

ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА «ЛАЕННЕК» В ЛЕЧЕНИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ПЕЧЕНИ, СВЯЗАННЫХ С ОТЛОЖЕНИЕМ ЖЕЛЕЗА В ПЕЧЕНИ

О.А. Громова, И.Ю. Торшин, О.Н. Минушкин, Е.А. Диброва, И.М. Каримова, Е.В. Кустова

Ивановская государственная медицинская академия МЗ РФ, Иваново
Российский спутниковый центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, Москва

Приведен уникальный опыт клинического использования препарата «Лаеннек» для элиминации избыточных отложений железа в ткани печени. В статье впервые сформулированы молекулярные механизмы действия Лаеннека, обеспечивающие улучшение состояния гомеостаза железа. Принимая во внимание отсутствие специальных препаратов для элиминации отложений железа в ткани печени, полученные результаты указывают на перспективность использования Лаеннека для профилактики и лечения заболеваний, сопровождающихся нарушениями гомеостаза железа.

Ключевые слова: гомеостаз железа, инсулиноподобный фактор роста 1, Лаеннек, гемосидероз, гемохроматоз.

Введение

Состояние печени во многом определяет здоровье человека. Известно, что гепатоциты отличаются необычайно высокой способностью к регенерации. Поэтому при легких поражениях печени, зачастую достаточно удалить повреждающий фактор (алкоголь, курение, избыток жиров, дефицит витаминов и др.) и печень «восстанавливается сама по себе». Однако при тяжелых поражениях резерв регенерации печени исчерпан, что требует длительного применения действительно эффективных гепатопротекторов.

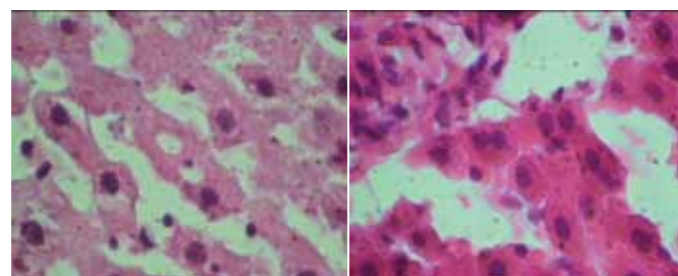
Препарат «Лаеннек» является препаратом на основе плаценты человека (ППЧ). Обладая значительным потенциалом в регенерации тканей, в клинической практике Лаеннек используется для терапии заболеваний печени и геронтопротекции [1, 2]. Экспериментальные и клинические исследования демонстрируют перспективность использования ППЧ для восстановления паренхимы и детоксикационной активности печени [3]. Внутривенное введение ППЧ вызывает активную регенерацию клеток печени и способствует улучшению функционального состояния печени в соответствии с такими маркерами как глутамат-пируват трансминаза (ГПТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ) и билирубин [4]. Внутривенное или подкожное введение препарата «Лаеннек» увеличивает скорость регенерации печени после частичной гепатэктомии и химического поражения печени тетрахлоруглеродом. Внутривенное введение препарата «Лаеннек» позволило минимизировать патологические изменения печени (некроз гепатоцитов, жировую инфильтрацию печени) [5].

В работе [6] впервые проведено экспериментальное исследование эффектов применения Лаеннека на моделях токсического поражения печени алкоголем и парацетамолом. Результаты указали на улучшение функционального и структурного состояния печени при применении Лаеннека. Гепатопротекторный эффект был особенно заметен на алкогольной модели поражения печени: нормализовались уровни АЛТ

и общего билирубина; по данным гистологии, уменьшился некроз гепатоцитов. В парацетамоловой модели острого отравления, применение Лаеннека привело к нормализации уровня креатинина и уменьшению жировой инфильтрации. И при алкогольном, и при парацетамоловом повреждении печени, Лаеннек способствовал уменьшению повреждения паренхимы и регенерации гепатоцитов, что соответствует активности ростовых факторов. Прием препарата имел нефропротекторный и кардиопротекторный эффекты.

При отсутствии поддержки Лаеннеком имела место выраженная лейкоцитарная инфильтрация портальных трактов. Мелкокапельное ожирение гепатоцитов носило диффузно-очаговый характер с преимущественной локализацией в центральных зонах печеночных долек (рис. 1а). Применение Лаеннека приводило к уменьшению повреждения паренхимы и усилению регенерации гепатоцитов. Повреждения гепатоцитов ограничены очаговыми либо диффузно-очаговым мелкокапельным ожирением. Регенеративная активность печени у животных, получавших Лаеннек, оценивалась по наличию двуядерных гепатоцитов, указывающих на восстановление процессов клеточного деления гепатоцитов (рис. 1б).

Рисунок 1. Гистология тканей печени в парацетамоловой модели поражения печени



а) Контрольная группа (парацетамол), мелкокапельное ожирение гепатоцитов.
б) Группа на Лаеннеке (парацетамол+Лаеннек), регенерация гепатоцитов, появление двуядерных гепатоцитов.

В клинической практике Лаеннек также обладает отчетливыми гепатопротекторными свойствами [1, 7-9]. Гепатопротекторный эффект препарата «Лаеннек» был более очевиден у пациентов с изначально повышенным уровнем печеночных трансаминаз АСТ, АЛТ: практически у всех наблюдаемых пациентов уровни АЛТ и АСТ приходили в норму. Стабилизировались уровни холестерина и липидов сыворотки крови.

В настоящей работе мы представляем уникальные результаты клинического исследования и систематического анализа молекулярных механизмов воздей-

ствия препарата «Лаеннек» на метаболизм железа (прежде всего на гемосидероз). В норме печень является депо железа, в котором железо сохраняется в форме плотно упакованных ферритиновых гранул, исключая контакт железа с окисляющими агентами и мембранами гепатоцитов. В то же время не следует путать физиологическое депонирование железа в виде ферритиновых гранул с гемосидерозом — избыточным отложением гемосидерина (темно-желтого пигмента на основе оксида железа) в печени и других тканях организма. Гемосидероз стимулирует долговременные повреждения паренхимы печени, фиброз, воспаление и прооксидантные реакции. Чрезмерное накопление железа в печени в форме гемосидерина существенно замедляет процесс регенерации печени и провоцирует развитие цирроза печени, сердечной недостаточности, сахарного диабета, и артрита.

