

Е. Б. Белоновская¹, Е. Е. Нарута¹, О. Я. Лукивская¹, О. А. Казючиц², В. У. Буко¹

¹Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

²Республиканское производственное унитарное предприятие «АКАДЕМФАРМ»,
Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ И ПЕНТОКСИФИЛЛИНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Аннотация. Фиброз печени является типичным ответом на хроническое воспаление печеночной ткани вследствие различных заболеваний. Фиброз – это динамический процесс, приводящий к тяжелым осложнениям: развитию цирроза, гепатоцеллюлярной карциноме, печеночной недостаточности. Учитывая социальную значимость проблемы, поиск новых, более эффективных препаратов, обладающих гепатозащитным и антифибротическим действием при фиброзе печени, является актуальной задачей.

Целью исследования было изучение влияния готовой лекарственной формы (ГЛФ) на основе комбинации урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) и пентоксифиллина (ПТФ) на развитие CCl₄-индуцированного фиброза печени у крыс. Установлено, что введение ГЛФ в дозах, эквивалентных 40 и 80 мг/кг УДХК, в условиях токсического воздействия сопровождалось ослаблением активности маркерных ферментов, общего и связанного билирубина, снижением содержания оксипролина в печени, коллагена III, ламинина и TNF- α по сравнению с аналогичными показателями у крыс опытной группы, не получавших препараты, а также способствовало снижению уровня гиалуроновой кислоты, проколлагена III и TGF- β_1 , причем действие высокой дозы ГЛФ, в отличие от малой, было более выраженным.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГЛФ обладает достаточно высоким терапевтическим потенциалом, проявляя противофиброзное, противовоспалительное и гепатопротективное действие в условиях токсического фиброза печени.

Ключевые слова: фиброз, печень, урсодезоксихолевая кислота, пентоксифиллин, комбинация, цитокины, крысы

Для цитирования: Влияние комбинации урсодезоксихолевой кислоты и пентоксифиллина на течение экспериментального фиброза печени / Е. Б. Белоновская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 31–40.

Е. В. Belonovskaya¹, Е. Е. Naruta¹, О. Я. Lukivskaya¹, О. А. Kazyuchits², V. U. Buko¹

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus

²State Enterprise "ACADEMPHARM", Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF THE COMBINATION OF URSODEOXYCHOLIC ACID AND PENTOXYPHILLINE ON EXPERIMENTAL LIVER FIBROSIS

Abstract. Hepatic fibrosis is a common result of different chronic liver diseases. Fibrosis is a dynamic process which can progress to complication, including cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and liver failure. Considering the significance of problem, the search for a new effective substance with hepatoprotective and antifibrotic effects on liver fibrosis is an actual task.

The aim of the study was to investigate the influence of fixed-dose combination (FDC) containing ursodeoxycholic acid (UDCA) 350 mg and pentoxifylline (PTX) 150 mg on the development of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in rats. The obtained results showed that FDC effectively reduced elevated serum markers enzyme activities, the hepatic hydroxyproline content, decreased levels of proinflammatory and profibrogenic cytokines. The histopathological analysis showed that FDC alleviated the severity of liver fibrosis induced by CCl₄. A high dose of FDC had the most positive effect.

Thus, the obtained results suggested that FDC has a sufficiently high therapeutic potential, demonstrating antifibrotic, antiinflammatory and hepatoprotective activities on experimental liver fibrosis.

Keywords: fibrosis, liver, ursodeoxycholic acid, pentoxifylline, combination, cytokines, rats

For citation: Belonovskaya E. V., Naruta E. E., Lukivskaya O. Y., Kazyuchits O. A., Buko V. U. Influence of the combination of ursodeoxycholic acid and pentoxifylline on experimental liver fibrosis. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 31–40 (in Russian).

Введение. Фиброз печени является типичным ответом на хроническое воспаление печеночной ткани вследствие различных заболеваний и характеризуется разрастанием соединительной (фиброзной) ткани в органе с нарушением микроциркуляции. Наиболее частыми причинами его развития являются вирусные гепатиты, алкогольный и неалкогольный стеатогепатиты, токсические гепатиты, иммунные и эндокринные заболевания [1–3]. На сегодняшний день фиброз и цирроз печени занимают лидирующие позиции среди причин инвалидности и смертности населения во всем мире. По данным ВОЗ, в Европе цирроз печени обуславливает 1,8 % всех случаев смерти (около 170 тыс. случаев смерти ежегодно) [4]. В Беларуси показатель смертности от цирроза печени в 2014 г. составил 16,0 на 100 тыс. населения [5]. Согласно проведенным исследованиям, показатель заболеваемости циррозом печени, являющимся одной из шести наиболее распространенных причин смерти среди лиц трудоспособного возраста в экономически развитых странах [6], будет расти за счет увеличения заболеваемости неалкогольным стеатогепатитом и вирусным гепатитом С.

При фиброзе печени наблюдается нарушение динамического равновесия между процессами фиброгенеза и фибролиза в сторону усиления продукции и накопления внеклеточного матрикса (ВКМ), снижения деградации его элементов. Центральное место в процессе фиброгенеза принадлежит активации основных эффекторных клеток (в первую очередь звездчатых клеток печени (ЗКП)) и трансформации их в миофибробластоподобные клетки. Именно эти клетки являются главными продуцентами внеклеточных матриксных компонентов (коллагена I, III, IV, фибронектина, гиалуроновой кислоты) в поврежденной печени. В результате воздействия этиологических факторов и повреждения гепатоцитов выделяется большое количество провоспалительных цитокинов, являющихся взаимными индукторами: фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкин-6 (ИЛ-6), эндотелин-1, тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [7]. Важная роль в формировании фиброза печени принадлежит ключевому профиброгенному цитокину – трансформирующему фактору роста β_1 (TGF- β_1), обладающему выраженным паракринным/аутокринным действием на ЗКП и стимулирующим синтез ВКМ. Установлена тесная взаимосвязь между прогрессированием фиброза печени и ангиогенезом [8]. Развитие фиброза приводит к гипоксии печеночной ткани, что служит пусковым механизмом для новообразования сосудов. Кроме того, фиброз печени, являясь процессом динамическим, вызывает тяжелые осложнения: развитие цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы, печеночной недостаточности [9].

