

Коррекция Лаеннеком хронической перегрузки железом печени, почек и головного мозга

Назаренко О.А.¹, Громова О.А.¹, Гришина Т.Р.¹, Торшин И.Ю.²,
Демидов В.И.¹, Томилова И.К.¹, Алексахина Е.Л.¹, Гоголева И.В.¹

¹ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

² – ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт», г. Долгопрудный

Резюме. Представлены результаты экспериментального исследования эффектов препарата Лаеннек на фоне хронической перегрузки железом. Длительное (2 мес) применение сульфата железа или железа в составе полимальтозного комплекса приводило к хронической перегрузке железом (гемосидероз). Нарушения функции печени и почек более выражены при использовании сульфата железа и несколько менее – при использовании полимальтозного комплекса. Лаеннек приводил к снижению повреждения гепатоцитов (снижались уровни АЛТ). По данным гистологического анализа, применение Лаеннека снижало отложение железа в печени и почках и полностью предотвращало формирование отложений железа в головном мозге.

Ключевые слова: гемосидероз, болезни перегрузки железом, сульфат железа, полимальтозные комплексы железа, Лаеннек, инсулиноподобный фактор роста 1

Correction by Laennec of chronic iron overload liver, kidneys and brain

Nazarenko O.A.¹, Gromova O.A.¹, Grishina T.R.¹, Torshin I.Yu.²,

Demidov V.I.¹, Tomilova I.K.¹, Aleksakhina E.L.¹, Gogoleva I.V.¹

¹ – FGBOU IN «Ivanovo State Medical Academy» Russian Ministry of Health, Ivanovo

² – FGBOU IN «Moscow Institute of Physics and Technology», Dolgoprudny

Resume. The results of experimental investigations of the effects of Laennec on chronic iron overload. Long-term (2 weeks) application of iron sulfate or iron polymaltose complex composition caused chronic iron overload (hemosiderosis). The liver and kidneys is more pronounced when using iron sulfate and a few less – when using polymaltose complex. Laennec decreased the damage of hepatocytes (decreased ALT levels). According to histological analysis application Laennec reduced iron deposition in the liver and kidneys and completely prevented the formation of iron deposits in the brain.

Keywords: hemosiderosis, a disease of iron overload, iron sulfate, polymaltose iron complex, Laennec, insulin-like growth factor 1

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна — д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153000, г. Иваново, Шереметевский пр., 8; тел.: +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

Перегрузка железом (гемосидероз) — патофизиологический процесс, связанный с формированием отложений *гемосидерина* (тёмно-жёлтого пигмента на основе оксида железа). Гемосидероз начинается, прежде всего, в тканях печени, а, в последующем, развивается и в других тканях организма (почках, миокарде головном мозге и др.). Гемосидероз стимулирует формирование провоспалительных реакций, интенсификацию оксидативного стресса (в т. ч. перекисного окисления липидов), повреждение паренхимы органов с развитием фиброза и др.

Возможен как первичный, наследственно обусловленный гемосидероз («первичный гемохроматоз», «бронзовый диабет»), так и вторичный, в частности, связанный с длительным бесконтрольным приёмом препаратов железа. Последнее представляет собой серьёзную проблему, т.к. препараты железа используются для лечения железодефицитной анемии — самой распространённой формы анемии.

Лечение гемосидероза является комплексным и включает препараты, связывающие железо (дефе-

роксамин), глюкокортикоиды, витамины, ангио- и гепатопротекторы и т. д. В частности, имеются данные о возможной эффективности при гемосидерозе печени препарата Лаеннек. Лаеннек представляет собой мультикомпонентный высокоочищенный препарат на основе гидролизата плаценты человека и содержит факторы роста (например, фактор роста гепатоцитов, инсулиноподобный), интерлейкины, интерфероны, витамины (В₁, В₂, РР, В₁₂, С), нуклеотиды, аминокислоты (например, цистеин), различные макро- и микроэлементы (фосфор, серу, бром, кобальт, цинк, селен и др.) [1]. В настоящее время данный препарат применяется в гинекологии, косметологии и дерматологии, геронтологии и гепатологии [2–5].