Далее последовательно рассмотрены клиническая эффективность применения препарата «Лаеннек» в лечении патологических состояний печени, связанных с нарушениями метаболизма железа, результаты исследований состава препарата «Лаеннек», молекулярные механизмы гомеостаза железа, гомеостаз железа в печени. Показано, что инсулиноподобный фактор роста является основным действующим началом Лаеннека, непосредственно влияющим на печеночный гомеостаз железа и придающим Лаеннеку способность элиминировать гемосидериновые отложения железа в печени.

Клиническая эффективность применения препарата «Лаеннек» в лечении патологических состояний печени, связанных с нарушениями метаболизма железа

Рисунок 2. Снижение АЛТ при использовании препарата «Лаеннек» в/м

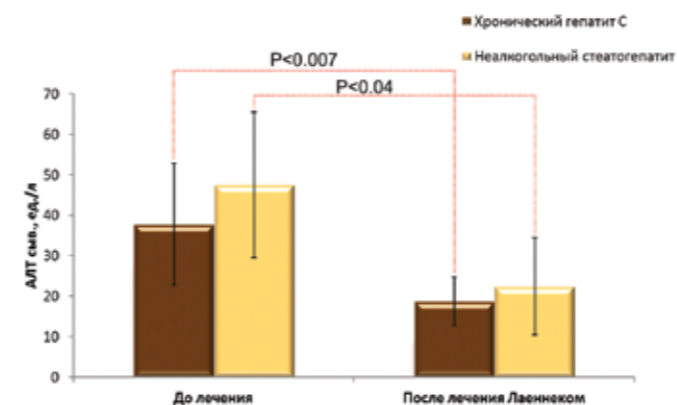
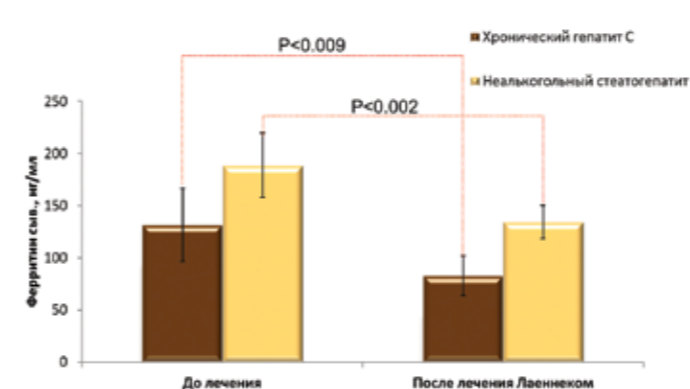


Рисунок 3. Снижение ферритина при использовании препарата «Лаеннек» в/м



Эффекты препарата «Лаеннек» в динамике лечения были изучены в группе 44 пациентов с нарушениями функции печени: неалкогольный стеатогепатит (n=26), хронический гепатит С (n=13). Также в группу были включены пациенты с гемохроматозом (n=5), у которых отмечены выраженные нарушения функции печени. В ходе лечения, пациенты получали инъекции Лаеннека (по 2 мл в/м 2 раза/нед., курс 24...96 нед.) с целью регенерации гепатоцитов и для улучшения функционального состояния печени [10].

В результате исследования было установлено, что основными клиническими эффектами использования препарата «Лаеннек» являлось снижение уровней АЛТ и ферритина в сыворотке крови. Гистологические исследования подтвердили снижение содержания железа в биоптатах печени на фоне применения Лаеннека.

При использовании Лаеннека отмечено достоверное снижение уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ, рис. 2) у пациентов как с хроническим гепатитом С (ХГ-С), так и с неалкогольным стеатогепатитом (НСГ). В динамике лечения уровни АЛТ снижались от 37.8±15 до 18.8±6 ед./л у пациентов с ХГ-С (P<0.007) и от 47.6±18 до 22.5±12 ед./л у пациентов с НСГ (P<0.04).

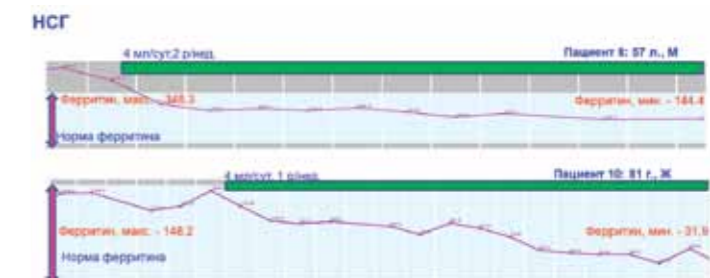
Терапия Лаеннеком приводила к снижению уровней ферритина (рис. 3): в динамике лечения уровни ферритина снижались от 131.4±35 до 82.7±19 мкг/л (P<0.009) у пациентов с ХГ-С (P<0.007) и от 188.7±31 до 134.4±16 мкг/л (P<0.002) у пациентов с НСГ (P<0.04).

Терапия Лаеннеком способствовала нормализации абnormally повышенных уровней ферритина до диапазона нормы (мужчины: 20-250 мкг/л; женщины: 10-120 мкг/л). Особенностью проведенных клини-

Рисунок 4. Снижение ферритина в динамике лечения Лаеннеком пациентов с хроническим гепатитом С – клинические случаи. Каждый прямоугольник соответствует 1 неделе лечения. Указаны режимы применения препарата «Лаеннек»



Рисунок 5. Снижение ферритина в динамике лечения Лаеннеком пациентов с неалкогольным стеатогепатитом – клинические случаи. Каждый прямоугольник соответствует одной неделе лечения. Указаны режимы применения препарата «Лаеннек»



ческих наблюдений являлась еженедельная оценка уровней ферритина у каждого пациентов. Как видно из примеров на рис. 4 и 5, и при ХГ-С, и при НСГ применение Лаеннека снижало повышенный уровень ферритина до диапазона нормы уже в течение 1-2 недель. Полученные результаты позволяют предполагать, что измерения уровня ферритина могут быть использованы в качестве чувствительного маркера для оценки динамики эффективности применения Лаеннека.

Гистологическое исследование биопсий печени, взятых у отдельных пациентов с наиболее тяжелыми поражениями печени, указало на существенно снижение содержания железа в биоптатах в динамике лечения Лаеннеком. На рис. 6 приведен пример исследования биоптатов печени до и после лечения. Очевидно существенное снижение жировой инфильтрации печени и отложений железа в форме гемосидерина при использовании Лаеннека в/м в течение 9 мес. по 4 мл/сут, 3 р/нед.