Учитывая социальную значимость проблемы, поиск новых эффективных препаратов, обладающих гепатозащитным и противofiброзным действием при фиброзе печени, является актуальной задачей. Научные достижения последних лет свидетельствуют, что фиброз печени может иметь обратимый характер [10–12], а, следовательно, эффективная антифибротическая терапия сможет обеспечить благоприятный прогноз уже при развившемся патологическом процессе. В качестве таких препаратов используют агенты, ингибирующие активацию ЗКП и их эффекты (антиоксиданты, антагонисты эндотелин-рецепторов, ингибиторы TGF- β_1 , TNF- α , ангиотензин-превращающий фермент [13]), устраняющие воспалительные и иммунные нарушения (глюкокортикоиды, интерфероны, синтетические аналоги нуклеозидов), донаторы оксида азота, агонисты рецепторов, активизирующих пролиферацию пероксисом, препараты растительного происхождения. Среди них значимое место занимают препараты урсодезоксихолевой кислоты (УДХК). Ее с успехом применяют для лечения первичного билиарного цирроза печени [14, 15], склерозирующего холангита, стеатогепатитов различной этиологии [16–18]. Однако ни один из препаратов, назначаемый в качестве монотерапии, не соответствует требованиям «идеального».

В настоящее время предпочтение в лечении фиброза печени отдается комбинированной терапии с использованием нескольких агентов (как правило, принадлежащих к различным группам), которые активно воздействуют на различные звенья патогенеза, препятствуя развитию патологического процесса. В последнее время в качестве перспективного гепатопротективного и противofiброзного препарата, вызывающего интерес, рассматривается пентоксифиллин (ПТФ). На протяжении многих лет ПТФ применяется для улучшения микроциркуляции и реологических свойств крови [19, 20]. Недавние экспериментальные исследования показали, что ПТФ обладает противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [21], уменьшает синтез

провоспалительных цитокинов, в первую очередь ФНО- α [22, 23], а также проявляет противомышечный эффект, подавляя выработку промиоцитарных цитокинов (TGF- β , IFN- γ) и экспрессию коллагена I [24].

Цель настоящего исследования – изучить влияние готовой лекарственной формы на основе комбинации урсодезоксихолевой кислоты и пентоксифиллина на развитие экспериментального токсического фиброза печени у крыс.

Материалы и методы исследования. Исследование проводили на белых крысах-самцах с исходной массой 230–250 г. Животные содержались на стандартном рационе вивария и получали полноценный корм и воду без ограничений. Эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также с требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 г. и правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях» от 18.03.1986 г. и ТКП 125–2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденный постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь (№ 56 от 28.03.2008 г.).

Фиброз печени вызывали путем внутрижелудочного введения 20 %-ного раствора CCl_4 (на вазелиновом масле) из расчета 0,2 мл на 100 г массы тела животного, 3 раза в неделю в течение 6 недель. ГЛФ представляла собой композицию, содержащую 350 мг УДХК, 150 мг ПТФ и вспомогательные вещества до общей массы ядра таблетки 1 г (разработан и изготовлен на ГП «АКАДЕМ-ФАРМ»). Все животные, участвующие в эксперименте, были разделены на 4 группы (по 8 особей в каждой): группа 1 (контрольная) – крысы, получавшие вазелиновое масло; группа 2 – животные с CCl_4 -индуцированным поражением печени без введения препаратов; группы 3, 4 – животные, получавшие ГЛФ в дозах, эквивалентных 40 и 80 мг/кг УДХК в перерасчете на 1 кг массы животного на фоне интоксикации CCl_4 . Начиная с 4-й недели опыта и до конца эксперимента ежедневно интрагастрально вводили ГЛФ в виде суспензии в 0,8 %-ной гипомеллозе. Спустя 6 недель от начала эксперимента животных подвергали декапитации под эфирным наркозом. Материалом для исследования являлись кровь, взятая натошак из шейной вены, и ткань печени. Забор материала производили в утреннее время с 9 до 10 ч. Сыворотку крови, полученную путем центрифугирования при 3000 об/мин, использовали для определения биохимических показателей.

Для проведения морфологического исследования небольшие фрагменты правой доли печени крыс фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина, приготовленного на 0,07 М фосфатном буфере (рН 7,0). Обезжизнение материала производили в этиловом спирте возрастающей концентрации с последующей заливкой в гистомикс («БиоВитрум», Россия). Срезы толщиной 5 мкм для обзорных исследований грубых морфологических нарушений окрашивали гематоксилином и эозином, а также по сложному многокрасочному методу Маллори, позволяющему специфично окрасить соединительную ткань. Для морфометрической оценки относительной площади соединительной ткани в печени применяли метод полуколичественного компьютерного анализа результатов. Морфометрический анализ проводили согласно общепринятым рекомендациям [25] с использованием программы ImageJ 1.46 (NIH, США). На стандартной площади среза (не менее 15 полей зрения с каждого гистологического среза) измеряли площадь структур, окрашенных в синий цвет, и вычисляли ее процентное отношение к выбранной стандартной площади. Микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов выполняли цифровой фотокамерой Olympus C-5660 (Япония), установленной на микроскоп Olympus CX-41, при увеличении окуляра WNB $\times 10$, 20 и объективов PlanCN $10 \times 0,25$, $40 \times 0,65$.

