УДК 577.15:615.5

І. М. Алексєєва, М. Г. Касаткіна, Т. М. Бризгіна

ВПЛИВ АНТИГЕПАТОЦИТОТОКСИЧНОЇ СИРОВАТКИ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ПРИ ЇЇ УРАЖЕННІ ЕКЗОГЕННИМИ ЖОВЧНИМИ КИСЛОТАМИ

Показано, що згодовування щурам на протязі 16 діб жовчних кислот (хольової чи дезоксихольової) спричиняє ураження печінки, яке полягає в підвищенні активності лужної фосфатази, аланін-амінотрансферази і аспартат-амінотрансферази в сироватці крові, прискоренні введення бромсульфалеїну з крові, а також у глибоких дистрофічних процесах у печінці, які виявляються гістологічно.

Введення малих доз АГЦС на фоні ураження печінки ЖК спричиняє нормалізуючий вплив на активність ферментів у сироватці, екскреторну функцію за даними бромсульфалеїнової проби, а також посилює процеси регенерації в тканині печінки.

Працями ряду дослідників [13, 19, 20] було показано, що малі дози антигепатоцитотоксичної сироватки (АГЦС) спричиняють стимулюючий вплив на регенераторні процеси в печінці, за даними морфологічних досліджень, при отруєнні чотирихлористим вуглецем, при частковій гепатектомії, при старінні.

На моделі ураження печінки чотирихлористим вуглецем ми в раніше проведених дослідженнях [2—5] показали, що малі дози АГЦС спричиняють стимулюючий і нормалізуючий вплив на різні функції печінки.

Завданням цієї роботи було вивчити можливість стимуляції, відновлення функції і структури печінки з допомогою малих доз АГЦС при ураженні печінки жовчними кислотами. Ця модель ураження наближує стан печінки до клінічної форми патології, яка супроводжується холемією [12, 18].

Про функціональний стан печінки ми судили на підставі даних бромсульфолеїнової проби, активності ферментів лужної фосфатази (ЛФ), аланін-амінотрансферази (АЛТ) і аспартат-амінотрансферази (АСТ) в сироватці крові, а також за даними морфологічних досліджень.

Методика досліджень

Модель ураження печінки жовчними кислотами у щурів створювали додаванням до їжі на протязі 16 днів хольової або дезоксихольової кислоти в кількості 0,8% від ваги їжі. АГЦС вводили щурам триразово, починаючи з четвертого дня згодовування ЖК, внутрівенно, через три дні на четвертий. Доза сироватки була $2{,}5 \cdot 10^{-5}$—$2{,}5 \cdot 10^{-6}$ *мл* на 100 *г* ваги тіла щура при титрі сироватки в реакції зв'язування комплементу 1 : 200. Дослідні тварини (147 щурів) були поділені на чотири групи. Тварини першої групи одержували лише жовчні кислоти, другої групи — жовчні кислоти та АГЦС, третю групу складали тварини, яким вводили лише АГЦС без згодовування жовчних кислот, четверта група була контрольною.

Дослідження ферментів проведено на третю і п'яту добу після введення сироватки (14—16 добу від початку згодовування ЖК). Бромсульфалеїнову пробу та гістологічні дослідження проводили на 3—5—10—20—30 добу після застосування АГЦС (14—16—21—31—41 добу від початку згодовування ЖК).