В случае пациентов с гемохроматозом курс лечения был еще более длительным — до 5 лет. Иссле-

Рисунок 6. Клинический случай: пациент 52 лет с НСГ. Применение Лаеннека в/м (4 мл/сут, 3 р/нед.) в течение 9 мес. приводило к снижению жировой инфильтрации печени (окраска гематоксилином/эозином) и гемосидероза печени (окраска «берлинской лазурью»)

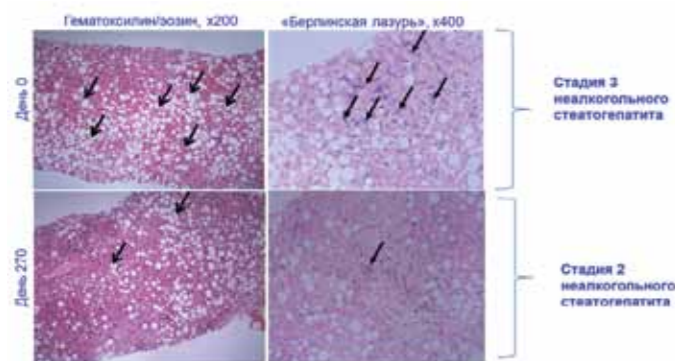
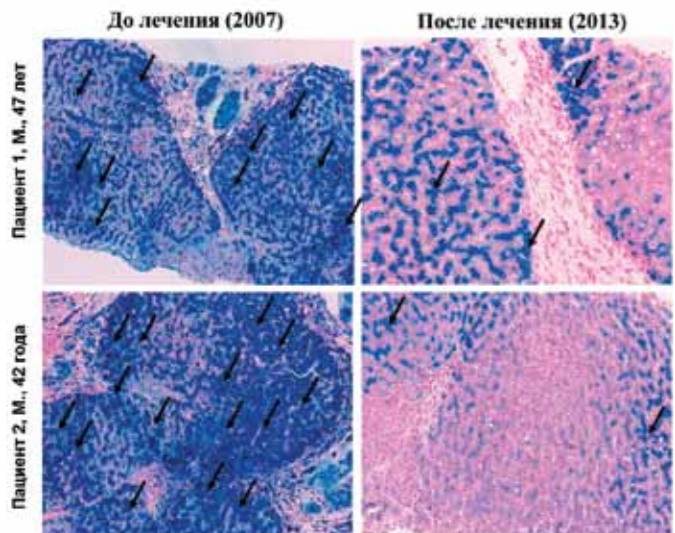


Рисунок 7. Биоптаты печени у двух пациентов с гемохроматозом 2-го типа указывают на существенное снижение гемосидероза при лечении Лаеннеком (2 мл/сут в/м, 2 р/нед, 5 лет). Окраска на гемосидероз осуществлена «берлинской лазурью»



дование биопсий печени до и после курса лечения указало на существенную элиминацию гемосидероза под воздействием препарата «Лаеннек» (рис. 7).

Следует отметить, что пациенты с хроническим гепатитом С (ХГ-С) получали терапию рибавирином, провоцирующим возникновение железо-дефицитной анемии (ЖДА). При этом, у пациентов с ХГ-С и ЖДА отмечался и гемосидероз печени — т.е. парадоксальным образом происходило избыточное накопление железа при гемосидерозе на фоне выраженной ЖДА. Применение Лаеннека способствовало устранению гемосидероза, снижению уровней ферритина и, параллельно, повышению уровней гемоглобина в крови. Заметим, что необдуманное назначение неорганических препаратов железа пациентам с ЖДА, не только не способствует лечению анемии, но и усиливает уже существующие поражения печени, связанные с гемосидерозом.

Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что Лаеннек способствует элиминации гемосидероза печени. Возникает закономерный вопрос — каков молекулярный механизм этого фармакологического эффекта? Для этого рассмотрим более подробно результаты исследований состава препарата «Лаеннек», молекулярные механизмы гомеостаза железа в печени.

Исследования состава препарата «Лаеннек»
Препарат «Лаеннек» изготавливается на основе экстракта плаценты человека и поэтому отличается чрезвычайно сложным составом, включающим многочисленные белки, их пептидные фрагменты

Таблица 1. Количественное определение различных гормонов, найденных в составе препарата Лаеннек (иммуноферментный анализ). Содержание гормонов указано в пг/мл (за исключением ИФН_γ, количество которого указано в МЕ/мл)

Гормон	Название	Содержание
DHEA	Дегидроэпиандростерон	20000
ИФР-1	Инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1)	4100
Лептин	Белковый гормон лептин	1200
TGF-1	Трансформирующий фактор роста β1	500
HGF	Фактор роста гепатоцитов (ФРГ)	130
M-CSF	Фактор роста колоний макрофагов	87
VEGF	Фактор роста васкулярного эндотелия	28
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста	13.5
IL-8	Интерлейкин-8	8.8
IL-1a	Интерлейкин-1α	7.3
IL-1b	Интерлейкин-1β	6.8
G-CSF	Колонистимулирующий фактор гранулоцитов	6.6
TNFα	Фактор некроза опухоли α (ФНО-α)	5
IL-12	Интерлейкин-12	4.6
EGF	Эпидермальный фактор роста	2.6
IL-10	Интерлейкин-10	1.2
IL-3	Интерлейкин-3	1
IL-5	Интерлейкин-5	1
IL-4	Интерлейкин-4	0.8
IL-6	Интерлейкин-6	0.2
IL-2	Интерлейкин-2	0.1
IFN-γ	Интерферон-γ	0.01

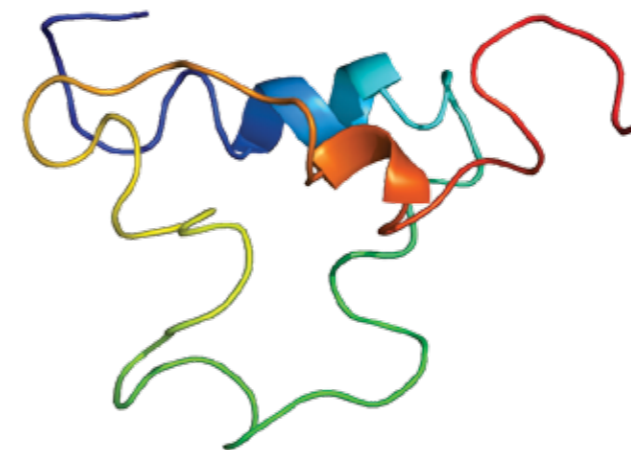
(в т.ч. нейропептиды), микроэлементы, витамины, стероиды, липиды и др. В частности экспериментальный анализ пептидного состава (диапазон молекулярных масс до 2000 Да) препарата «Лаеннек» показал, что в этой «легкой фракции» препарата присутствуют пептидные фрагменты инсулиноподобного фактора роста, натриуретического пептида С, иммуноглобулина G, интерлейкина-1α. Установлено наличие в составе препарата активного пептида нейромедина N, сигнального белка Rac2 и фрагмента активного пептида кокальцигенина [10].