Активность таких ферментов, как аланин- (АлАТ) и аспаратаминотрансфераза (АсАТ), щелочная фосфатаза (ЩФ) в сыворотке крови, концентрации общего и связанного билирубина измеряли с помощью наборов реактивов фирмы «ООО Анализ Х» (Минск, Беларусь) согласно прилагаемым инструкциям. Содержание оксипролина в печени определяли по методу Jamall [26]. Уровни TNF- α , TGF- β_1 , IFN- γ определяли, используя тест-систему Quantikine (R&D Systems GmbH, Германия), а содержание коллагена-III, проколлагена-III, ламинина, гиалуроновой кислоты – с помощью наборов USCN (Китай).

Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего арифметического (SEM) и проанализированы с расчетом *t*-критерия Стьюдента. Уровень доверительной вероятности $p \leq 0,05$ рассматривали как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. При исследовании морфологической картины печени животных контрольной группы установлено, что структура паренхимы печени у них была типичной для нормального органа и характеризовалась радиально расположенными трабекулами гепатоцитов в печеночных дольках. Внутридольковые синусоиды не расширены (рис. 1, *a*). Портальные тракты интактны, без признаков клеточной инфильтрации. Признаки воспалительной реакции паренхимы печени отсутствовали. Соединительная ткань визуализировалась в области капсулы, триад и у стенки центральной вены долек, что соответствовало ее нормальному положению (рис. 2, *a*). Введение CCl_4 приводило к выраженному нарушению цитоархитектоники органа за счет развития фиброза печеночной ткани. Избыточная пролиферация соединительной ткани наблюдалась в области портальных трактов и центральных вен с образованием порто-портальных и порто-центральных септ, в отдельных случаях отмечалось образование единичных ложных долек (рис. 2, *b*). Портальные тракты были расширены, имели признаки гемосидероза и выраженной пролиферации эпителия желчных протоков. Отмечались дистрофические изменения гепатоцитов в виде выраженной гидропической, средне- и крупновезикулярной жировой дистрофии с локализацией в центролобулярных зонах. Наблюдался выраженный клеточный и ядерный полиморфизм гепатоцитов (частые митозы, двухъядерные и гигантские клетки). Имели место