АГЦС для щурів ми одержували, імунізуючи кроликів водно-сольовим екстрактом печінки щурів. Титр антитіл визначали за реакцією зв'язування комплементу [15]. Бромсульфалеїнову пробу ставили за методикою, описаною Олійником [17] в динаміці на тих самих тваринах. Активність лужної фосфатази (ЛФ, К.Ф.3.1.3) визначали за методом Бессей, Лоурі, Брок [23] і виражали в одиницях Бессей — Лоурі. Активність аланін-амінотрансферази (АЛТ, К.Ф.2.6.1.2) і аспартат-амінотрансферази (АСТ, К.Ф.2.6.1.1.) визначали за методом Рейтмана і Френкеля [24] і виражали в мікромолях піровиноградної кислоти. Для виготовлення оглядових гістологічних препаратів печінку, вилучену у декапітованих тварин, фіксували в 10% розчині формаліну, проводили в спиртах висхідної міцності, потім через рицинову олію з послідуючою заливкою в парафін. Зрізи товщиною 6 *мк* забарвлювали гематоксилін-еозином. Статистична обробка матеріалу проведена із застосуванням критерію Стьюдента [8, 16].

Результати досліджень та їх обговорення

Дані активності ферментів ЛФ, АЛТ і АСТ у сироватці крові щурів з ураженням печінки жовчними кислотами і у інтактних тварин після введення їм малих доз АГЦС наведені в табл. 1, з якої видно, що при ураженні печінки жовчними кислотами спостерігаються зміни активності ферментів у сироватці. Застосування АГЦС на фоні ураження печінки ЖК істотно впливає на характер і ступінь цих змін.

Таблиця 1

Активність ферментів ЛФ, АЛТ і АСТ в сироватці крові у щурів з ураженням печінки жовчними кислотами і у інтактних щурів після введення їм малих доз АГЦС

Ферменти	Статистичні показники	14 доба згодовування ЖК—3 доба після АГЦС			16 доба згодовування—ЖК—5 доба після АГЦС			Контроль
		ЖК	ЖК+АГЦС	АГЦС	ЖК	ЖК+АГЦС	АГЦС	
		1 група	2 група	3 група	1 група	2 група	3 група	4 група
		1	2	3	4	5	6	7
ЛФ	n	11	11	9	9	9	7	20
	M	18,3	13,0	11,2	21,9	13,0	9,5	10,6
	$\pm m$	1,7	1,5	1,7	3,5	1,7	1,3	0,6
	t	2,3	0,960	0,330	3,181	1,333	0,79	
	$p_к$	$<0,05$	$>0,2$	$>0,5$	$<0,01$	$>0,1$	$>0,2$	
АЛТ	n	11	9	9	9	9	7	20
	M	1,2	2,6	0,9	1,5	1,8	0,9	0,7
	$\pm m$	0,17	0,69	0,18	0,46	0,80	0,31	0,06
	t	2,77	1,97	1,05	1,74	0,33	0,64	
		(1—7)	(2—1)	(3—7)	(4—7)	(5—4)	(6—7)	
	$p_к$	$<0,01$	$<0,05$	$>0,1$	$>0,05$	$>0,5$	$>0,5$	
АСТ	n	11	9	9	9	9	7	20
	M	1,5	1,9	1,3	1,9	1,6	1,3	1,3
	$\pm m$	0,09	0,20	0,15	0,26	0,17	0,01	0,07
	t	1,75	2,86		2,22	1,63		
	$p_к$	$>0,05$	$<0,01$	$>0,5$	$<0,05$	$>0,1$	$>0,5$	

Так, згодовування щурам жовчних кислот викликає збільшення активності лужної фосфатази в сироватці крові. На 14—16 добу згодовування її активність становить у середньому 188% від контрольного рівня. Різниця в обидва строки статистично достовірна. Введення АГЦС на фоні ураження печінки ЖК запобігає збільшенню активності ЛФ. На 14 і 16 добу згодовування ЖК (третю і п'яту добу після введення АГЦС) її активність істотно не відрізняється від контролю ($p>0,2$; $p>0,1$, відповідно) і становить за середніми даними 123% від контрольного рівня.

У тварин з ураженням печінки збільшується активність АЛТ і АСТ в сироватці крові. На 14—16 добу згодовування ЖК активність АЛТ становить у середньому 189% від рівня в контролі, активність АСТ — 130%. Збільшення це статистично достовірне, або наближується до такого.