Входящий в состав Лаеннека ИФР-1 способен непосредственно влиять на печёночный гомеостаз железа и способствовать восстановлению нормальной регуляции гомеостаза железа, регенерации печени и выведению гемосидерина из тканей печени [5–7]. При этом, в отличие, например, от хелатирующих препаратов, Лаеннек не только нормализует гомеостаз и транспорт железа, но и восстанавливает функцию гепатоцитов [5].

Целью настоящей работы является изучение эффективности Лаеннека при хронической перегрузке железом при длительном применении препаратов железа с низкой биодоступностью (сульфат железа, полимальтозный комплекс железа) в максимальных терапевтических дозах.

Материалы и методы

Опыты были проведены на 30 белых крысах массой 200–250 г, разделённых на 5 групп (по 6 особей в каждой группе). Группа 1 служила интактным контролем. Группы 2, 4 получали сульфат железа (актиферрин) в виде сиропа в дозе 0,6 мл/кг (4,12 мг/кг железа) в желудок через зонд в течение 60 сут. Группы 3, 5 получали полимальтозат железа (мальтофер) в виде сиропа в дозе 0,5 мл/кг (5 мг/кг железа) в желудок через зонд 60 сут. Группам 4 и 5 на протяжении последующих 60 сут вводили Лаеннек (в/б, 0,1 мл/кг).

После окончания эксперимента (день 120) животных всех групп помещали на сутки в обменные клетки для определения выделительной функции почек. В крови определяли активность АЛТ, АСТ, билирубин, общий белок и креатинин, в моче — концентрацию белка (с помощью стандартных наборов). Производили забор печени, почек и головного мозга на гистологическое исследование.

В патогистологической лаборатории наличие отложений железа в исследуемых тканях идентифицировали посредством реакции Перльса («берлинская лазурь»). После краниотомии головной мозг извлекался целиком, печень и почки также эвисцерировались целиком. Все органы фиксировались в 10% растворе нейтрального формалина. Проводка тканей осуществлялась по стандартной схеме (обезживание в этиловом спирте, ксилоле) с последующим изготовлением парафиновых блоков.

Изготовленные на санном микротоме «Microm» гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Дубликаты срезов с помощью набора реактивов компании «Биовитрум» окрашены по Перльсу для выявления в тканях трёх-

валентного железа, результатом проведённой реакции должно быть образование окрашенной соли — берлинской лазури ($4\text{Fe}^{3+} + 3\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 = \text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)_3 + 12\text{K}^+$). Морфологическое исследование гистологических срезов проводилось на анализаторе изображения «BioVision» (Австрия), микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа «Micros MC 200» и цифровой окулярной камеры DCM 900.

Для анализа полученных данных использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия Хи-квадрат, Т-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и теста Стьюдента. Использовалась прикладная программа STATISTICA 6.0 и электронные таблицы Microsoft Excel.

Результаты исследования и обсуждение результатов

Результаты биохимического исследования образцов крови и мочи от экспериментальных животных суммированы в табл. 1. Биохимическое исследование крови выявило статистически значимое повышение активности АЛТ в группе крыс, получавших Актиферрин (82 ± 15 Ед/л, интактные — 53 ± 10 Ед/л), что свидетельствует о выраженном гепатотоксическом действии сульфата железа и повреждении гепатоцитов (факт, подтверждённый в результате гистологических исследований, см. далее). Кроме того, приём сульфата железа был также ассоциирован с достоверным понижением уровней креатинина в крови (132 ± 11 мкмоль/л, интактные — 167 ± 8 мкмоль/л, $p = 0,00012$) и с повышением уровней белка в моче (38 ± 31 мг/100 мл, интактные — 15 ± 10 мг/100 мл, $p = 0,051$).