Перечисленные выше пептиды могут в значительной мере обуславливать иммуномодуляторный, гепатопротекторный, нейропротекторный эффекты препарата и способствовать ускорению регенерации, заживлению ран и ожогов. Однако, их роли в регуляции гомеостаза железа не очевидны. Рассмотрим результаты анализа содержания в Лаеннеке различных гормонов.

Нами было проведено количественное определение содержания в Лаеннеке различных гормонов (по большей части, белковых) методом иммуноферментного анализа (ELISA, табл. 1). Анализ указал на значительное содержание в Лаеннеке стероида дегидроэпиандростерона, инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), лептина, трансформирующего фактора роста β1, фактора роста гепатоцитов.

Таким образом, иммуноферментный анализ указал на наличие в составе Лаеннека значительных количеств инсулиноподобного фактора роста ИФР-1. В соответствии с названием ИФР-1 является частичным аналогом гормона инсулина и проявляет анаболический эффект. ИФР-1 (рис. 8) является основным медиатором эффектов гормона роста человека. Синтез ИФР-1 стимулируется гормоном роста и снижается при хроническом недоедании, резистентности тканей к гормону роста вследствие низких уровней рецепторов гормона роста или нарушения процесса передачи сигнала от рецептора гормона роста. Как показано далее, ИФР-1 оказывает непосредственное воздействие на гомеостаз железа.

Рисунок 8. Пространственная структура инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1, PDB файл 1bqt). Среди 20 факторов роста содержание ИФР-1 в составе препарата «Лаеннек» было наиболее высоким



Молекулярные механизмы гомеостаза железа
Железо в организме человека находится в двух физиологических состояниях: (1) в виде запасов в ре-

тикулоэндотелиальной системе — печени, селезенке, костном мозге, и в (2) активном функциональном состоянии, в эритроцитах и их предшественниках. Молекулярные механизмы транспорта и гомеостаза железа достаточно сложны. Так, в геноме человека найдено, по крайней мере, 27 генов, отвечающих за транспорт и гомеостаз ионов железа, — сидерофлексины (гены SFXN1, SFXN2, SFXN4, SFXN5), гены переноса растворов (SLC11A1, SLC11A2, SLC40A1), ферритино-подобные гены (FTH1, FTL, FTHL17, FTMT), фратаксин (FXN), церуллоплазмин (CP) и др. В целом в геноме человека существует не менее 230 генов, белки которых вовлечены в гомеостаз железа, или необходимых для проявления биологических функций этого микроэлемента. Гомеостаз железа включает десятки различных белков, каждый из которых имеет уникальную функцию, без выполнения которой происходят тяжелые нарушения гомеостаза железа. Наиболее известны из всех белков трансферрин (ТФ) и ферритин (ФТ) — основные транспортные белки железа.

Трансферрин отличается высоким сродством к иону железа (рис.). Хотя количество железа, связанное с трансферрином составляет около 0.1% (4 мг) от всего железа в организме, трансферрин доставляет железо тканям, имеющим специфические мембранные рецепторы (например, предшественники эритроцитов в костном мозге, клетки нервной системы и др.). При утрате рецепторов трансферрина клетка теряет способность утилизировать железо. Молекула трансферрина, нагруженная двумя ионами железа, взаимодействует с трансферриновым рецептором на поверхности клетки (рис. 9) и транспортируется внутрь клетки в мембранном пузырьке (эндоцитоз). В ходе транспорта рН пузырька (везикулы) понижается особой разновидностью АТФаз, что приводит к высвобождению ионов железа внутри клетки. Рецептор и молекула трансферрина высвобождаются и возвращаются на поверхность клетки для переноса новой порции ионов железа [11].

Рисунок 9. Трансферрин — транспортный белок железа. Взаимодействуя со специфическими рецепторами на поверхности клетки, трансферрин переносит ионы железа внутрь клетки. а) схематическое изображение; б) пространственная структура рецептора. Показаны два иона железа (темно-красные сферы)

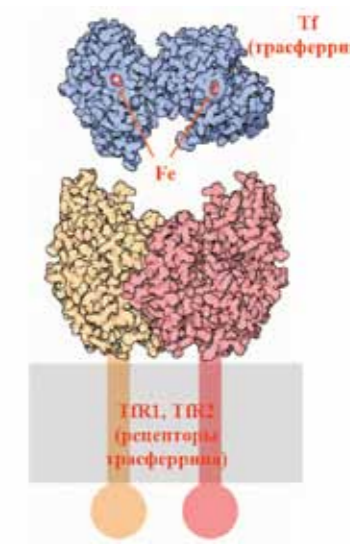
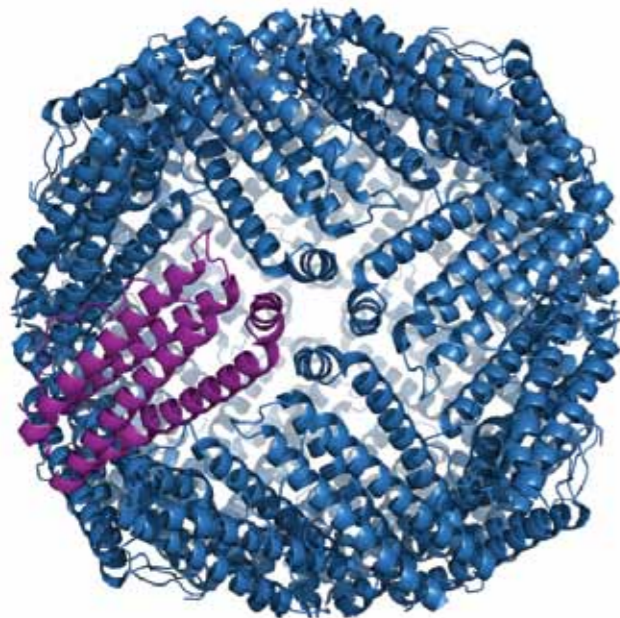


Рисунок 10. Структура комплекса образованного субъединицами ферритина. Полость, в которой будут храниться ионы железа при транспорте, показана как размытое белое пятно в центре рисунка. В данной полости может размещаться до 4500 ионов железа



Железо, высвободившееся из трансферрина, связывается специфическим белком *ферритином*, который доставляет железо в митохондрии, где оно включается в состав гема с участием *феррохелатазы*. Ферритин осуществляет внутриклеточное хранение Fe. Этот белок образован из 24 субъединиц двух типов: тяжелых (H) и легких (L) с молекулярными массами 22-24 и 20-22 кДа соответственно. Данные 24 субъединицы образуют полость, в которой может поместиться ~4500 ионов Fe³⁺ (рис. 10). Максимальная концентрация этого транспортера определена в печени, селезенке, костном мозге, преимущественно в эндотелиоцитах. Запасание железа в окисленной форме препятствует его вовлечению в окислительные процессы [12].