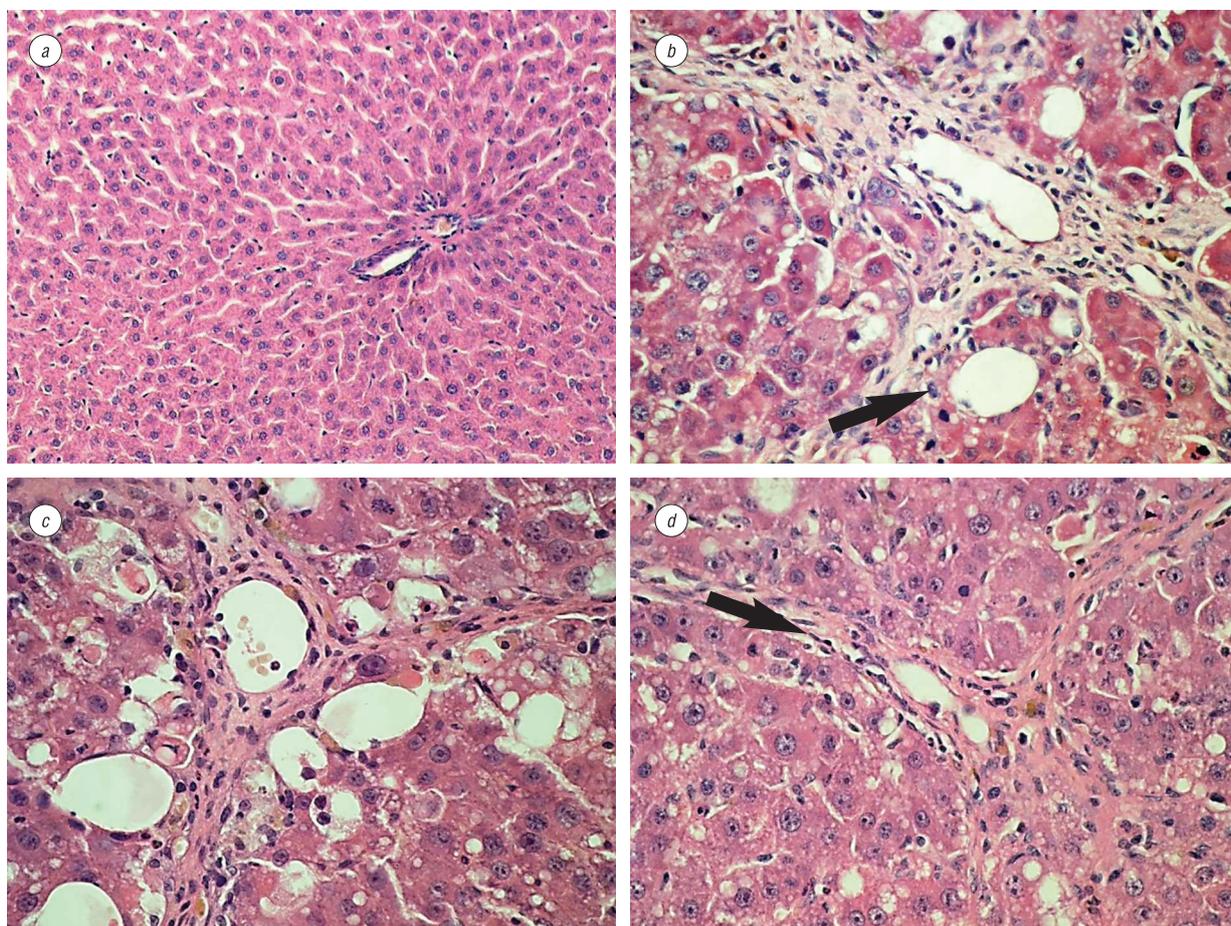


Рис. 1. Гистологическая картина печени крыс контрольной и опытных групп: *a* – нормальное строение печени (контрольная группа); *b* – CCl_4 -индуцированный фиброз печени, разрастание соединительной ткани вокруг портальных трактов, признаки гидропической и жировой дистрофии гепатоцитов (указано стрелкой); *c, d* – дегенерация гепатоцитов и фиброза у животных опытных групп, получавших ГЛФ в дозах 40 (*c*) и 80 (*d*) мг/кг (снижение степени при введении высокой дозы ГЛФ указано стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 1. Histological picture of the rat liver in the control and test groups: *a* – normal structure of liver (control group); *b* – CCl_4 -treated, proliferation of connective tissue around portal triad, signs ballooning and fatty degeneration of hepatocytes (indicated by an arrow); *c, d* – degeneration level of hepatocytes and fibrosis in the groups of animals administrated FDC in a dose of 40 (*c*) and 80 (*d*) mg/kg (a decrease in the degree at administration of a large dose of FDC is indicated by an arrow). Haematoxylin and eosin stain. $\times 400$

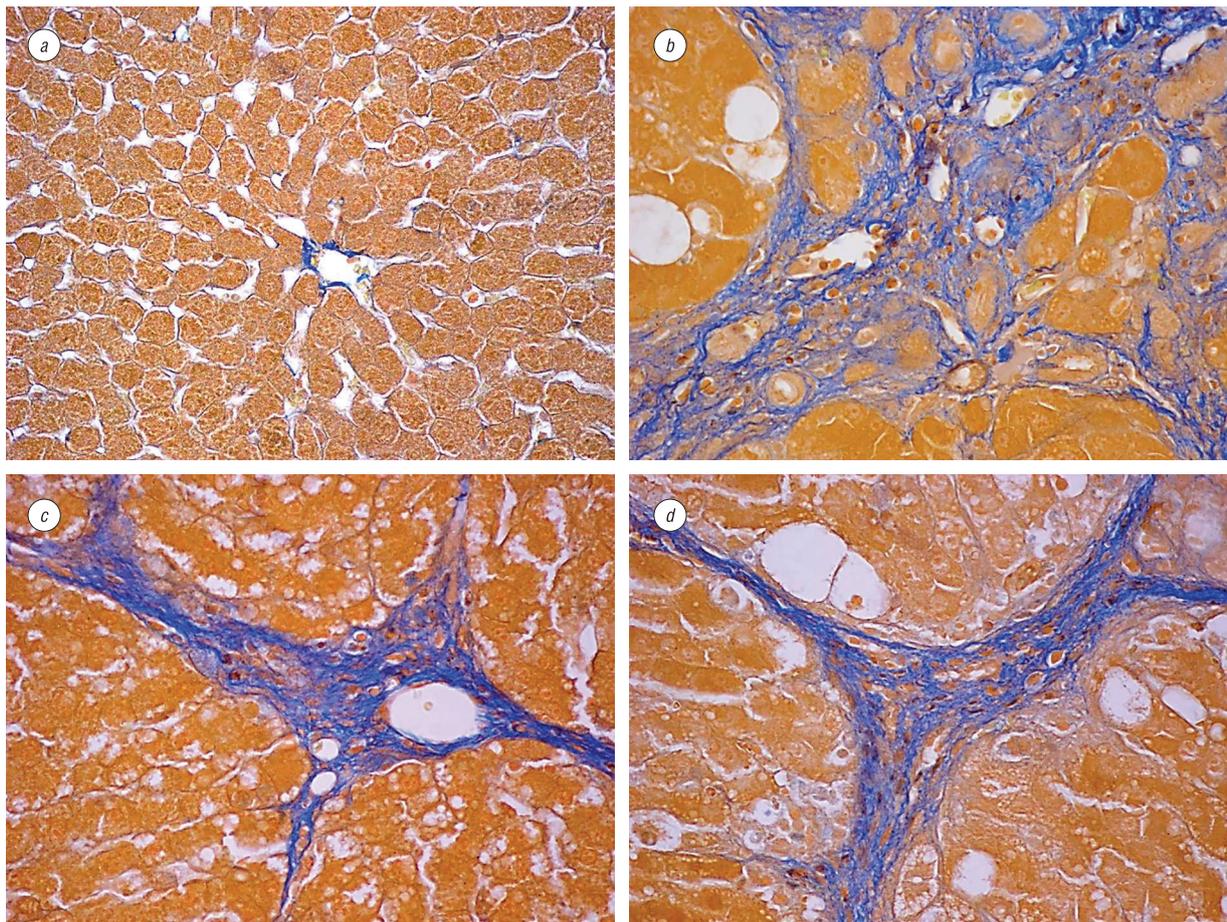


Рис. 2. Разрастание соединительной ткани печени крыс (окрашивание синим цветом на гистологических срезах печени) в контрольной (*a*) и опытных (*b* – при CCl_4 -индуцированном фиброзе печени; *c, d* – при введении ГЛФ в дозах 40 (*c*) и 80 (*d*) мг/кг соответственно) группах. Окраска по методу Маллори. $\times 400$

Fig. 2. Proliferation of a connective tissue of rats (blue color on histological liver sections) in control group (*a*) and (*b* – CCl_4 -induced liver fibrosis; *c, d* – FDC in a dose of 40 (*c*) and 80 (*d*) mg/kg respectively) in test groups. Mallory's stain. $\times 400$

фокальные некрозы гепатоцитов, проявляющиеся наличием дистрофичной гомогенной цитоплазмы и отсутствием ядер. В области портальных трактов и по ходу фиброзных прослоек наблюдалась выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация (см. рис. 1, *b*). На срезах печени, окрашенных по методу Маллори, относительная площадь соединительной ткани в 6 раз превышала контрольные значения и составляла 10,04 % (рис. 3, *a*).