Введення АГЦС на фоні ураження печінки ЖК дещо збільшує активність АЛТ і АСТ в сироватці на третю добу в порівнянні з одним лише згодовуванням жовчних кислот. Ступінь збільшення має індивідуальні коливання. Так, щодо активності АЛТ, коливання збільшення перебувають у межах від 8 до 575%. Збільшення активності АСТ має більш рівномірний характер і становить у середньому 27%.

На п'яту добу після введення АГЦС активність АЛТ стає нижчою, ніж на третю добу і не перевищує активності у тварин з ураженням печінки ЖК без введення АГЦС, але контрольного рівня не досягає. Активність АСТ в сироватці підвищується більшою мірою, стає нижчою, ніж у цей строк у тварин, яким лише згодовували ЖК, і практично не відрізняється від контрольного рівня.

Введення малих доз АГЦС інтактним щурам на відміну від введення тваринам з ураженням печінки, не викликає істотних змін активності ЛФ, АЛТ і АСТ у сироватці.

В табл. 2 наведені результати бромсульфалеїнової проби у щурів з ураженням печінки жовчними кислотами і у інтактних тварин після введення їм малих доз АГЦС.

Згодовування щурам жовчних кислот (як хольової, так і дезоксихольової) змінює екскреторну функцію печінки в бік прискорення виве-

Таблиця 2

Бромсульфалеїнова проба у щурів з ураженням печінки жовчними кислотами і у інтактних щурів після введення їм малих доз АГЦС

Група тварин	Статистичні показники	Доба від початку згодовування ЖК				
		14	16	21	31	41
		Доба після закінчення згодовування ЖК				
				5	15	25
		Доба після закінчення введення АГЦС				
		3	5	10	20	30
Згодовування ЖК	n	17	16	13	6	8
	M	26,9	20,9	26,7	33,9	36,0
	$\pm m$	1,7	2,0	2,5	3,4	3,0
	$p_к$	<0,001	<0,001	<0,01	>0,2	>0,5
Згодовування ЖК+АГЦС	n	17	18	14	10	7
	M	35,5	29,1	38,4	36,0	39,6
	$\pm m$	2,8	2,8	2,1	4,0	4,7
	$p_{жк}$	<0,01	<0,02	<0,001	>0,5	>0,5
	$p_к$	<0,05	<0,05	>0,5	>0,5	>0,5
АГЦС інтактним тваринам	n	9	12	12	11	9
	M	48,8	36,5	42,5	39,7	41,1
	$\pm m$	4,4	2,9	3,2	3,3	1,5
	$p_к$	>0,2	>0,5	>0,2	>0,5	>0,5
Контроль	n	24	13	13	11	5
	M	43,2	39,3	39,5	37,7	39,5
	$\pm m$	1,9	3,6	3,1	2,7	5,9

дення бромсульфалеїну з крові. Це добре виражено на 14—16—21 добу згодовування. Затримка бромсульфалеїну в крові в ці строки становить 62, 53, 68% від контрольного рівня. Нормалізація екскреторної функції відбувається на 15 добу після припинення згодовування ЖК.

В групі тварин, яким на фоні ураження печінки вводили АГЦС, спостерігалася менш виражена зміна екскреторної функції, і нормалізація її відбувалася швидше. Так, на 14—16 добу згодовування АГЦС затримка бромсульфалеїну в крові становила 82—74% від контрольного рівня. Відновлення екскреторної функції, за даними бромсульфалеїнової проби, спостерігалося на п'яту добу після припинення згодовування ЖК (десята доба після введення АГЦС). Введення малих доз інтактним тваринам істотно не впливало на екскреторну функцію печінки.

