

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ ТРЁХМЕСЯЧНЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ ХЛОРОФИТУМА ХОХЛАТОГО*

Аннотация. Проведенное исследование показало, что ферментативный гидролизат Хлорофитума хохлатого обладает стимулирующим действием в отношении репаративной функции печени при ее токсическом поражении.

Ключевые слова: печень, гепатоцит, регенерация, апоптоз, некроз, пролиферация, гидролизат.

Современная биотехнология, как одна из важнейших биологических дисциплин, решает массу сложных задач, среди которых важное место занимает поддержание здоровья населения, наиболее эффективные и безопасные способы профилактики и лечения различных заболеваний. Это объясняет значительное развитие и распространение технологий, связанных с производством разнообразных БАДов.

БАД – природные или идентичные природным биологически активные вещества, предназначенные для употребления вместе с пищей или вводящиеся в состав пищевых продуктов. Эффект БАД реализуется путем инициации универсальных механизмов адапционно-приспособительных реакций организма на воздействие раздражителей различной природы. Важно то, что, в отличие от лекарств, БАД поддерживают или регулируют функции органов и систем в пределах их физиологической нормы, имеют более широкий диапазон доз, не вызывающих токсического эффекта. Кроме того, БАД, в зависимости от состава, являются дополнительным источником белка, аминокислот, жиров, углеводов, витаминов, минеральных веществ. Мишенью действия БАД являются различные системы и органы человеческого организма, активно участвующие в метаболизме, нуждающиеся в интенсивном поступлении питательных веществ, или наиболее подверженные антропогенным, вирусным или токсическим нагрузкам, как, к примеру, печень [2].

Биологически активные добавки производятся из различных видов сырья как животного, так и растительного происхождения. Значительную часть их представляют ферментативные гидролизаты – продукт ферментного расщепления белков исходного сырья. Полученные результаты расщепления физиологичны, легко проникают в клетку и включаются в процессы клеточного метаболизма. Биологически активные вещества в гидролизате находятся в более концентрированном виде, нежели в сырье. Кроме того, гидролизаты содержат незаменимые аминокислоты – природный строительный материал для клеток.

Декоративное растение Хлорофитум хохлатый (*Chlorophytum comosum*) известно своими свойствами биологического фильтра, активно поглощая из воздуха и нейтрализуя опасные для человека соединения, такие, как: фенолы, угарный газ, формальдегид, соединения ксилола, бензола и толуола [1; 3; 6].

Перечисленные выше соединения являются хорошо изученными гепатотропными ядами. Способность Хлорофитума хохлатого к их нейтрализации позволила нам предположить, что препараты этого растения могут проявить гепатопротективные свойства. В

* © Козлова М.А.

лаборатории биологии клетки НОЦ Биологии клетки и прикладной биотехнологии Московского государственного областного университета были получены водный и спиртовой экстракт, а также ферментативный гидролизат из листьев Хлорофитума хохлатого. Проведенное исследование на безвредность показало безопасность этих препаратов в отношении организма млекопитающего.

Комплексный анализ химического состава гидролизата хлорофитума выявил содержание в нем важнейших, в том числе незаменимых, аминокислот, особое значение среди которых имеет L-гистидин гидрохлорид и L-орнитин моногидрохлорид, играющие важную роль в ликвидации последствий воспалительного процесса, в том числе и при токсическом поражении печени. Эти аминокислоты превращаются в организме в процессе декарбоксилирования в гистамин, рост концентрации которого создает условия для оптимального регулирования сосудистых реакций в очаге воспаления, снижения степени выраженности патологической направленности воспалительного процесса. Аминокислоты нашли широкое применение в качестве самостоятельного лекарственного препарата при лечении гепатитов различной этиологии [7].

Кроме того, гидролизат содержит аминокислоту цистин, являющийся мощным антиоксидантом, который печень использует для нейтрализации свободных радикалов, и другие аминокислоты, менее специфичные для печени, но являющиеся необходимым компонентом питания организма, как, к примеру, лейцин, валин и фенилаланин.

Было проведено исследование гепатопротективных свойств гидролизата Хлорофитума хохлатого при применении данного препарата *per os* в условиях экспериментального токсического повреждения печени.

Исследование проведено на крысах линии Вистар обоих полов в возрасте трех месяцев, содержащиеся в виварии в стандартных условиях.

Для моделирования токсического повреждения печени использовался четыреххлористый углерод (CCl₄), обладающий доказанными и хорошо изученными свойствами гепатотропного яда. Крысы были разделены на 4 группы, численность каждой составляла 20 животных:

1. интактные животные;
2. контрольная группа 1 (выпаивание гидролизатом);
3. контрольная группа 2 (ингаляция CCL₄);
4. экспериментальная группа (CCL₄+гидролизат).