Структурные изменения печени при воздействии токсического агента сопровождалось значительными изменениями биохимических показателей крови. Как видно из данных, представленных в табл. 1, при введении тетрахлорметана отмечалось статистически значимое по сравнению с показателями у контрольных животных, получавших вазелиновое масло, повышение активности маркерных ферментов – АсАТ и АлАТ (на 79 и 126 % соответственно), ЩФ (в 4,5 раза), обусловленное цитолизом гепатоцитов. Также наблюдалось значительное повышение содержания ключевого показателя пигментного обмена – билирубина крови. Содержание общего билирубина в сыворотке крови крыс и его связанной фракции было в 2,5 раза выше, чем в контрольной группе.

Уровень оксипролина в печени животных, получавших CCl_4 , был повышен более чем в 2,7 раза (рис. 3, *b*). При исследовании содержания сывороточных маркеров фиброгенеза выявлено увеличение уровня гиалуроновой кислоты на 59 %, ламинина – на 102, коллагена III и проколлагена III – на 242 и 300 % соответственно. Анализ основных провоспалительных цитокинов сыворотки у животных показал увеличение уровня TNF- α на 113 %, IFN- γ – на 258 %. Содержание в сыворотке крови ключевого медиатора, стимулирующего фиброгенную реакцию ЗКП, TGF- $\beta 1$, увеличилось на 93 % (табл. 2).

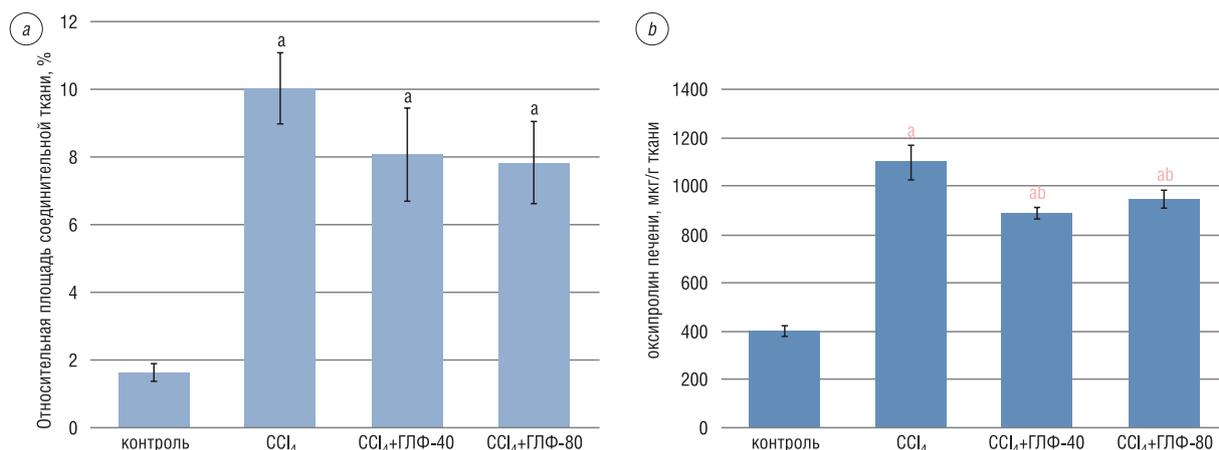


Рис. 3. Показатели относительной площади (%) соединительной ткани (а) и оксипролина (мкг/г ткани) в печени (б) крыс контрольной и опытных групп. Достоверность различий ($p < 0,05$): а – по отношению к контролю; б – по отношению к группе животных с индуцированным фиброзом печени без введения ГЛФ

Fig. 3. Indices of a relative area (%) of connective tissue (a) and hydroxyproline (mg/g tissue) in the rat liver (b) in the control and test groups. Reliability of differences: a – in relation to the control group; b – in relation to the group of liver fibrosis rats without treatment

Т а б л и ц а 1. Биохимические показатели сыворотки крови крыс контрольной и опытных групп (M±SD)
T a b l e 1. Biochemical parameters of blood serum of rats in the control and test groups (M±SD)

Показатель	Контроль	CCl ₄	CCl ₄ + ГЛФ-40	CCl ₄ + ГЛФ-80
АсАТ, Е/л	98,5±7,85	176,1±5,02 ^a	154,7±7,66 ^{ab}	137,2±6,34 ^{ab}
АлАТ, Е/л	53,1±2,89	120,1±2,77 ^a	105,2±3,63 ^{ab}	99,34±3,71 ^{ab}
ЩФ, Е/л	168,2±8,10	758,8±42,34 ^a	605,2±31,00 ^{ab}	575,8±55,61 ^{ab}
Билирубин связ., мкмоль/л	1,79±0,179	4,46±0,313 ^a	3,39±0,372 ^a	2,76±0,210 ^{ab}
Билирубин общ., мкмоль/л	3,86±0,176	9,10±0,837 ^a	7,19±0,647 ^a	5,37±0,312 ^{ab}

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($p < 0,05$) здесь и в табл. 2: а – по отношению к контролю; б – по отношению к группе животных с индуцированным фиброзом печени без введения ГЛФ.

Т а б л и ц а 2. Содержание маркеров воспаления и фиброгенеза в сыворотке крови крыс контрольной и опытных групп (M±SD)

T a b l e 2. Serum markers of inflammation and liver fibrogenesis of rats in the control and test groups (M±SD)

Показатель	Контроль	CCl ₄	CCl ₄ + ГЛФ-40	CCl ₄ + ГЛФ-80
TNF-α, пг/мл	6,45±9	13,72±0,65 ^a	10,28±0,39 ^{ab}	9,12±0,35 ^{ab}
IFN-γ, пг/мл	33,69±3,06	120,5±19,02 ^a	68,18±8,68 ^{ab}	63,23±10,85 ^{ab}
TGF-β ₁ , нг/мл	55,55±2,78	107,00±5,54 ^a	98,56±3,96 ^a	88,65±5,20 ^{ab}
Гиалуроновая к-та, пг/мл	7,08±0,57	11,26±0,54 ^a	9,57±0,64 ^a	9,35±0,36 ^{ab}
Ламинин, нг/мл	7,62±0,30	15,40±0,71 ^a	13,52±0,82 ^{ab}	10,78±0,58 ^{ab}
Коллаген-III, нг/мл	42,0±3,7	143,5±7,7 ^{ab}	108,9±11,6 ^{ab}	92,8±10,3 ^{ab}
Проколлаген-III, нг/мл	52,44±1,63	157,4±8,7 ^a	136,6±6,7 ^a	125,5±9,4 ^{ab}

