УДК 615.324.015.2:616.36-002-092.9

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТИМАЛИНА И СУСПЕНЗИИ КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У МЫШЕЙ

Кульбеков Е. Ф., Кульбекова Ю. Е., Данилов Р. С.

ГБОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия Минздравсоцразвития России», Пятигорск, Россия (357500, Пятигорск, просп. Калинина 11), e-mail: kulbekovayu@mail.ru

На модели токсического поражения печени мышей тетрахлорметаном (ТХМ) исследована гепатопротекторная активность тималина, суспензии красного костного мозга (ККМ) мышей, и комплекса тималин + ККМ. Гепатопротекторное действие оценивали по трем показателям: проценту выживаемости животных, содержанию общей воды и количеству сохраненных ядер гепатоцитов на гистологических препаратах печени мышей. При изучении выживаемости животных разделили на 2 группы: контрольная группа – мыши, отравленные тетрахлорметаном, и опытная группа – мыши, отравленные тетрахлорметаном и получавшие комплекс «тималин+ККМ». При этом выявлено, что двукратное введение ТХМ в дозе 3,2 мл/кг 50 % масляного раствора приводило к 100 % гибели животных контрольной группы на четвертый день эксперимента. Выживаемость животных опытной группы на этот день составляла 100 %, но после третьего введения тетрахлорметана выживаемость животных опытной группы снизилась до 80 %. В отдельной серии экспериментов в печени мышей с менее тяжелым экспериментальным токсическим гепатитом (ТХМ) изучали гистологические изменения и содержание общей воды (воспалительного экссудата). У мышей трех опытных групп, получавших тималин, ККМ и комбинацию «тималин+ККМ», обнаружено пропорциональное снижение тяжести гистологической картины воспаления и количества общей воды в печени в сравнении с контрольной группой. Таким образом, показано наличие гепатопротекторной активности как у тималина и ККМ отдельно, так и у комбинации «тималин+ККМ».

Ключевые слова: экспериментальный токсический гепатит у мышей, гепатопротекторная активность, тималин, суспензия красного костного мозга, выживаемость, гистологическая картина.

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF THYMALIN AND SUSPENSION OF RED BONE MARROW IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS IN MICE

Kulbekov E. F., Kulbekova Yu. E., Danilov R. S.

SBEE HPE “Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy of Minzdravsotsrazvitiya of Russia”, Pyatigorsk, Russia (357500, Pyatigorsk, Kalinin Avenue 11), e-mail: kulbekovayu@mail.ru

On the model of toxic liver lesion of mice by tetrachloromethane (TCM) there was investigated the hepatoprotective activity of thymalin, the suspension of red bone marrow (RBM) of mice, and the combination of thymalin + RBM. Hepatoprotective effect was estimated by three indices: the percentage of survival rate of animals, the content of total water and the amount of preserved nuclei of hepatocytes in histological preparations of mice liver. In studying the survival rate the animals were divided into 2 groups: control group - mice poisoned with tetrachloromethane and the experimental group - mice poisoned with tetrachloromethane and treated with the combination "thymalin + RBM." It was revealed that the twofold introduction of TCM in a dose of 3,2 ml / kg of 50% oil solution resulted in 100% death of the animals of the control group on the fourth day of the experiment. The survival rate of animals in the experimental group that day was 100%, but after the third injection of tetrachloromethane the survival rate of the animals of the experimental group decreased to 80%. There were studied the histological changes and the content of total water (inflammatory lumph) in a separate series of experiments in the liver of mice with less severe experimental toxic hepatitis (TCM). There was detected a proportional decrease in the severity of histopathologic feature of inflammation and the amount of total water in the liver compared with the control group in mice of the three experimental groups receiving thymalin, RBM and the combination of "thymalin + RBM ". Thus there was shown the presence of hepatoprotective activity both in thymalin and RBM separately and in the combination " thymalin + RBM."

