mechanism of fibrogenesis, we studied the processes of liver tissue, that is, reparative regeneration in the liver and, as a result, factors that lead to liver cirrhosis. To prevent the development of fibrous tissue, we studied its biological composition and effect, which improves metabolic processes in the liver with hepatoprotective properties, increases resistance to pathogens and helps to restore their activity in various diseases. They restore and improve metabolic processes in the body, slow down the oxidation of lipid peroxidation and have antihypoxic activity.

Conclusion. The effect of the complex drug hepalipin and yantacin and the sum of flavonoids were studied for the first time and, according to the results obtained, positively showed the therapeutic effect of these drugs on the normalization of the morphofunctional state of the liver, metabolic processes in chronic heliothrin hepatitis.

Keywords: liver fibrosis, liver cirrhosis, hepalipin, yantacin, experimental hepatitis.

лар йиғиндисини биринчи марта ўрганилди ва олинган натижаларга кўра ушбу дориларнинг жисгарнинг морфофункционал ҳолатини нормаллаштиришга, сурункали гелиотрин гепатитидаги метаболик жараёнларга терапевтик таъсирини ижобий томондан кўрсатди.

Калим сўзлар: жисгар фибрози, жисгар циррози, гепалитин, янтоцин, экспериментал гепатит.

Основной путь прогрессирования хронических заболеваний печени, приводящий к ее повреждению – это процесс активации фиброгенеза. В последнее время расширились представления о механизмах фиброгенеза, что привело к пониманию обратимости фиброза и к достаточно реалистичным ожиданиям того, что эффективная терапия обеспечит благоприятный прогноз даже при тяжелых стадиях фиброза. В связи с этим, комплексное изучение механизмов развития фиброза печени (ФП) остается актуальной задачей современной медицины [3,8,9,11]. Хронические заболевания печени (ХЗП), в том числе цирроз печени (ЦП), являются одними из причин глобального увеличения смертности и становятся все более серьезной нагрузкой на систему здравоохранения [4,5,6,]. Стоит отметить, что примерно у 30% населения мира фиброз печени (ФП) или ЦП в результате гибели гепатоцитарных клеток из-за длительного воздействия также существует по крайней мере один фактор риска, который может привести к ГЦК [2,12].

Цирроз печени является основной, но в значительной степени предотвратимой и недооцененной причиной ухудшения глобального здоровья [5,6,9, 11]. Научные открытия последних лет привели к совершенствованию понимания клеточных факторов и молекулярных механизмов фиброгенеза печени, успешному внедрению в клиническую практику прогрессивного скрининга фиброза с помощью полезных инвазивных, малоинвазивных и неинвазивных, а также лабораторных методов исследования, позволяющих выявлять фиброзные процессы на ранних стадиях и предотвращать осложнения. Кроме того, хотя был достигнут прогресс в понимании патогенеза и клинических эффектов фиброза печени, терапевтические стратегии этого заболевания ограничены. Это, в свою очередь, означает, что пациентов с ХЗП необходимо лечить до того, как разовьются осложнения, которые могут возникнуть и рассматриваются как основная причина заболеваемости, инвалидности и смерти во всем мире.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить состояние фиброза при хронических экспериментальных гепатитах, определить комплекс лабораторных показателей, отражающих основные механизмы фиброгенеза при хронических заболеваниях печени и оценить антифиброзную активность фармацевтической композиции при экспериментальном гепатите.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Композиция, в которой изучалась антифиброзная активность на ранней стадии фиброза печени, состоит из гепалипина и класса полифенолов – проантоцианидина. Проантоцианидины (условно янтацин), полученного из растения *Alhagi pseudalhagi*. Гепалипин представляет собой в соотношении на 100 мг: 84,4 мг - Липоида с 80,06 мг - ликопина, 5 мг – экидистена, 10 мг - глицеризиновая кислота.

В качестве объекта исследования использовано 110 беспородных белых крыс-самцов с массой тела 100 ± 10 г. Чтобы вызвать фиброз печени подопытным животным вводили гелиотрин в высокотоксичных дозах по следующей схеме [Aripov A.N, et al. (2022).]: 3 раза в неделю в дозе 250 мг/кг, затем в дозе 150 мг/кг 3 раза в неделю в течение 2 недель, четвертая неделя в дозе 100 мг/кг 3 раза в неделю, последняя неделя в дозе 30 мг/кг вводили 3 раза.