Трансферрин и ферритин, однако, всего лишь две составные части намного более сложной системы гомеостаза железа. Вкратце, система гомеостаза железа функционирует следующим образом. Молекула трансферрина взаимодействует с трансферриновым рецептором, транспортируется внутрь клетки, ионы железа высвобождаются. Белок типа «HFE» (вариации гена HFE считаются одной из причин гемохроматоза) регулирует взаимодействие трансферрина с рецепторами. Часть ионов железа передается в цитоплазму транспортером двухвалентных металлов (DMT1), где железо и оказывает свои биологические функции, встраиваясь в активные центры ферментов: остальное железо хранится в ферритиновых частицах и поступает в митохондрии по мере надобности. Транспорт железа, не связанного с трансферрином осуществляется ионными каналами DMT1 и ZIP14 [11]. Железо-регуляторные белки (IRP) представляют собой датчики цитоплазматических уровней железа и управляют экспрессией генов, кодирующих основные белки гомеостаза железа: ферритин, ферропортин, DMT1 и др.

Пептид *гепсидин* — один из недавно найденных центральных факторов регуляции железа. Гепсидин связывает гемопортин на мембранах энтероцитов, макрофагов и гепатоцитов. Комплекс гепсидин-гемопортин всасывается внутрь клетки, что приводит к сокращению экспорта железа и, следовательно, к более низкому уровню железа в плазме. Уровни гепсидина увеличиваются при перегрузке железом и уменьшаются с недостатком железа. Белки печени гемохроматоз (HFE), рецептор трансферрина 2 (TfR2), гемоювелин (HJV) необходимы как регуляторы синтеза гепсидина [12], который является одним из основных регуляторов содержания железа в печени.

Гомеостаз железа в печени

Печень является одним из физиологических депо железа в организме. В норме железо хранится в печени в виде ферритиновых гранул. При патологии ферритиновая оболочка разрушается, железо высвобождается из молекул ферритина, окисляется и формирует отложения гемосидерина, провоцируя воспаление, некроз гепатоцитов, фиброз [13]. При регенерации печени отмечено повышение *уровней рецепторов трансферрина* в гепатоцитах: уровни рецепторов трансферрина были увеличены через 18 ч. после частичной гепатэктомии и снижались в течение последующих 8 дней (что указывает, в частности, на активную регенерацию гепатоцитов) [14].

Синтезируемый в печени пептидный гормон *гепсидин контролирует метаболизм железа при регенерации печени*: всасывание в двенадцатиперстной кишке, хранение и перераспределение железа в организме. Экспрессия гепсидина индуцируется при перегрузке организма железом и/или воспалении и тормозит поглощение железа клетками. Синтез гепсидина часто снижен при хроническом гепатите и алкогольной болезни печени, что приводит к гиперabsорбции железа и его накоплению в печени.

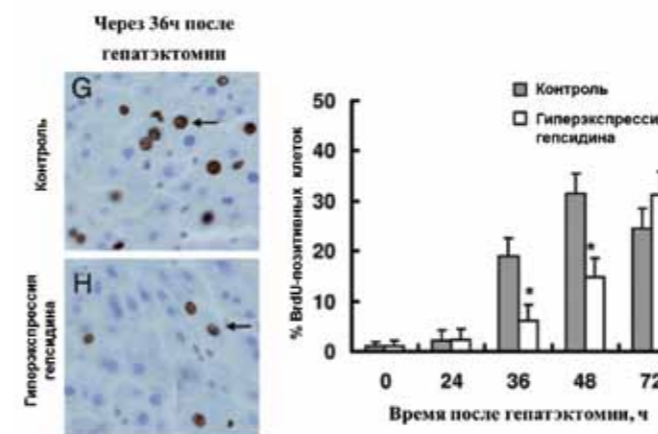
Экспрессия гена гепсидина достигает пика в первоначальную стадию регенерации печени (сразу после повреждающего воздействия). Затем, наблюдается постоянное снижение уровней экспрессии гепсидина до завершения регенерации, что способствует мобилизации железа при регенерации печени [15].

Несмотря на важность гепсидина для предотвращения отложений железа в тканях, экспериментальные исследования, тем не менее, показывают, что *повышенные уровни гепсидина играют отрицательную роль в регенерации печени*. Так, фактор роста гепатоцитов ингибирует экспрессию гепсидина в печени во время поздней стадии регенерации печени. У трансгенных мышей с гиперэкспрессией гена гепсидина отмечена сниженная регенерация печени после частичной гепатэктомии, как показало иммуногистохимическое окрашивание [16] (рис. 11).

Ингибирование транскрипции гепсидина, необходимое для регенерации печени, осуществляется факторами роста. В частности фактор роста гепатоцитов (ФРГ) и эпидермальный фактор роста (ЭФР) осуществляется путем воздействия ФРГ и ЭФР на сигнальный путь белка морфогенеза кости (БМК), с участием миоинозитол-зависимой PI3 киназы и магний-зависимой митоген-активируемой ERK-киназы [17]. Инсулиноподобный фактор роста 1, воздействуя на уровни ФРГ, регулирует уровни гепсидина и способствует выведению железа из печени при гемохроматозе.

Инсулиноподобный фактор роста 1 как основное действующее начало Лаеннека, непосредственно влияющее на печеночный гомеостаз железа

Рисунок 11. Эффект гиперэкспрессии гепсидина на регенерацию гепатоцитов после частичной резекции печени. Типичные примеры иммуногистохимического окрашивания на BrdU (бром-уридин), маркера активного восстановления клеток и синтеза ДНК. Процент BrdU-положительных клеток был измерен путем подсчета 2000 ядер клеток в 10 полях микроскопа. *P=0.05 по сравнению с контролем



Печень является основным источником циркулирующего в крови инсулиноподобного фактора роста ИФР-1, уровни которого уменьшаются при циррозе печени. Снижение инсулиноподобного фактора роста ИФР-1 отмечено в сыворотке крови пациентов с хроническими заболеваниями печени [18]. В то же время ИФР-1 стимулирует процессы регенерации печени. Например, введение в печень активного гена инсулиноподобного фактора роста ИФР-1 посредством вирусного вектора уменьшает повреждение печени и тормозит развитие фибротических поражений на моделях цирроза печени [19].