Key words: experimental toxic hepatitis in mice, hepatoprotective activity, thymalin, suspension of red bone marrow, the survival rate, histopathologic feature.

Введение

Поиск новых эффективных гепатопротекторов для лечения и профилактики заболеваний печени является актуальным направлением современной медицины. Существуют исследования, показывающие возможность цитопротекторного действия тималина и стволовых клеток [2, 6].

Интегрирующим критерием наличия гепатопротекторного действия вещества или препарата является процент выживаемости животных после отравления высокими дозами тетрахлорметана.

Важным и доступным методом оценки тяжести гепатита является исследование содержания общей воды в печени. Оценка этого критерия не исключает выявление действия исследуемых веществ на процессы воспаления через нейрогуморальную регуляцию [3, 5].

Гистологическое изучение образцов органов и тканей позволяет оценить произошедшие под влиянием токсического агента морфологические изменения, определить их характер, локализацию и степень повреждения органа, предположить и выявить механизм гепатотропного эффекта [1].

Рабочей гипотезой исследования является предположение о наличии у комплекса тималин + суспензия красного костного мозга (ККМ) гепатопротекторного действия.

Целью исследования было изучение гепатотропного действия тималина и его комбинации с ККМ при тетрахлорметановом поражении печени мышей. Этот эффект должен был быть выявлен по трем критериям: проценту выживаемости мышей, содержанию общей воды в печени мышей и количеству сохраненных ядер гепатоцитов на гистологическом срезе печени мышей.

Материалы и методы исследования

Опыты проводили на белых мышах массой 25-30 г., содержавшихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде.

В первой серии опытов при изучении выживаемости животных их разделили на 2 группы:

1 – контрольная группа – отравленные тетрахлорметаном мыши;

2 – опытная группа – отравленные тетрахлорметаном мыши и получавшие комплекс «тималин + суспензия ККМ».

Количество животных в каждой группе – 10.

Суспензию ККМ получали от мышей-доноров путем промывания полостей двух большеберцовых и двух бедренных костей одним 1 мл 5 % раствора натрия цитрата. Приготовленную суспензию ККМ вводили внутрибрюшинно в дозе – 0,5 мл на одно животное-реципиент.

Тетрахлорметан 50 % масляный раствор вводили в желудок через зонд в количестве 3,2 мл/кг.

Физиологический раствор вводили в количестве 0,05 мл на мышь внутримышечно.

Тималин вводили в дозе 0,05 мг на мышь внутримышечно.

Наблюдения за выживаемостью продолжали в течение двух недель от начала эксперимента.

План эксперимента представлен в таблице 1.

Таблица 1. План введения ТХМ и препаратов в первой серии опытов

	группы животных	
день опыта	контроль	опыт
1	физ. р-р	тималин
2	физ. р-р	тималин + ККМ
3	физ. р-р + ТХМ	тималин + ТХМ
4	физ. р-р + ТХМ*	тималин + ТХМ
5	физ. р-р + ТХМ*	тималин + ТХМ

* план не выполнен – все животные контрольной группы на 4 день погибли.

Во второй отдельной серии экспериментов изучали уменьшение процента содержания воды (воспалительного экссудата) [3, 5] и гистологические изменения в печени животных.

В этой серии животных – разделили на 5 групп:

1 – интактная группа;

2 – контрольная группа – тетрахлорметановый гепатит;

3 – опытная группа «А» – тималин;

4 – опытная группа «Б» суспензия ККМ;

5 – опытная группа «В» тималин + суспензия ККМ.

Количество животных в каждой группе – 10.

В этой серии опытов 50 % масляный раствор тетрахлорметана вводили в желудок через зонд в количестве 2,7 мл/кг (меньше чем в опытах на выживаемость).

Тималин вводили в дозе 0,05 мг на мышь внутримышечно, как и в первой серии опытов.

Суспензию ККМ как и в первой серии опытов на выживаемость, но приготовленную суспензию ККМ вводили внутрибрюшинно в дозе – 0,1 мл на одно животное-реципиент.