Животные первой (интактной) группы не получали никаких воздействий, животные второй группы выпаивались гидролизатом в дозе 0,1 мл на 1 кг веса животного в течение 6 дней. Животные третьей группы подвергались воздействию четыреххлористого углерода путем ингаляции в закрытом эксикаторе по 2 минуты в течение 6 дней. Животные четвертой (экспериментальной) группы также запылялись четыреххлористым углеродом, одновременно получая с питьем гидролизат хлорофитума в вышеприведенной дозировке.

По окончании эксперимента производилось взвешивание и забой животных методом декапитации с забором печени. Печень подвергалась взвешиванию и отбору фрагментов для гистохимического исследования содержания липидов, рассчитывалась относительная масса печени. Органы фиксировались в 10% нейтральном забуференном формалине с последующей проводкой по общепринятой методике и заливкой в парафин.

Серийные срезы исследуемых органов толщиной 5-7 микрометров готовились на обычном и замораживающем микротоме. Производилась окраска срезов гематоксилин-эозином для патоморфологического исследования печени; гистохимическими методами определялось содержание в гепатоцитах липидов, гликогена, белков и нуклеиновых кислот. При помощи окуляр-микрометра производилось определение линейных разме-

ров клеток и ядер, рассчитывалось ядерно-цитоплазматическое отношение.

Для обнаружения апоптических телец полутонкие срезы печени окрашивались метиленовым синим-азуром II с докраской фуксином. Расчет апоптического индекса осуществлялся по формуле:

$$AI = N_a/N,$$

где N_a – число апоптических клеток, N – общее число клеток.

По аналогичной формуле рассчитывались некротический и митотический индексы (N_n и N_m как количество некротических клеток и число митозов, соответственно). Число некротических и делящихся клеток подсчитывалось в срезах, окрашенных гематоксилин-эозином.

Определялась также скорость пролиферации клеток в печени экспериментальных животных. Для вычисления ее использовался метод с применением колхицина, позволяющий рассчитывать интенсивность деления клеток, начиная с единого этапа – метафазы [4].

Для осуществления данного метода всем экспериментальным животным за 5 часов до забоя вводился внутривенно 0,02% водный раствор колхицина в дозе 0,7 мл препарата на 100 г веса животного. Спустя 5 часов после инъекции колхицина животные забивались.

Скорость пролиферации высчитывалась по формуле:

$$V = I_m/M_t * 100\%,$$

где I_m – митотический индекс, M_t – время митоза или продолжительность времени регенерации (в данном случае – 5 часов, время действия колхицина).

Обработка полученных результатов производилась в программах Primer of Biostatistics (Version 4.03), Microsoft Excel. Рассчитывались средние значения, определялась стандартная ошибка среднего, степень достоверности отличий экспериментальных данных от контроля.

Выявлены также различия в значениях относительной массы печени, показатель которой у животных контрольной группы достоверно выше, чем в экспериментальной, и составляет $0,055 \pm 0,003$ против $0,048 \pm 0,001$.

В процессе исследования было выявлено значительное поражение печени у животных, подвергавшихся воздействию четыреххлористого углерода. У животных этой группы отмечаются вакуольная, белковая, реже жировая дистрофии, достаточно обширные очаги некроза, обширный периваскулярный и межбалочный инфильтрат, нарушение балочного строения долек. Происходит значительное (в 8 раз) увеличение некротического – $15,29 \pm 2,15\%$ к $1,97 \pm 0,09\%$ у интактных животных – и апоптического индекса – $4,42 \pm 0,27\%$ при $3,14 \pm 0,12\%$ у интактных. Митотический индекс у затравленных животных, напротив, значительно снижается ($1,83 \pm 0,26\%$ против $3,89 \pm 0,18$), равно как и скорость пролиферации, значение которой у данной группы составляет $37,1 \pm 5,33\%$, что вдвое меньше показателей интактной группы ($79,56 \pm 3,6\%$). Достоверно снижено и число двуядерных клеток: $0,99 \pm 0,092\%$ против $1,58 \pm 0,15\%$. Линейные размеры ядер резко увеличиваются ($6,97 \pm 0,17$ против $5,96 \pm 0,14$ мкм в интактной группе), в то время как размеры клетки практически не изменяются, что ведет к достоверному увеличению ядерно-цитоплазматического отношения.

Перечисленные изменения говорят о значительном поражении печени и сниженной способности к регенерации. Такого рода повреждение органа является обратимым, но может усугубляться, отрицательно сказываясь на общем состоянии организма.