В модели цирроза печени, индуцированного четыреххлористым углеродом, *повышение уровней экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста ИФР-1 у трансгенных животных вызывает фибролиз и регенерацию печени*. В моделях цирроза рецептор ИФР-1 преимущественно экспрессировался на фиброзных перегородках, окружающих нодулы (узелки) печени. Под воздействием ИФР-1 отмечено улучшение функции печени, понижение фиброза, снижение уровней профиброгенных молекул трансформирующего фактора роста бета (TGF-бета), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста соединительной ткани (CTGF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF); отмечено повышение экспрессии антифиброгенного и цитопротекторного фактора роста гепатоцитов (HGF) [20].

ИФР-1 значительно увеличивал уровни альбумина и HGF в сыворотке. На фоне совместного использования с препаратами интерферона отмечено улучшение функции печени, снижение печеночного перекисного окисления липидов и снижение фиброза [21]. Повышенные экспрессии гена ИФР-1 в активированных звездчатых клетках печени снижает фиброз и увеличивает скорость регенерации печени после повреждения.

В модели химического повреждения печени, через 24 часа после введения CCl₄ трансгенным животным (с повышенной экспрессией ИФР-1) и в контрольной группе показали одинаковую степень обширного некроза и повышения уровня сывороточных трансаминаз. Однако через 72 ч. у трансгенных мышей с повышенной экспрессией ИФР-1 установлено достоверное снижение

Рисунок 12. Морфология печени у трансгенных мышей с повышенной экспрессией ИФР-1 и в контрольной группе до и после обработки плацебо или через 24, 48 и 72 ч. после обработки CCl₄. Срезы печени фиксировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Масштабная линейка = 200 мкм

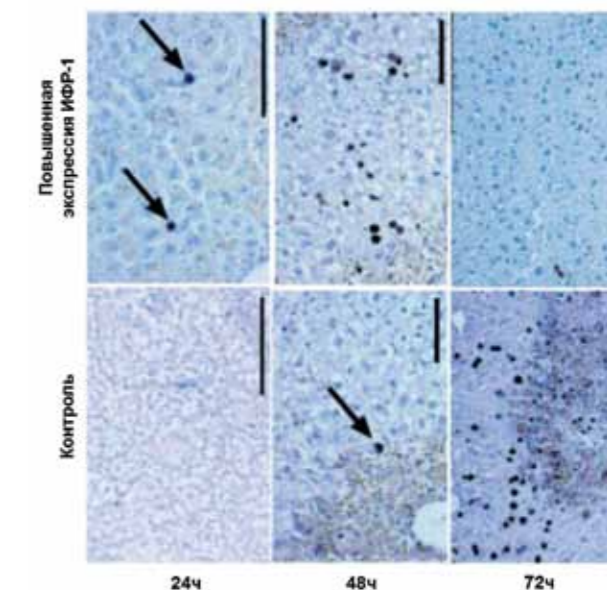
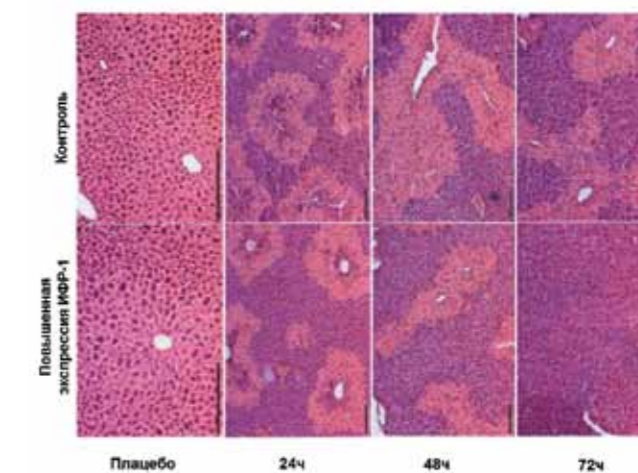


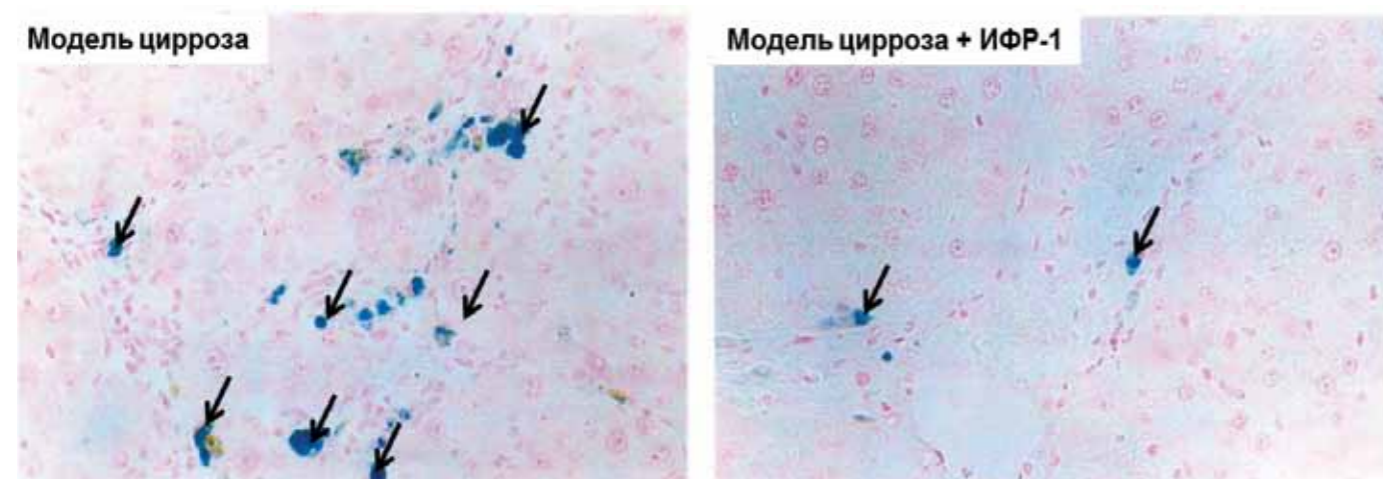
Рисунок 13. Иммуногистохимическое окрашивание печени в группе трансгенных животных (повышена экспрессия ИФР-1) и в контрольной группе при регенерации печени после гепатотоксического воздействия CCl₄. Показаны представительные микрофотографии, стрелки указывают на BrdU-положительные ядра клеток. Масштабная линейка = 200 мкм



сывороточных трансаминаз и улучшение морфологии печени по сравнению с контролем. В контроле у всех животных отмечены гистологические признаки некроза печени (в тяжелой форме — у 6 из 8 животных), в то время как у 6 из 8 трансгенных животных не было отмечено некротических процессов через 72 ч. после гепатотоксического воздействия [22] (рис. 12).