Анализ функционального состояния печени оценивали определением сывороточных трансаминаз, определение уровня общего и прямого билирубина, общего белка и его фракций, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтрансферазы, исследования проводились на модульной автоматизированной системе для клинической химии и иммунологического анализа- Cobas 6000®. Пролиферирующий антиген ядра клетки (PCNA). Основной целью использования иммуногистохимических исследований в данной работе является определение биологических маркеров запрограммированной гибели паренхиматозных клеток печени и активности пролиферативно-регенеративных процессов в органе. Пролиферация клеток и регенерация органов в качестве биомаркеров использовался антиген пролиферации ядра клетки (PCNA) [Gucciardi, M.E. 2005]. Определение уровня-цитокиннов CD68+, CD34+ в крови определяли на хемилюминесцентном иммуноанализаторе Randox Biochip.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Токсическое повреждение печени у крыс в результате введения гелиотрина привело к нарушению функционального состояния клеток печени. Так при введении гелиотрина в крови экспериментальных животных обнаружено изменение содержания эритроцитов, меняются не только качественные, но и количественные показатели эритропоэза: снижается гематокритный показатель. Данный факт связан с нарастанием тканевой гипоксии, которая приводит к некрозу и апоптозу клеток. Со стороны клеток белой крови наиболее выраженные изменения отмечаются

в крови крыс с хроническим гелиотриновым гепатитом (ХГГ), когда в периферической крови увеличивается количество гепатоцитов и средних клеток, что отражает экссудативную фазу воспаления в ответ на повреждение функциональных клеток в органе. Это также отражает пролиферативную фазу, направленную на фагоцитоз деструктивно-измененных гепатоцитов печени. Снижение тромбоцитов в крови связано, по-видимому, со снижением функциональной активности мало дифференцированных гепатоцитов.

В условиях ХГГ наблюдается динамичное нарастание гиперферментемии. В условиях ХГГ в крови отмечается заметно выраженное увеличение активности обеих трансаминаз крови. Активность АЛТ и АСТ динамично повышается по сравнению с контролем в 6,2 раза и в 5 раз соответственно по сравнению с уровнями этих показателей в контрольной группе. Было обнаружено, что общее количество белка снизилось до 46% по сравнению с контрольной группой, в то время как общее количество билирубина в крови у экспериментальных животных повышается в 3 раза.

Наряду с этим, необходимо подчеркнуть, что имеет место также повышение уровня ЩФ с 167,8 до 433,3 указывающей на нарушение в системе желчевыделения.

Площадь, занимаемая CD68-позитивными макрофагами внутри печеночных долек, динамично увеличивалась. При сформировавшемся хрониче-

ском гепатите CD68 увеличивалась с 2,98% до 5,49 CD95 – с 4,75±0,48% до 27,68±1,15%. Уровень CD16 снижался с 25,6% до 11,5%.

Таким образом, резюмируя полученные данные по исследованию в печени и крови экспериментальных животных, можно заключить, что в условиях хронического гепатита происходит появление признаков нарушения белковообразовательной, липидной функции печени, является основным механизмом регуляции фиброгенеза в ткани печени, то есть процессы репаративной регенерации в печени замедляются, в результате чего возрастает вероятность развития тяжелого цирроза печени.

Целью предотвращения развития фиброзной ткани, мы исследовали гепатопротекторы, обладающие гепатопротекторными свойствами. Гепатопротекторы – препараты, улучшающие метаболические процессы в печени, повышающие устойчивость к патогенам и способствующие восстановлению их функции при различных нарушениях. Улучшают обменные процессы в организме, тормозят перекисное окисление липидов, обладают антигипоксической активностью.

Так введение суммы янтацина и гепалипина исследуемым животным снижало активность ферментов печени по сравнению с крысами контрольной группы, которые не получали это вещество, при этом демонстрируя показатели, близкие к показателям крыс из группы интакт (табл. 1). Однако активность щелочной фосфатазы оставалась в пределах нормы.