Для определения общей воды как критерия интенсивности воспаления брали нативные образцы печени у животных, забитых на пятый день опыта. На аналитических весах взвешивали печень мышей до и после высушивания, которое проводили в течение пяти суток при температуре 60 ^{o}C.

Гистологическим критерием оценки качества пораженной печени служило число сохранившихся ядер гепатоцитов. Для их подсчета использовали цифровой снимок среза печени при увеличении в 800 раз. Число ядер подсчитывали на 10 снимках с экрана монитора с помощью сетки для изображения в приложениях программы Office 2007.

Для определения гистологических изменений образцы печени фиксировали в формалине, а затем готовили срезы и окрашивали раствором Гимза.

После стандартной статистической обработки (среднее арифметическое, ошибка репрезентативности) определяли достоверность различий между контрольными и опытными группами по критерию Стьюдента [4].

План эксперимента представлен в таблице 2.

Таблица 2. План введения препаратов во второй серии опытов

	группы животных				
день опыта	интактные	контроль ТХМ	опытная «А»	опытная «Б»	опытная «В»
1	физ. р-р	физ. р-р	тималин	физ. р-р	тималин
2	физ. р-р	физ. р-р	тималин	физ. р-р + ККМ	тималин + ККМ
3	физ. р-р	физ. р-р + ТХМ	тималин + ТХМ	физ. р-р + ТХМ	тималин + ТХМ
4	физ. р-р	физ. р-р + ТХМ	тималин + ТХМ	физ. р-р + ТХМ	тималин + ТХМ

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования выживаемости мышей представлены в таблице 3.

Таблица 3. Выживаемость животных в 1-й серии опытов

	процент выживших животных	
день опыта	**контроль**	**опыт**
1	100	100
2	100	100

3	30	100
4	0	100
5	0	80
15	0	80

Из таблицы 3 видно, что двукратное введение ТХМ в дозе 3,2 мл/кг 50 % масляного раствора приводило к 100 % гибели животных контрольной группы на четвертый день эксперимента.

Выживаемость животных опытной группы на этот день составляла 100 %. После третьего введения тетрахлорметана выживаемость в опытной группе снизилась до 80 %.

Результаты исследования содержания общей воды в печени мышей представлены в таблице 4.

Таблица 4. Процент уменьшения содержания воды в печени мышей во 2-й серии опытов

группы животных									
интактные		контроль ТХМ		опытная «А»		опытная «Б»		опытная «В»	
M	m	M	m	M	m	M	m	M	m
1,07	0,09	1,55	0,08	1,38	0,02	1,16	0,08	1.16	0,07
t=4,07		-		t=2,13		t=3,31		t=3,75	

M – среднее арифметическое, m – ошибка среднеквадратичного отклонения, t – критическое значение коэффициента Стьюдента (при n=10 составляет 2,2).

Из таблицы 4 видно, что введение ТХМ приводило к достоверному увеличению процента содержания воды (воспалительного экссудата) в печени в сравнении с интактной группой мышей.

Во всех трёх опытных группах наблюдали уменьшение процента содержания воды (воспалительного экссудата) в печени в сравнении с контрольной группой животных, получавших только тетрахлорметан.

Результаты исследования гистологических изменений в печени мышей представлены в таблице 5 и на рисунках 1–2.

Таблица 5. Количество ядер гепатоцитов на микропрепаратах (х800) печени мышей с экспериментальным поражением печени

группы животных				
интактные	контроль ТХМ	опытная «А» тималин	опытная «Б» ККМ	опытная «В» ККМ+тималин

M	m	M	m	M	m	M	m	M	m
30,1	1,29	13,4	0,5	20,6	1,1	36,0	2,2	31,8	2,5
t=11.9		-		t=6,0		t=9,6		t=7,2	

M – среднее арифметическое, m – ошибка среднеквадратичного отклонения, t – критическое значение коэффициента Стьюдента (при n=10 составляет 2,2).