В частности для оценки интенсивности процесса регенерации гепатоцитов был использован маркер BrdU (бром-уридин), отмечающий клетки, в которых повышена интенсивность синтеза ДНК. В течение первых 24 ч. после травмы в обеих группах отме-

Рисунок 14. Окрашивание «берлинской лазурью» трехвалентного железа в печени модели цирроза и после лечения цирроза ИФР-1. Увеличение $\times 150$



чены очень низкие уровни BrdU-положительных клеток. Через 48 ч. отмечена интенсивная волна регенерации у трансгенных мышей (рис. 13), причем частота встречаемости BrdU-меченых гепатоцитов была достоверно выше (218 ± 31), чем в контроле (137 ± 7 ; $p=0.05$). Через 72 ч., когда регенерация гепатоцитов в группе трансгенных животных (с повышенной экспрессией ИФР-1) была почти завершена, количество BrdU-положительных ядер клеток в группе трансгенных животных начало снижаться (103 ± 23), в то время как в контрольной группе отмечено увеличение количества BrdU-положительных клеток (182 ± 14). Таким образом, повышение уровней ИФР-1 стимулирует ускоренную регенерацию гепатоцитов.

Процессы эритропоэза способствуют более активному выведению железа из печени [13]. В эксперименте, инсулиноподобный фактор роста ИФР-1 стимулирует эритропоэз: отмечены более высокие гемоглобина (100 ± 10 г/л), чем в контрольной группе (91 ± 6 ; $p < 0.001$) и большее количество эритроцитов ($p < 0.04$) [23], увеличение уровней ретикулоцитов было более выражено через 96 ч., чем через 60 ч. после первой инъекции ИФР-1 [24].

Помимо воздействия на эритропоэз ИФР-1 оказывает воздействие непосредственно на молекулярные механизмы гомеостаза железа. Так, ИФР-1 регулирует экспрессию рецепторов трансферрина, который транспортирует ионы железа между поверхностью клетки и эндосомами внутри клетки. Воздействие ИФР-1 на клетки в культуре вызывает быстрый перенос рецепторов трансферрина из внутриклеточного пространства на поверхность клетки. ИФР-1 увеличивает экспрессию рецепторов трансферрина на поверхности клетки, вызывая увеличение скорости экзоцитоза (от 0.11 до 0.17 мин⁻¹) и к уменьшению скорости эндоцитоза ионов железа (от 0.33 до 0.24 мин⁻¹). Таким образом, ИФР-1 действительно регулирует накопление железа в гепатоцитах [25].

Снижение концентраций инсулин-подобного фактора роста ИФР-1 ассоциировано с перегруженностью железом организма пациентов с бета-талассемией, при нормальной секреции гормона роста и функции печени [26]. И наоборот, инъекции ИФР-1 проявляют гепатопротекторные и антифиброзные действия при экспериментальном циррозе пе-

чени (модель на основе CCl_4). Применение ИФР-1 вызвало значительное снижение ($p < 0.05$) повышенных уровней железа в печени, уровней ферритина, трансферрина ($p < 0.01$) и меди [27] (рис. 14). Таким образом, у Лаеннека имеются определенные перспективы использования в терапии болезни Вильсона-Коновалова.

Важно отметить, что миоинозитол-зависимая фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3-K) и магний-зависимые сигнальные пути MAPK играют важную роль в осуществлении эффектов ИФР-1 на регенерацию гепатоцитов и на синтез фактора роста гепатоцитов [28-30]. Это позволяет предположить, что активность выведения железа из печени может существенно зависеть от обеспеченности организма пациента магнием и миоинозитолом. В частности дефицит магния действительно ускоряет накопление избыточного железа в печени. В эксперименте, концентрация железа в печени была значительно выше у крыс, получавших Mg-дефицитные диеты в течение 4 недель по сравнению с контрольным рационом [29].

Также отметим, что присутствующий в значительных количествах в составе Лаеннека дегидроэпиандростерон (ДГЭА) стимулирует повышение уровней ИФР-1 [31] даже при пероральном употреблении. Таким образом, ДГЭА и ИФР-1, входящие в состав Лаеннека, могут проявлять синергидные эффекты в регенерации печени и устранении гемосидероза.

Заключение

Многие заболевания печени сопровождаются нарушениями обмена железа. При этом наблюдается не просто избыточное накопление железа в печени, а гемосидероз — пропитывание ткани печени гемосидерином, состоящим преимущественно из мелкодисперсных оксидов железа. Гемосидероз поддерживает хроническое воспаление, стимулирует апоптоз и некроз гепатоцитов, приводя к фиброзу и циррозу печени. Гемосидероз сопровождается грубой разбалансировкой тонко налаженной системы белковых факторов, регулирующих гомеостаз железа в тканях, например, повышение уровней гепсидина, снижение уровней инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) и др. Входящие в состав Лаеннека ИФР-1 и дегидроэпиандростерон способствуют восстановлению баланса регуляторных факторов гомеостаза железа, регенерации печени и выведению гемосидерина из тканей печени.