При введении ГЛФ в дозах 40 и 80 мг/кг признаки фиброза печени сохранялись. Однако, в отличие от опытной группы, в печени животных, получавших ГЛФ в обеих дозах, явления фиброза были не столь выражены: соединительнотканые септы, отходящие от фиброзированных сосудов, были короткие и слепо заканчивались в паренхиме печени (рис. 2, с, d). У животных обеих групп наблюдалось снижение степени гидропической и жировой дистрофии гепатоцитов. Инфильтрация портальных трактов и прослоек соединительной ткани лимфо-

гистиоцитарными клетками по степени выраженности была аналогична таковой в опытной группе (см. рис. 1, *c, d*). Относительная площадь соединительной ткани составила 8,08 и 7,83 % соответственно (рис. 3, *a*).

Введение ГЛФ в обеих дозах на фоне интоксикации тетрахлорметаном приводило к статистически достоверному уменьшению активности маркерных ферментов (АлАТ, АсАТ, ЩФ), снижению содержания оксипролина в печени (рис. 3, *b*), общего и связанного билирубина (см. табл. 1), коллагена III, ламинина и TNF- α по сравнению с аналогичными показателями крыс опытной группы, не получавших препараты. Установлено, что введение указанных доз ГЛФ способствовало также снижению уровней гиалуроновой кислоты, проколлагена III и TGF- β_1 , причем действие высокой дозы ГЛФ, в отличие от малой, было достоверным и более выраженным (табл. 2).

Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют о том, что введение тетрахлорметана в течение 6 недель вызывает у подопытных животных грубые структурные нарушения, характерные для фиброза печени. Доказательством поражения печени явилось и нарушение функционального состояния гепатоцитов, проявляющееся значительными сдвигами биохимических показателей сыворотки крови. Достоверное повышение содержания оксипролина, основного компонента коллагена, проколлагена III, коллагена I и III, ламинина, гиалуроновой кислоты, указывали на интенсивность синтеза экстрацеллюлярного коллагенового матрикса и снижение деградации его компонентов. Высокие уровни сывороточных цитокинов, IFN- γ , TNF- α , TGF- β_1 свидетельствовали о значительной степени воспалительной активности и фиброгенной реакции ЗКП. Применение ГЛФ, содержащей ПТФ и УДХК в изучаемых дозах, в течение 3 недель на фоне действия гепатотоксина замедляло прогрессирование патологических изменений в печени, снижая активность цитолитических ферментов, уровни основных провоспалительных цитокинов, содержание прямых маркеров фиброгенеза в сыворотке крови.

Доказательством высокой противοфиброзной активности ГЛФ служило уменьшение признаков фиброза печени, а также достоверное снижение уровня оксипролина. Следует отметить, что ГЛФ в дозе 80 мг/кг оказывала более выраженное действие при фиброзе печени, достоверно снижая содержание как основного профиброгенного цитокина, TGF- β_1 , так и некоторых сывороточных маркеров фиброгенеза: гиалуроновой кислоты и проколлагена III. Кроме того, ГЛФ обладала выраженным гепатопротективным действием, снижая активность маркерных цитолитических ферментов и содержание общего и связанного билирубина в сыворотке крови. Гепатопротективный эффект ГЛФ подтверждался гистологически снижением степени гидропической дистрофии гепатоцитов и стеатоза. Обе дозы ГЛФ оказывали противοвоспалительное действие, способствуя снижению содержания в сыворотке крови TNF- α , являющегося основным цитокином, модулирующим процессы воспаления, и IFN- γ , активирующего синтез белков острой фазы воспаления.

Ранее нами установлен противοфиброзный эффект УДХК при фиброзе печени, индуцированном тиоацетамидом [27]. УДХК оказывает цитопротективное действие, связываясь с мембраной гепатоцитов, стабилизируя ее и делая устойчивой к повреждающему действию тетрахлорметана. Исследования *in vitro* показали, что УДХК способна замедлять развитие фиброза печени путем влияния на передачу сигналов TGF- β_1 /Smad в звездчатых клетках [28].

Литературные данные указывают и на противοфиброзный потенциал ПТФ. Наши исследования продемонстрировали положительное действие ПТФ на разрешение тиоацетамидного фиброза печени: введение его в дозе 20 мг/кг массы тела животным с развившимся фиброзом уменьшало количество соединительной ткани и уровень оксипролина в печени за счет повышения экспрессии мРНК интерстициальной коллагеназы MMP-13 [29]. ПТФ, являясь неселективным ингибитором фосфодиэстеразы, ингибирует ключевые сигнальные пути фиброгенеза печени, обладает способностью подавлять выработку TNF- α и образование коллагена [30].

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что комбинированное использование УДХК и ПТФ в виде ГЛФ может быть целесообразным при коррекции фиброза печени не только за счет аддитивности их противοфиброзных свойств, но и в связи с защитой клеток паренхимы печени этими субстанциями и их способностью угнетать воспалительные процессы в печени.