Из таблицы 5 видно, что введение ТХМ приводило к достоверному снижению количества ядер в контрольной группе по сравнению с интактной.

В опытной группе «В» – комплекс ККМ+тималин, наблюдалось достоверно большее число ядер по сравнению с группой контроля ТХМ. При этом гепатопротекторный эффект комплекса сопоставим с аналогичным эффектом опытных групп «А» – тималин и «Б» – суспензия ККМ.

x90 x800

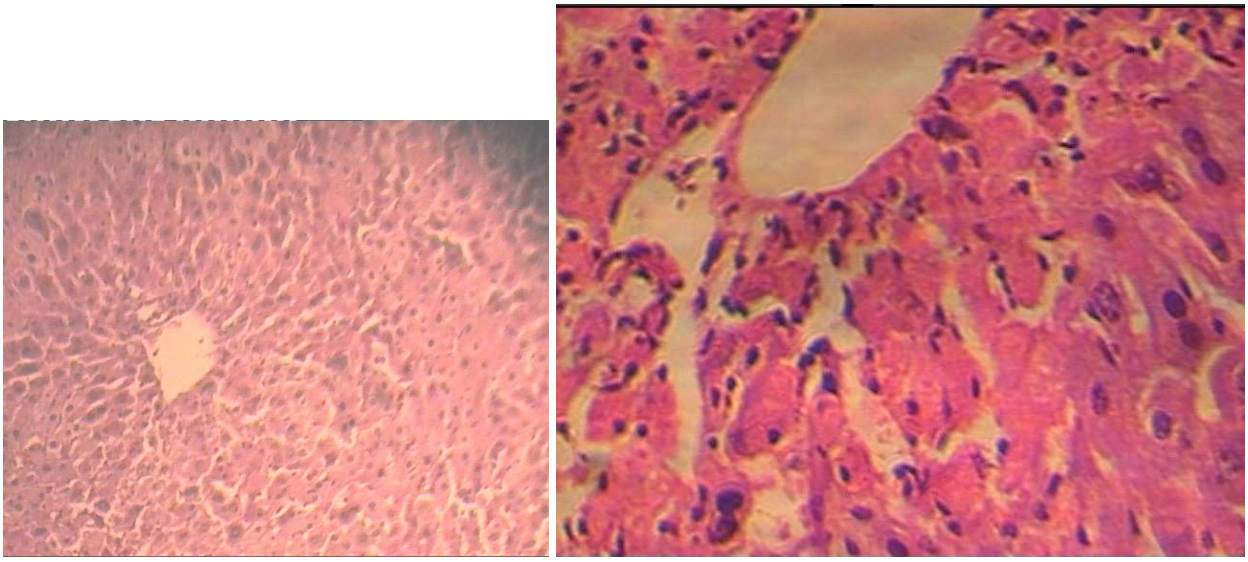

Рисунок 1. Гистологические препараты печени мышей контрольной группы (ТХМ)