Литература

1. Минушкин О.Н., Калинин А.В., Масловский Л.В., Васильев А.П., Квасовка В.В., Дубовая Т.К., Батурина Г.А., Зверков И.В. Лаеннек: опыт внутривенного капельного введения при лечении некоторых диффузных заболеваний печени. Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. Т. 2, 2005. С. 27-30.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гилельс А.В., Диброва Е.А., Гришина Т.Р., Волков А.Ю., Лиманова О.А., Назаренко О.А., Калачева А.Г., Демидов В.И. Препараты плаценты человека: фундаментальные и клинические исследования. Врач, 2014, N 4. С.67-72.
3. Bishayee A, Banerjee KK, Chatterjee M. Effects of human placental extract on hepatic drug metabolizing enzyme. Riv Eur Sci Med Farmacol. 1995;17(1):19-26.
4. Tsutsumi, Hashimoto, Masada. Effects of placenta extracts on lymphocytes and cancer cells. Japan Bioproducts, RHANA, 1983 (producer data on file).
5. Nakayama S, Kodama K, Oguchi K. [A comparative study of human placenta hydrolysate (Laenec) by intravenous or subcutaneous injection on liver regeneration after partial hepatectomy in normal and CCl_4 -induced cirrhosis rats] Nippon Yakurigaku Zasshi. 1989;94(5):289-297.
6. Назаренко О.А., Демидов В.И., Гришина Т.Р., Торшин И.Ю., Диброва Е.А., Каримова И.М., Гилельс А.В., Кустова Е.В., Громова О.А. Экспериментальное исследование гепатопротекторных свойств препарата Лаеннек.
7. Елисютина О.Г., Феденко Е.С., Шабанова И.Ф., Каримова И.М. Первый опыт применения препарата Лаеннек при atopическом дерматите. Российский Аллергологический Журнал № 1-2010, С. 97-104.
8. Ярилиан А., Феденко Е., Каримова И. Лаеннек — лекарственный препарат на основе гидролизата плаценты человека, Инъекционные методы в косметологии № 4-2010, С. 30-38.
9. Румянцев А.Г., Токарев Ю.Н. (ред.). Болезни перегрузки железом (гемохроматозы). М., Медпрактика-М, 2004, 328 с.
10. Hamada Y. 48th General Meeting of Japan Society of Hepatology. 2012.
11. Торшин И.Ю., Громова О.А., Гилельс А.В., Волков А.Ю., Лиманова О.А., Керимкулова Н.В., Носиков В.В. Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека. Эстетическая медицина, 12(1):2013.
12. Pietrangelo A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002 Mar;282(3):G403-14.
13. Borch-Johnsen B, Hagve TA, Hauge A, Thorstensen K. Regulation of the iron metabolism. Tidsskr Nor Laegeforen. 2009 Apr 30;129(9):858-62.
14. Zivna H, Zivny P, Vokurkova D, Svejtkovska K, Palicka V. The effect of chronic iron losses on liver regeneration in male and female rats. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2010;154(2):153-158.
15. Hirose-Kumagai A, Sakai H, Akamatsu N. Increase of transferrin receptors in hepatocytes during rat liver regeneration. Int J Biochem. 1984;16(6):601-605.
16. Mollbrink A, Holmstrom P, Sjoström M, Hultcrantz R, Eriksson LC, Stal P. Iron-regulatory gene expression during liver regeneration. Scand J Gastroenterol. 2012;47(5):591-600 doi.
17. Wang L, Gao F, Yang F, Wei Z, Zou C. Hepcidin plays a negative role in liver regeneration. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2013;45(12):1049-54 doi.

18. Goodnough JB, Ramos E, Nemeth E, Ganz T. Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. Hepatology. 2012;56(1):291-9 doi.

19. Wu A, Grant DB, Hambley J, Levi AJ. Reduced serum somatomedin activity in patients with chronic liver disease. Clin Sci Mol Med. 1974;47(4):359-366.

20. Vera M, Sobrevals L, Zaratiegui M, Martinez L, Palencia B, Rodriguez CM, Prieto J, Fortes P. Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. Gene Ther. 2007;14(3):203-10 Epub 2006 Oc.

21. Sobrevals L, Rodriguez C, Romero-Trejejo JL, Gondi G, Monreal I, Paneda A, Juanarena N, Arcelus S, Razquin N, Guembe L, Gonzalez-Aseguiolaza G, Prieto J, Fortes P. Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats. Hepatology. 2010;51(3):912-21 doi.

22. Tutau F, Rodriguez-Ortigosa C, Puche JE, Juanarena N, Monreal I, Garcia Fernandez M, Clavijo E, Castilla A, Castilla-Cortazar I. Enhanced actions of insulin-like growth factor-I and interferon-alpha co-administration in experimental cirrhosis. Liver Int. 2009;29(1):37-46 doi.

23. Sanz S, Pucilowska JB, Liu S, Rodriguez-Ortigosa CM, Lund PK, Brenner DA, Fuller CR, Simmons JG, Pardo A, Martinez-Chantar ML, Fagin JA, Prieto J. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. Gut. 2005;54(1):134-141.

24. Kling PJ, Taing KM, Dvorak B, Woodward SS, Philipps AF. Insulin-like growth factor-I stimulates erythropoiesis when administered enterally. Growth Factors. 2006;24(3):218-223.

25. Bechensteen AG, Halvorsen S, Skottner A. Recombinant human insulin-like growth factor 1 (rh-IGF-1) stimulates erythropoiesis in adult, but not in newborn mice. Acta Physiol Scand. 1994;151(1):117-123.

26. Davis RJ, Faucher M, Racaniello LK, Carruthers A, Czech MP. Insulin-like growth factor I and epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distinct mechanisms. J Biol Chem. 1987;262(27):13126-13134.

27. Karamifar H, Karimi M, Amirhakimi G, Sharbatlaei M, De Sanctis V. Reduced insulin growth factor I concentrations in iron-overloaded beta thalassaemic patients with normal growth hormone secretion and liver function. Pediatr Endocrinol Rev. 2004;2 Suppl 2:256-258.

28. Garcia-Fernandez M, Castilla-Cortazar I, Diaz-Sanchez M, Navarro I, Puche JE, Castilla A, Casares AD, Clavijo E, Gonzalez-Baron S. Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis. BMC Gastroenterol. 2005;5:7.

29. Skrtic S, Wallenius K, Gressner AM, Jansson JO. Insulin-like growth factor signaling pathways in rat hepatic stellate cells: importance for deoxyribonucleic acid synthesis and hepatocyte growth factor production. Endocrinology. 1999;140(12):5729-5735.

30. Ishizaki N, Kotani M, Funaba M, Matsui T. Hepcidin expression in the liver of rats fed a magnesium-deficient diet. Br J Nutr. 2011;106(8):1169-72 doi.

31. Liu KX, Kato Y, Kaku T, Sugiyama Y. Human placental extract stimulates liver regeneration in rats. Biol Pharm Bull. 1998;21(1):44-49.

32. Villareal DT, Holloszy JO, Kohrt WM. Effects of DHEA replacement on bone mineral density and body composition in elderly women and men. Clin Endocrinol (Oxf). 2000;53(5):561-568.