Заключение. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемая ГЛФ на основе УДХК и пентоксициллина обладает достаточно высоким терапевтическим потенциалом, проявляя противомембранное, противовоспалительное и гепатопротективное действие при экспериментальном фиброзе печени, вызванном тетрахлорметаном. Это является одним из оснований для заключения о перспективности применения такой комбинации препаратов в клинической практике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Bataller, R. Liver fibrosis / R. Bataller, D. A. Brenner // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 209–218.
2. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases / T. A. Poynard [et al.] // *J. Hepatol.* – 2003. – Vol. 38. – P. 257–265.
3. Mormone, E. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches / E. Mormone, J. George, N. Nieto // *Chem. Biol. Interac.* – 2011. – Vol. 193, N 3. – P. 225–231.
4. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe / W. A. Zatonsky [et al.] // *Eur. Addict. Res.* – 2010. – Vol. 16, N 4. – P. 193–201.
5. Смертность в Республике Беларусь за 2014–2015 гг. : офиц. стат. сб. за 2014–2015 гг. / Респ. науч.-практ. центр мед. технологий, информатизации, управления и экономики здравоохранения. – Минск : Респ. науч. мед. б-ка, 2016. – 208 с.
6. Ивашкин, В. Т. Лечение осложнений цирроза печени / В. Т. Ивашкин, М. В. Маевская. – М. : Литтерра, 2011. – 64 с.
7. Parsons, C. J. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis / C. J. Parsons, M. Takashima, R. A. Rippe // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – Vol. 22, iss. 1. – P. 79–84.
8. Lemos, Q. T. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis / Q. T. Lemos, Z. A. Andrade // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2010. – Vol. 105, iss. 5. – P. 611–614.
9. Tsochatzis, E. A. Liver cirrhosis / E. A. Tsochatzis, J. Bosch, A. K. Burroughs // *Lancet.* – 2014. – Vol. 383. – P. 1749–1761.
10. Bonis, P. A. Is liver fibrosis reversible? / P. A. Bonis, S. L. Friedman, M. M. Kaplan // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 344. – P. 452–454.
11. Liaw, Y. F. Reversal of cirrhosis: an achievable goal of hepatitis B antiviral therapy / Y. F. Liaw // *J. Hepatol.* – 2013. – Vol. 59. – P. 880–881.
12. Ellis, E. L. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis / E. L. Ellis, D. A. Mann // *J. Hepatol.* – 2012. – Vol. 56, N 5. – P. 1171–1180.
13. Kang, Q. Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells / Q. Kang, A. Chen // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 157, iss. 8. – P. 1354–1367.
14. Hirschfield, G. M. Progress in the genetics of primary biliary cirrhosis / G. M. Hirschfield, P. Invernizzi // *Semin. Liver Dis.* – 2011. – Vol. 31, iss. 2. – P. 147–156.
15. Risk factors and prediction of long-term outcome in primary biliary cirrhosis / H. Ishibashi [et al.] // *Intern. Med.* – 2011. – Vol. 50, iss. 1. – P. 1–10.
16. Эффективность урсодезоксихолевой кислоты в лечении больных холестатической формой алкогольной болезни печени и первичным билиарным циррозом / Е. Н. Широкова [и др.] // *РЖГГК.* – 2007. – № 3. – С. 52–58.
17. High dose ursodeoxycholic acid as a therapy for patients with primary sclerosing cholangitis / D. M. Harnois [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 96. – P. 1558–1562.
18. Xiang, Z. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis / Z. Xiang, Y. P. Chen, K. F. Ma // *BMC Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 13, N 1. – P. 140.
19. Sha, M. The efficacy of pentoxifylline in the treatment of vascular dementia / M. Sha, C. Callahan // *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* – 2003. – Vol. 17, iss. 1. – P. 46–54.
20. Хронические цереброваскулярные расстройства – современные подходы к лечению / П. П. Камчатнов [и др.] // *Рус. мед. журн.* – 2008. – Т. 16, № 6. – С. 358–361.
21. Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis / P. Ocunieff [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 22, iss. 11. – P. 2207–2213.
22. O’Shea, R. S. Alcoholic liver disease / R. S. O’Shea, S. Dasarathy, A. J. McCullough // *J. Hepatol.* – 2010. – Vol. 51, N 1. – P. 307–328.
23. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis / S. K. Satapathy [et al.] // *Am. J. of Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 99, iss. 10. – P. 1946–1952.
24. Rokey, D. C. Antifibrotic therapy in chronic liver disease / D. C. Rokey // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – Vol. 3, N 2. – P. 95–107.
25. Автандилов, Г. Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1980. – 216 с.

26. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis / J.J. Cho [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 118, N 6. – P. 1169–1178.
27. Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis / V.U. Buko [et al.] // *J. Clin. Exp. Hepatol.* – 2014. – Vol. 4, N 4. – P. 293–301.
28. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis / N. Mas [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14, N 7. – P. 1108–1111.
29. Resolution of thioacetamide induced liver fibrosis in rats treated with pentoxifylline / V.U. Buko [et al.] // *J. Hepatol.* – 2007. – Vol. 46, suppl. 1. – S80.
30. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis // C. Raetsch [et al.] // *Gut.* – 2002. – Vol. 50, N 2. – P. 241–247.