Морфологічні зміни печінки після згодовування жовчних кислот (як хольової, так і дезоксихольової) свідчать про глибокі дистрофічні зміни. Це різко виражені ознаки білкової і жирової дистрофії, некроз значної кількості гепатоцитів, дискомплексація брилок. Ці зміни найбільш виражені в останні дні застосування ЖК (14—16 доба) і на п'яту добу після припинення згодовування. В більш віддалені строки (15—25 доба після припинення згодовування ЖК) дистрофічні зміни менш виражені, водночас спостерігається інтенсивна регенерація паренхіми печінки: збільшуються ядра багатьох гепатоцитів, з'являється більше двоядерних клітин, відновлюються тинкторіальні властивості більшості печінкових клітин.

В групі тварин, яким на фоні ураження печінки ЖК вводили АГЦС, в ранні строки (третя — п'ята доба після введення сироватки, 14—16 доба згодовування ЖК) також відзначаються дистрофічні зміни. Але вже в ці ранні строки у тварин цієї групи (на відміну від тварин, яким на фоні ураження печінки ЖК АГЦС не вводили) спостерігаються ознаки відновних процесів, особливо в центральних відділах часток. Гепатоцити навколо центральних вен чітко групуються в брилки, цитоплазма їх стає помірно базофільною, з незначними ознаками білкової дистрофії. Відзначається більш значне розширення розмірів ядер. Трапляється більше двоядерних клітин. У віддалені строки (15—25 доба після припинення згодовування ЖК) дистрофічні зміни в клітинах значно менше виражені, спостерігаються ознаки регенерації паренхіми майже в такій же мірі, як у тварин, які одержували лише жовчні кислоти.

При введенні малих доз АГЦС інтактним тваринам не відзначено істотних змін морфологічної структури печінки.

Підсумовуючи всі одержані дані, можна сказати, що згодовування щурам жовчних кислот на протязі 16 діб приводить до ураження печінки. Це ураження характеризується підвищенням активності ферментів лужної фосфатази, аланін-амінотрансферази і аспартат-амінотрансферази в сироватці крові, зміною екскреторної функції печінки за даними бромсульфалеїнової проби, глибокими дистрофічними змінами в клітинах печінки.

Підвищення активності АЛТ, АСТ, ЛФ в сироватці є однією з ознак ураження печінки і широко застосовується як діагностичний тест. Лужна фосфатаза є мембранним ферментом клітин. Посилення її активності в крові при холеміях пов'язують з ушкоджуючим впливом жовчних кислот на мембрани клітин [9, 10]. Підвищення активності ЛФ в сироватці, за даними Громашевської [11] та інших авторів [14], є ознакою ураження печінки при холестазі. Аланін-амінотрансфераза — цитоплазматичний фермент клітини, аспартат-амінотрансфераза локалізується частково в цитоплазмі, частково в мітохондріях клітини. Підвищення їх активності в сироватці крові значною мірою пов'язане з порушенням про-

никності клітинних мембран і цілісності печінкових клітин [25, 26]. Зміни активності ЛФ, АЛТ і АСТ в сироватці крові відображають також порушення обмінних процесів у клітинах печінки [6, 10]. В наших дослідах підвищення активності цих ферментів в крові збігається з дистрофічними і некробіотичними процесами в печінці, які виявляються гістологічно. Стимуляцію екскреторної функції печінки, спостережувану при ураженні печінки жовчними кислотами, можна розглядати як компенсаторне явище, проте зміна цієї функції також свідчить про відхилення від норми діяльності клітин печінки.

Введення малих доз АГЦС на фоні ураження печінки жовчними кислотами спричиняє істотний нормалізуючий вплив на функцію і структуру печінки. Це виявилось у наших дослідах в нормалізації активності лужної фосфатази і аспартат-амінотрансферази в сироватці крові, в тенденції до нормалізації активності аланін-амінотрансферази, в меншій зміні і в скорішому відновленні екскреторної функції за даними бромсульфалеїнової проби, в посиленні регенераторних процесів у печінці. Деяке підвищення активності АЛТ і АСТ в сироватці крові на третю добу після введення АГЦС щурам на фоні ураження печінки жовчними кислотами можна пояснити механізмом дії цитотоксичних сироваток, в основі якого лежить первинне незначне пошкодження клітин органа в результати реакції антиген—антитіло, яке спричиняє реактивацію обмінних процесів у клітинах з наступним відновленням і стимуляцією їх функцію [7].