Иная картина наблюдается в печени крыс, одновременно с ингаляцией CCl_4 принимавших гидролизат хлорофитума (экспериментальная группа). Здесь отмечена только баллонная дистрофия, некрозы единичные, инфильтрат умеренный, балочное строение

органа сохранено в большей степени. Некротический индекс в печени данных животных значительно ниже, чем в группе 3 (воздействие CCl_4), составляя $2,71 \pm 0,32$ против $15,29 \pm 2,15\%$, и не имеет достоверного отличия от НИ интактной группы. Уровень митоза превышает показатели контроля почти вдвое ($3,21 \pm 0,15\%$ и $1,83 \pm 0,26\%$ соответственно), возрастают также скорость пролиферации ($66,21 \pm 2,6\%$ против $37,1 \pm 5,33\%$ в контроле), и число двуядерных клеток ($1,32 \pm 0,082\%$ против $0,99 \pm 0,092\%$), что говорит о серьезном повышении регенераторного потенциала печени под влиянием биологически активных веществ гидролизата. Размеры ядер и клеток существенно меньше в сравнении как с контролем, так и с интактной группой, что связано с высокой скоростью пролиферации с появлением большого количества мелких молодых клеток.

Показатели данной группы приближаются к таковым у интактной группы, за исключением апоптического индекса ($8,57 \pm 0,41\%$ к $3,14 \pm 0,12\%$ у интактных), повышение которого является естественным процессом при токсическом поражении печени [5].

У животных, выпаиваемых гидролизатом без токсического воздействия, отмечается достоверное повышение апоптического индекса, но все остальные исследованные параметры сохраняются в пределах нормы.

Помимо морфофункционального состояния исследуемых органов, исследовалось также содержание в них основных метаболитов в норме, при патологических изменениях и под воздействием ферментативного гидролизата хлорофитума. Исследование показало достоверное отклонение этих показателей от интактных при применении CCl_4 и тенденцию к нормализации при одновременном употреблении животными гидролизата хлорофитума.

Так, у животных, подвергавшихся воздействию четыреххлористого углерода, нами было отмечено понижение содержания в гепатоцитах гликогена до $1,66 \pm 0,045$ балла, в то время как у животных экспериментальной группы оно составляет $2,02 \pm 0,042$ балла, что достоверно выше. Количество суммарных белков у контрольных животных составляет $1,56 \pm 0,04$ балла против $2,065 \pm 0,024$ балла в эксперименте. Достоверно также различие в содержании нуклеиновых кислот. Так, содержание ДНК в контроле равно $1,78 \pm 0,05$ балла против $1,95 \pm 0,02$ балла у экспериментальных животных, РНК – $1,73 \pm 0,052$ против $1,91 \pm 0,027$ балла. Кроме того, содержание РНК у экспериментальных животных повышено в сравнении с интактной группой, что, вероятно, связано с усилением белоксинтезирующей функции в ответ на токсическое повреждение. Количество липидов составляет $1,86 \pm 0,14$ балла в контроле и $2,04 \pm 0,15$ балла в эксперименте, различия здесь менее существенны.

Прием гидролизата хлорофитума с питьем без токсического воздействия достоверных изменений содержания метаболитов в печени не вызывает.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что ферментативный гидролизат обладает значительными гепатопротективными свойствами, снижает интенсивность воспалительного процесса, усиливает антиоксидантную активность печени, восстанавливает метаболизм в гепатоцитах. Ярко выражено положительное влияние гидролизата на процессы регенерации печени, о чем свидетельствуют различия митотического, некротического, апоптического индексов и скорости пролиферации в исследованных группах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гольшенков П.П. Лекарственные растения и их использование / П.П. Гольшенков. – Саранск: Мордовское книжное издательство, 1990. – С. 29-30.
2. Голубев В.Н. Пищевые и биологически активные добавки / В.Н. Голубев, Л.В. Чичева-Филатова, Т.В. Шленская – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – С. 118-128.

3. Гортинский Г.Б. .П. Целебные растения в комнате / Г.Б. Гортинский, Г.П. Яковлев.
4. Калинская Н.С. Особенности физиологической и репаративной регенерации печени крыс в репродуктивном периоде онтогенеза под влиянием биопрепаратов на основе Каллизии душистой. Автореф.... дисс. канд. биол. наук / Н.С. Калинская. – Ставрополь, 2009. – 22 с.
5. Лушников Е.Ф. Гибель клетки (апоптоз) / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов – М.: Медицина, 2001. – 192 с.
6. Токин Б.П. Целебные яды растений / Б.П. Токин. – Л.: Наука, 1980. – С. 260. – М.: Высшая школа, 1993. – С. 98-100.
7. Хабриев Р.У. Фармакологический справочник / Р.У. Хабриев, Р.И. Ягудина, Л.К. Овчинникова. – М.: Серебряные нити, 2006 – 704 с.

M. Kozlova

THE MORFOFUNCTION CHARACTERISTIC OF A LIVER THREE-MONTHLY RATS AT EXPERIMENTAL TOXIC DAMAGE OF A LIVER AND ITS CORRECTION ENZYMIC HYDROLYZATE CHLOROPHYTUM COMOSUM

Abstract. Was exposed an incentive effect of Chlorophytum comosum enzymatic hydrolyzate on a reparative function of hepar with a toxic damage.

Key words: hepar, hepatocyte, regeneration, apoptosis, necrosis, proliferation, hydrolyzate.