References

1. Bataller R., Brenner D. A. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, vol. 115, pp. 209–218. DOI: 10.1172/JCI24282
2. Poynard T. A., Mathurin P., Lai C. L., Guyader D., Poupon R. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology*, 2003, vol. 38, pp. 257–265.
3. Mormone E., George J., Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chemico-Biological Interactions*, 2011, vol. 193, no. 3, pp. 225–231. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/943497>
4. Zatonsky W. A., Sulkovska U., Manczuk M. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. *European Addiction Research Journal*, 2010, vol. 16, no. 4, pp. 193–201. DOI: 1159/000317248
5. *Mortality in Republic of Belarus. An official statistics collection, 2014–2015*. Minsk, Respublikanskaya meditsinskaya nauchnaya biblioteka [Republican Scientific Medical Library], 2016. 208 p. (in Russian).
6. Ivashkin V. T., Maevskaja M. V. *Treatment of liver cirrhosis complications*. Moscow, Litterra Publ., 2011, 64 p. (in Russian).
7. Parsons C. J., Takashima M., Rippe R. A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007, vol. 22, suppl. 1, pp. 79–84. DOI: 10.1111/j.1440–1746.2006.04659.x
8. Lemos Q. T., Andrade Z. A. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, vol. 105, no. 5, pp. 611–614.
9. Tsochatzis E. A., Bosch J., Burroughs A. K. Liver cirrhosis. *Lancet*, 2014, vol. 383, pp. 1749–1761. DOI: 10.1016/S0140–6736(14)60121–5
10. Bonis P. A., Friedman S. L., Kaplan M. M. Is liver fibrosis reversible? *The New England Journal of Medicine*, 2001, vol. 344, pp. 452–454. DOI: 10.1136/gut.46.4.443
11. Liaw Y.F. Reversal of cirrhosis: an achievable goal of hepatitis B antiviral therapy. *Journal of Hepatology*, 2013, vol. 59, pp. 880–881. DOI: <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.268>
12. Ellis E. L., Mann D. A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 2012, vol. 56, no. 5, pp. 1171–1180.
13. Kang Q., Chen A. Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells. *British Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 157, no. 8, pp. 1354–1367. DOI: 10.1111/j.1476–5381.2009.00261.x
14. Hirschfield G. M., Invernizzi P. Progress in the genetics of primary biliary cirrhosis. *Seminars in Liver Disease*, 2011, vol. 31, no. 2, pp. 147–156.
15. Ishibashi H., Komori A., Shimoda S., Ambrosini Y. M., Gershwin M. E., Nakamura M. Risk factors and prediction of long-term outcome in primary biliary cirrhosis. *Internal Medicine*, 2011, vol. 50, no. 1, pp. 1–10.
16. Shirokova E. N., Kuznetcova Ye. L., Mayevskaya M. V. Effective of ursodeoxycholic acid in the treatment of patients with cholestatic form of alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2007, no. 3, pp. 52–58 (in Russian).
17. Harnois D. M., Angulo P., Jorgensen R. A., Larusso N. F., Lindor K. D. High dose ursodeoxycholic acid as a therapy for patients with primary sclerosing cholangitis. *American Journal of Gastroenterology*, 2001, vol. 96, pp. 1558–1562.
18. Xiang Z., Chen Y. P., Ma K. F. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterology*, 2013, vol. 13, no. 1, p. 140. DOI: 10.1186/1471–230X-13-140
19. Sha M., Callahan C. The efficacy of pentoxifylline in the treatment of vascular dementia. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 2003, vol. 17, no. 1, pp. 46–54. DOI: 10.1097/00002093–200301000–00006
20. Kamchatnov P. R., Radysh B., Glushkov K. S., B. Chugunov A. V. Chronic cerebrovascular disorders – modern approaches to treatment. *Russkij medicinskij zhurnal* [Russian Medical Journal], 2008, vol. 16, no. 6, pp. 358–361 (in Russian).
21. Ounieff P., Augustine E., Hicks J., Cornelison T. L., Altemus R. M., Naydich B. G., Ding I., Huser A. K., Abraham E. H., Smith J. J., Coleman N., Gerber L. H. Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, vol. 22, no. 11, pp. 2207–2213.
22. O’Shea R. S., Dasarathy S., McCullough A. J. Alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology*, 2010, vol. 51, no. 1, pp. 307–328. DOI: 10.1002/hep.23258
23. Satapathy S. K., Garg S., Chauhan R., Sakhuja P., Malhotra V., Sharma B. C. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Gastroenterology*, 2004, vol. 99, no. 10, pp. 1946–1952. DOI: 10.1111/j.1440–1746.2006.04756.x

24. Rokey D. C. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2005, vol. 3, no. 2, pp. 95–107.
25. Avtandilov G. G. *Introduction to quantitative pathological morphology*. Moscow, Medicine, 1980. 216 p. (in Russian).
26. Cho J. J., Hocher B., Herbst H., Jia J. D., Ruehl M., Hahn E. G., Riecken E. O., Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology*, 2000, vol. 118, no. 6, pp. 1169–1178. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)70370-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(00)70370-2)
27. Buko V. U., Lukivskaya O. Y., Naruta E. E., Belonovskaya E. B., Tauschel H. D. Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 293–301. DOI: 10.1016/j.jceh.2014.02.001
28. Mas N., Tasci I., Comert B., Ocal R., Mas M. R. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, vol. 14, no. 7, pp. 1108–1111. DOI: 10.3748/wjg.14.1108
29. Buko V. U., Popov Y. V., Lis R. E., Zaks J., Schuppan D., Lukivskaya O. Y. Resolution of thioacetamide induced liver fibrosis in rats treated with pentoxifylline. *Journal of Hepatology*, 2007, vol. 46, suppl. 1, S80.
30. Raetsch C., Jia J. D., Boigk G., Bauer M., Hahn E. G., Riecken E. O., Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary billiary fibrosis. *Gut*, 2002, vol. 50, no. 2, pp. 241–247.

Информация об авторах

Белоновская Елена Брониславовна – науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ms.belonovskaya@yandex.ru.

Нарута Елена Евграфовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: naruta@list.ru.

Лукивская Оксана Ярославовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vu.buko@tut.by.

Казючиц Ольга Александровна – канд. биол. наук. Республиканское производственное унитарное предприятие «Академфарм» (ул. акад. Купревича, 5/3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ifb@academpharm.by.

Бuko Вячеслав Ульянович – д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vu.buko@tut.by.

Information about the authors

Elena B. Belonovskaya – Researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: ms.belonovskaya@yandex.ru.

Elena E. Naruta – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: naruta@list.ru.

Oxana Y. Lukivskaya – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vu.buko@tut.by.

Olga A. Kazyuchits – Ph. D. (Biol.). State Enterprise “ACADEMPHARM” (5/3, Ac. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ifb@academpharm.by.

Vyacheslav U. Buko – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vu.buko@tut.by.