АГЦС у малих дозах при введенні інтактним тваринам в наших дослідах не викликала істотних змін активності ферментів у сироватці, екскреторної функції, за даними бромсульфалеїнової проби, гістологічної картини печінки. Ці дані відповідають результатам, одержаним щодо іншої цитотоксичної сироватки — антиретикулярної цитотоксичної сироватки — АЦС [1, 21]. Спасокукоцький [21] відзначає, що стан вихідної реактивності органа, тканини, клітини визначає значною мірою ефект стимулюючих доз цитотоксичних сироваток. Більш виражений вплив сироватки на ушкоджений орган може бути пов'язаний з більшою чутливістю уражених клітин до дії незначної кількості антитіл, які містяться в малих дозах застосованих сироваток. Є дані про те, що на мембранах ушкоджених клітин адсорбція речовин відбувається більш інтенсивно [22]. Можливо також, що стимулюючий вплив цитотоксичних сироваток виявляється краще в тих умовах, коли є основа для розвитку регенераторного процесу. Будь-яке ураження клітин супроводжується дистрофічними або некротичними процесами, які створюють основу для регенерації.

Література

1. Алексеева И. Н. Возрастные особенности изменений белкового состава сыворотки крови и печени у животных под влиянием введения малых доз АЦС.— В кн.: Вопросы экспериментальной и клинической геронтологии. К., 1968, с. 50—52.
2. Алексеева И. Н., Галенко Т. И. Восстановление функций печени, нарушенных действием четыреххлористого углерода, путем применения малых доз антигепатоцитотоксической сыворотки (АГЦС).— В кн.: Матер. IV Укр. конф. патофизиологов, Ивано-Франковск, 1972.
3. Алексеева И. Н. Влияние антигепатоцитотоксической сыворотки на экскреторную функцию печени.— Патол. физиол. и экспер. терапия, 1973 а, № 2, с. 72—74.
4. Алексєєва І. М. Зміни вмісту білка і активність трансаміназ у печінці і сироватці крові щурів при введенні малих доз антигепатоцитотоксичної сироватки на фоні гострого ураження печінки чотирихлористим вуглецем.— Укр. біохім. журн., 1973 б, № 3, с. 254—257.
5. Алексєєва І. М. Жовчовидільна функція печінки в умовах застосування великих і малих доз антигепатоцитотоксичної сироватки.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1974, № 5, с. 602—607.