x90 x800

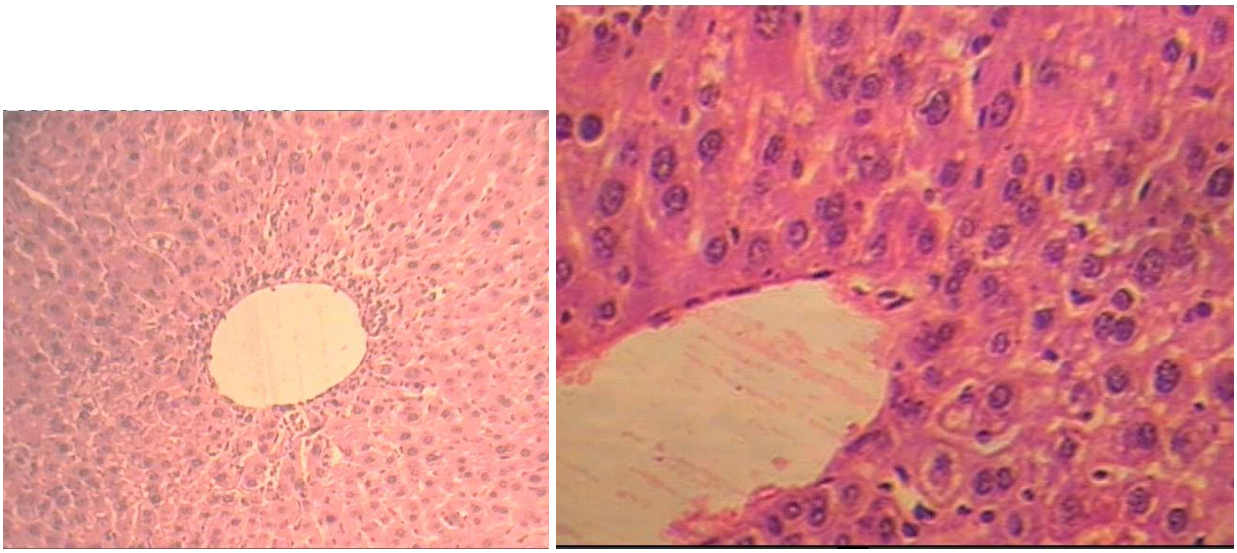

Рисунок 2. Гистологические препараты печени мышей опытной группы «В» (ТХМ +ККМ + тималин)

Из рисунков 1 и 2 видно, что микроструктура печени мышей контрольной группы отравленных ТХМ хуже, чем у мышей опытной группы, получавших при отравлении комплекс «ККМ+тималин». Большее количество ядер гепатоцитов в опытной группе.

Выводы

1. Комбинация ККМ + тималин повышает выживаемость мышей на 80–100 % при остром токсическом поражении печени.
2. Суспензия ККМ мышей и комбинация ККМ + тималин достоверно снижают содержание воды в печени.
3. В опытных группах «А», «Б», «В» на гистологических срезах наблюдалось достоверное увеличение числа ядер по сравнению с контролем.

Заключение

Комплекс «тималин + суспензия ККМ» обладает гепатопротекторной активностью при токсическом поражении печени мышей тетрахлорметаном и является перспективным объектом дальнейшего фармакологического изучения.

Список литературы

1. Гистология: Учебник. 2-е изд. Перераб. и доп. / Под. ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Челышева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – С. 395.

2. Гончарова, Ю. Е. Гепатопротекторное действие тималина и суспензии красного костного мозга, при экспериментальном токсическом гепатите / Ю.Е. Гончарова, Р. С.

Данилов, Е. Ф. Кульбеков // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2008. – Вып. 63. – С. 398-399.

3. Дугин, С. Ф. Исследование роли нейро-гуморальных систем в патогенезе экспериментальной хронической сердечной недостаточности / С. Ф. Дугин [и др.] // Информационный бюллетень РФФИ. – 1994. – Т.2. – №4. – С.292.

4. Кульбеков, Е. Ф. Метод оценки гепатопротекторной активности тималина и суспензии красного костного мозга при остром токсическом поражении печени / Е. Ф. Кульбеков, Ю. Е. Кульбекова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2009. – Вып. 64. – С. 461-463.

5. Цибулевский, А. Ю. Метод контроля токсических поражений печени, основанный на изменении содержания общей воды и магнитно-релаксационных характеристик / А. Ю. Цибулевский, А. И. Сергеев, Т. К. Дубовая // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. – 1995. – № 12. – С. 584-585.

6. http –support-doctor narod ru. – Liver9.htm. Режим доступа: http://support-doctor narod.ru./Liver9.htm. Современные подходы к лечению диффузных заболеваний печени.

Рецензенты:

Ивашев Михаил Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой клинической фармакологии «Пятигорская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пятигорск.

Погорелый Василий Ефимович, доктор биологических наук, профессор кафедры фармакологии и патологии «Пятигорская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пятигорск.