Таблица 1

Сравнение сумм янтацина и гепалипина и доз фосфоглива с высокой гепатопротекторной активностью по активности функционального состояния ферментов печени при ХГГ

Экспериментальные группы	Интактная группа	Контрольная группа	Сумма янтацина и гепалипина	Фосфоглив
			100 + 100 мг/кг	50 мг/кг
Дозы в мг/кг	Дист. вода	Гелиотрин		
АЛТ u/l	95,8±2,4	268,9±9,6	122,3±3,2	144,5±2,4
АСТ u/l	156,6±4,8	373,6±11,21	174,7±9,6	192,1±6,96
Общий белок (g/l)	85,6±4,8	58,7±2,9	80,2±3,12	71,5±2,4
Альбумин g/l	48,5±2,9	33,3±3,6	45,8±2,9	40,5±2,48
Общий Билирубин mkmol/l	2,15±0,96	5,12±0,96	3,1±0,048	3,4±0,96
Коэффициент де Рица (AST/ALT)	1,63±0,22	1,35±0,11	1,43±0,1	1,33±0,11
ЩФ, u/l	394±4,48	434,4±6,52	401±4,48	401±5,22
ЛДГ, u/l	625,5±11,6	1532,5±22,4	996,2±5,6	1105±44,8
ГГД u/l	1,15±0,11	1,46±0,11	1,21±0,11	1,34±0,12
Амилаза (u/l)	495,7±11,22	442,6±6,48	488,1±5,96	476,2±8,96

Примечание: * - различия по сравнению с данными контрольной группы-P<0,005

Приведенные выше данные о динамике активности инкрититорных и экскреторных ферментов в сыворотке крови крыс, получавших эти вещества в условиях эксперимента, свидетельствуют о том, что введение сумм янтацина и гепалипина оказывало нормативное влияние на функции печени.

Таким образом, сумма янтацина и гепалипина была очевидна в модели хронического гелиотринового гепатита по гепатопротекторным свойствам по

сравнению с контрольной группой, а по сравнению со сравнительным препаратом Фосфогливом препарат проявлял аналогичную или значительно более высокую гепатопротекторную активность.

В исследованиях было замечено, что сумма изученных янтацина и гепалипина значительно снижает количество воспалительно - стимулирующих цитокинов, которые увеличиваются в несколько раз в результате хронического токсического повреждения печени

(рис. 1). Можно сделать вывод, что уменьшение количества этих цитокинов под действием биологически активных веществ пропорционально биохимическим показателям крови, что происходит в связи с угнетающим действием изученных биологически активных веществ на воспалительные процессы и усиливающим на регенеративные.

Таким образом, восстановление иммунорегуляторной функции цитокинов можно рассматривать как один из основных механизмов защитного действия биологически активных веществ, применяемых при экспериментальном хроническом гепатите. Эффективность суммы янтакрина и гепалипина показала более высокую активность по сравнению с фосфогликозидами.

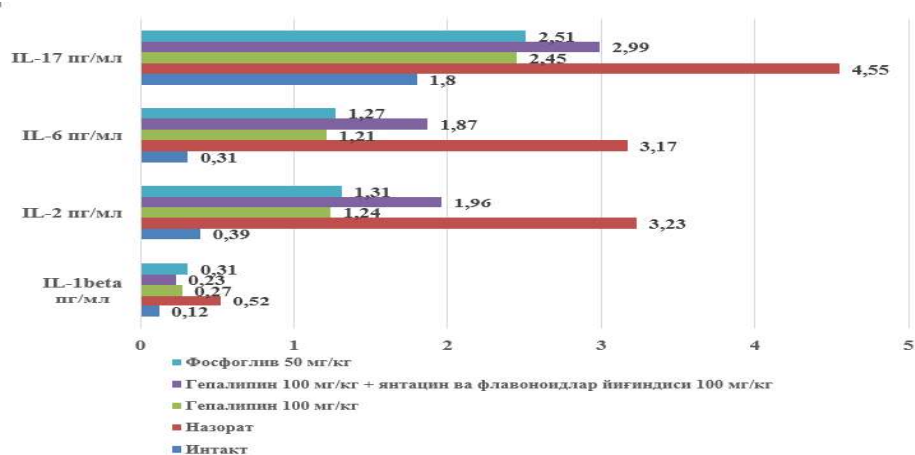


Рис. 1. Сравнительное исследование влияния БФМ и фосфоглива на цитокины в условиях ХГГ.