6. Блюгер А. Ф. К механизму гиперферментемии при патологических процессах.— В кн.: I Всесоюзн. биохим. съезд, 1964. Тез. докл., в. I, Симпозиум I—XV, с. 164—165.
7. Богомолец А. А. Специфическая цитотоксическая стимуляция и блокада клеточных функций.— Мед. журн. АН УССР, 1935, т. 4, в. 3—4, с. 447—456.
8. Венчиков А. И., Венчиков В. А. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. М., Медицина, 1974.
9. Ганіткевич Я. В. Нові аспекти фізіології жовчовиділення. Фізіол. журн. АН УРСР, 1975, № 5, с. 690—697.
10. Громашевская Л. Л. Теоретические и практические вопросы ферментной диагностики болезней печени на современном этапе.— В кн.: Ферменты в медицине, пищевой промышл. и сельском хоз., К., «Наукова думка», 1968, с. 32—37.
11. Громашевская Л. Л. Основные принципы ферментодиагностики патологических процессов.— Лаб. дело, 1975, № 6, 323—329.
12. Киселева А. Ф., Громашевская Л. Л., Постовит В. А. Гистохимические изменения в печени, почках и сердце при экспериментальной холемии.—Врач. дело, 1968, 4, 8—12.
13. Король С. А., Родионов Г. А. Данные гистоморфологического изучения печени у крыс разного возраста при сочетанном воздействии четыреххлористого углерода и гепатоцитотоксической сыворотки.— Патол. физиол. экспер. терап., 1965, № 2, с. 54—59.
14. Малаховский Ю. Е., Лихачев А. А. Дискуссионные вопросы классификации хронического гепатита.— Сов. медицина, 1975, № 5, с. 92—96.
15. Марчук П. Д. О методике изготовления и применения антиретикулярной цитотоксической сыворотки и способах ее хранения.— В кн.: Физиол. система соед. ткани, К., Изд-во АН УССР, 1941, с. 329—339.
16. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований.— Патол. физиол. и экспер. терапия. 1960, № 4, с. 76—84.
17. Олейник Б. В. Методика оценки функции печени у крыс бромсульфалеиновым методом.— В кн.: Вопросы эндокринологии и обмена веществ, 1970, в. 1, с. 108—111.
18. Постовит В. А. Роль холемии в патогенезе инфекционного гепатита. Автореф. дис., Рига, 1969.
19. Родионов Г. А., Король С. А. Некоторые данные о влиянии гепатоцитотоксической сыворотки на репаративную регенерацию печени у белых крыс.—В кн.: Цитотоксины в совр. медицине. К., «Здоров'я», 1966, т. 3, с. 47—55.
20. Скуба Н. Д., Зайченко А. П., Охременко А. М. Физиологическая регенерация печени в условиях воздействия органоспецифическими сыворотками в возрастном аспекте.— В кн.: Возрастные морфологические и функциональные особенности внутренних органов. К., «Здоров'я», 1967, с. 63—64.
21. Спасокукоцкий Ю. А. Экспериментальное обоснование применения биологически активных веществ в гериатрии.— В кн.: Борьба с преждевременным старением. К., «Наукова думка», 1968, с. 13—23.
22. Цитология ферментов. (Пер. с англ. под ред. А. А. Покровского). М., «Мир», 1971.
23. Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeteres of serum.—J. Biol. Chem., 164, 321 (1946).
24. Reitman S. A colorimetric method for the S. Frankel determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvis transaminases.— Am. J. Clin. Path., 1957, 28, 1, 56—63.
25. Sommerville R. L. et al. Transaminases in hepatic tissue and serum in hepatic disease.— Gastroenterology, 1960, 38, 6, 926—936.
26. Wroblewski F., La Due J. S. Serum Glutamic Pyrvic Transaminase in Cardiac and Hepatic Disease.— Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91, 569.

Відділ імунології та цитотоксичних сироваток
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ;
Лабораторія біохімії Київського інституту
інфекційних хвороб

Надійшла до редакції
2.III 1976 р.

I. N. ALEKSEEVA, M. G. KASATKINA, T. M. BRYZGINA

EFFECT OF ANTIHEPATOCYTOTOXIC SERUM SMALL DOSES ON LIVER WHEN IT IS AFFECTED WITH BILE ACIDS

Summary

Feeding of bile acids (cholic and deoxycholic) to rats for 16 days results in affection of the liver which is characterized by an increase in the activity of alkaline phosphatase, alanine-aminotransferase and aspartat-aminotransferase in blood serum as well as by acceleration of bromsulphalein evacuation from blood and deep dystrophic changes detected histologically. Administration of the antihepatocytotoxic serum in small doses ($2.5 \cdot 10^{-5}$—$2.5 \cdot 10^{-6}$ ml/100 g with a titre in CFT 1 : 200) against a background of the liver affection with bile acids produces a normalizing effect on the activity of enzymes in blood serum, excretory function of the liver as well as the regeneration processes in the liver tissue as well.

Department of Immunology and Cytotoxic Sera,
the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev;
Laboratory of Biochemistry,
Institute of Infectious Diseases, Kiev