Результаты исследования и изучение активности воспалительно-стимулирующих цитокинов при хроническом процессе показали, что имеет место гиперпродукция интерлейкинов, а частота, нормализация и повышение уровня ИЛ-6 в крови до $3,17 \pm 5,0$ пг/мл, ИЛ-2 в крови до $3,23$ пг/мл, ИЛ-1бета и ИЛ-17 соответственно на 333 и 253%. Представленные результаты свидетельствуют о наблюдении регуляции выработки воспалительно-стимулирующих форм ци-

токинов у подоопытных животных при хроническом гелиотриновом гепатите. Дисбаланс в соотношении воспалительных и противовоспалительных факторов обусловил деструктивный характер воспаления и его обострение.

Проведены исследования для изучения белка PCNA, являющийся маркером пролиферации гепатоцитов, на фоне лечения хронического гепатита. Как видно из представленных данных (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение суммы янтакрина и гепалипина и влияния Фосфоглифа на экспрессию белка PCNA в гепатоцитах с ХГГ

Экспериментальная группа	Дозы mg/kg	Количество животных	положительная экспрессия белка PCNA	
			количество положительных наблюдений	количество PCNA – положительных клеток, в %
Интактная группа	Дис. вода	10	10	54,2±3,1
Контрольная группа (ХГГ)	Дис. вода	10	7	9,7±1,28*
Сумма янтакрина и гепалипина	100+100	10	10	44,1±1,12
Фосфоглиф	50	10	10	36,7±2,4

Примечание: * - различия по сравнению с данными контрольной группы- $P < 0,005$

Исследуемые вещества проявляют способность стимулировать ряд положительных реакций на белок PCNA в условиях ХГГ у крыс с экспериментальной патологией печени. При этом увеличение количества подоопытных крыс во всех опытных группах составило 30% по сравнению с контрольной группой.

Отсюда следует, что исследуемые БАВ стимулируют генетические механизмы, ответственные за пролиферацию гепатоцитов печени у экспериментальных животных.

Наряду с увеличением числа PCNA-позитивных животных на фоне БАВ существенные изменения претерпевает и количественный уровень белка PCNA. Так особенно гепалипин и фосфоглив, повышали экспрессию этого белка более чем в 3,5 раза по сравнению с группой нелеченых животных. Комбинация гепалипина и янтакрина и флавоноидов увеличилась до 4,5 раз, т.е. до 1,17 и 1,2 раза по сравнению с гепалипином и фосфогливом соответственно.

Полученные результаты, несомненно, помогут понять механизмы хронического поражения печени

с точки зрения гибели и регенерации клеток, а также станут теоретической предпосылкой для создания новых технологий лечения патологии печени, особенно хронических форм, а также инициация фибробиотических процессов послужит поводом для разработки мероприятий по предупреждению развития патологии печени на ранних ее стадиях.

Далее нами было изучено влияние показателей иммунной системы, CD68, CD34 у животных с хронической гелиотриновой интоксикацией наблюдалось снижение относительного количества CD68 -позитивных лимфоцитов в срезах печени под влиянием БФМ.

Печеночные макрофаги (клетки Купфера), по мнению исследователей, представляют собой самую

большую популяцию мононуклеарных фагоцитов организма, которые присутствуют как в интактной печени, так и при патологических состояниях [25]. При ХГГ состав внутридольковой лимфоцитарной инфильтрации полиморфен и часто включает CD34 - и CD68 -положительные клетки, а также клетки иммунной системы. Площадь, занимаемая CD34 - и CD68 -позитивными макрофагами в срезах печени, динамически увеличивалась с 27,68 % до 5,49%.

Количество внутрипеченочных CD 34 -позитивных лимфоцитов у экспериментальных крыс также было значительно снижено по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Таблица 3

Сравнение влияния суммы янтактина и гепалипина и Фосфоглива на показатели CD68, CD34 в условиях ХГГ

Экспериментальная группа	Дозы mg/kg	CD68, % площади	CD34, % площади
Интактная группа	Дистилиров. вода	3,89±0,21	4,75±0,48
Контрольная группа (ХГГ)	Дистилир.вода	5,49±0,9*	27,68±1,15
Сумма янтактина и гепалипина	100+100	4,21±1,1	14,7±1,12
Фосфоглив	50	5,11±1,14	18,95±1,8

Примечание: * - различия по сравнению с данными контрольной группы- $P < 0,005$.

Следовательно, изученные БАВ в условиях ХГГ связаны с относительным количеством CD 68 и CD 34 -позитивных лимфоцитов в ткани печени оказал положительный эффект, в частности гепалипин + янтактин + сумма флавоноидов показали высокую активность по сравнению с гепалипином и фосфогливом в отдельности.

Таким образом впервые исследовано действие комплексного препарата гепалипина + янтактина и суммы флавоноидов.

Полученные результаты свидетельствуют о терапевтическом эффекте данных препаратов для нормализации морфофункционального состояния печени, метаболических сдвигов при хроническом гелиотриновом гепатите.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что тяжесть хронического токсического поражения или фиброзных нарушений зависит от уровня ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в печени в условиях ХГГ.

2. В динамике развития экспериментального гелиотринового гепатита определяли индукцию цитокинов IL-1b, IL-2, IL-6 и IL-17, максимальное увеличение их количества установлено на 35-е сутки развития гелиотринового гепатита по сравнению с интактными животными.

3. Терапия с использованием суммы флавоноидов приводит к положительной динамике, отмечается тенденция к нормализации липидных компонентов мембран печени и к уменьшению степени фиброза, достоверное снижение показателей некроза и воспаления в печени, снижения уровня цитокинов.

ЛИТЕРАТУРА

- Aripov A.N., Akhunjanova L.L., Khamroev T.T. Differential Analysis of Chronic Toxic Hepatitis Caused by The Introduction of Heliotrin Solution in Various Ways. Texas Journal of Medical Science. A Bi-Monthly, Peer Reviewed International Journal page 58-62 Volume 4 27.01.2022.
- Aripov AN, Aripov OA, Axunjanova LL, Nabiev AO, Nabieva DA, & Hamroev TT. Jigarning surunkali geliotriini shikastlanishida yantasinning hujayra yangilanishining ba'zi ko'rsatkichlariga va oqsillarini ifodalash darajasiga kalamush hepatotsitlariga ta'sirini o'rganish. Tibbiyot fanlari va klinik tadqiqotlar xalqaro jurnali, 2(05), 06-13. <https://doi.org/10.37547/ijmscr/Volume02Issue05-02>.
- Zois C., Baltayiannis G., Karayiannis P., Tsianos E. Systematic review: hepatic fibrosis – regression with therapy. Aliment. Pharmacol. Ther. 2008;28:1175–87.
- Иноятова Ф.И., Иногамова Г.З., Валиева Н.К. Виферон и урсосан в терапии хронического вирусного гепатита В и С у детей // Детские инфекции. -2007.-№1. –С.69-71.
- Иноятова Ф.И., Абдумаджидова Ш.У., Иногамова Г.З., Ахмедова А.Х., Валиева Н.К., Ашурова С.А., Абдуллаева Ф.Г. Показатели интерферонового статуса у детей с хроническим гепатитом В на фоне применения тиотриазолина // Сб. мат. XII Конгресса педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии». Москва. 2008. –С 133.
- Королева Л.Р. Современные гепатопротекторы // Российский медицинский журнал. -2005. - Т67, №2. - С. 35-37.

7. Майборода А.А., Калягин А.Н., Зобнин Ю.В., Щербатых А.В. Современные подходы к подготовке оригинальной статьи в журнал медико-биологической направленности в свете концепции «доказательной медицины» // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2008. – Т.76. №1. – С.5-8.
 8. Жураковский И.П., Архипов С.А., Пустоветова М.Г., Кунц Т.А., Битхаева М.В., Маринкин И.О. / Особенности развития фиброза печени на фоне формирования синдрома дистрофически дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе // Сибирский медицинский журнал (г. Томск). - 2011.- Т.26, № 2-3. - С. 140–143.
 9. Северов М.В. Обратимость фиброза и цирроза печени при HCV-инфекции. Гепатологический форум. 2008;1:2–6.
 10. Селевич М.И, Лелевич М.И., Виницкая А.Г. и др. Влияние салсоколлина на метаболические показатели печени крыс после введения этанола и его отмены // Патол. физиол. и эксперим. тер. 2001. - № 3. - С. 26-28.
 11. Сторожаков Г.И., Ивкова А.Н. Патогенетические аспекты фиброгенеза при хронических заболеваниях печени Клин. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. 2009;2:3–10.
 12. Шутов Д.В. Влияние гепатопротекторов, содержащих полифеноды, на метаболизм печени при экспериментальной патологии. Дисс..к.м.н., Россия 2008.-224 с.
-