Результаты гистологического исследования показали, что у интактных крыс (группа 1) в головном мозге и почках при проведении реакции Перльса

Таблица 1

Результаты биохимического исследования крови и мочи в исследованных группах (день 120)

Группа Показатель	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	Общий белок крови, г/л	Креатинин крови, мкмоль/л	Суточный диурез, мл	Белок мочи, мг/100 мл
1. Интактные	53 ± 10	131 ± 15	72 ± 6	167 ± 8	$3,2 \pm 2,8$	15 ± 10
2. Актиферрин	$82 \pm 15^{**}$	116 ± 25	68 ± 5	$132 \pm 11^{**}$	$4,1 \pm 1,6$	$38 \pm 31^*$
3. Мальтофер	$49 \pm 21^{\#}$	121 ± 16	70 ± 6	$123 \pm 20^{**}$	$5,6 \pm 2,3^*$	$31 \pm 30^*$
4. Актиферрин+Лаеннек	$31 \pm 10^{\#\#}$	132 ± 53	71 ± 3	$114 \pm 32^*$	$8,0 \pm 2,2^{\#}$	24 ± 9
5. Мальтофер+Лаеннек	$29 \pm 6^{*,\#\#}$	127 ± 36	72 ± 2	$132 \pm 27^*$	$8,4 \pm 2,5^{*,\S}$	20 ± 12

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой; ** $p < 0,005$ по сравнению с интактной группой; # $p < 0,05$ по сравнению с группой получавших Актиферрин (группа 2); ## $p < 0,005$ по сравнению с группой получавших Актиферрин (группа 2); § $p < 0,05$ по сравнению с группой получавших Мальтофер (группа 3); §§ $p < 0,005$ по сравнению с группой получавших Мальтофер (группа 3).

образования берлинской лазури не наблюдалось. Гистологическое исследование ткани печени показало, что во всех наблюдениях цитоплазма гепатоцитов содержала равномерно распределённые мелкодисперсные гранулы берлинской лазури, что, вероятно, объясняется наличием резервного железа в клетках печени в виде ферритина (рис. 1).

При гистологическом анализе эффектов воздействия сульфата железа (крысы, получавшие препарат Актиферрин, группа 2) обнаружены изменения в печени. В условиях полнокровия центральных вен и синусоидов прецентральной зоны печёночных долек гепатоциты находились в состоянии умеренно выраженной гидропической (вакуольной) дистрофии (рис. 2А). Проведение реакции Перльса позволило выявить умеренно выраженную пролиферацию и фагоцитарную активность купферовских клеток (звёздчатых ретикулоэндотелиоцитов); в цитоплазме гепатоцитов, расположенных вблизи центральной вены, обнаруживались кристаллы берлинской лазури (рис. 2Б).

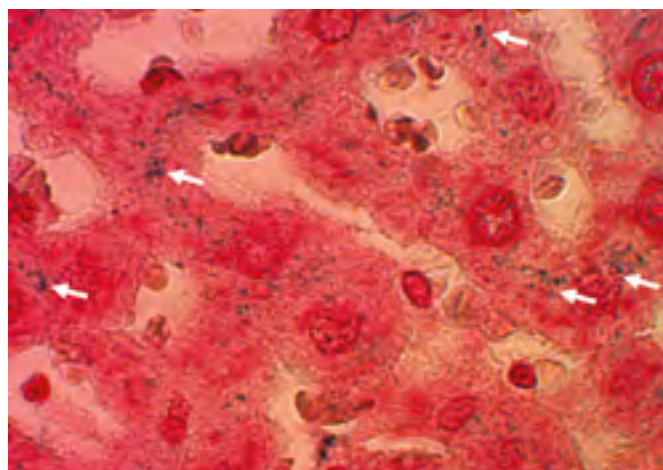


Рис. 1. Мелкодисперсные гранулы берлинской лазури в цитоплазме гепатоцитов прецентральной зоны печёночной дольки

Примечание: Стрелками отмечены мелкодисперсные отложения берлинской лазури, возникшие в результате проведения реакции Перльса. Увеличение × 1200

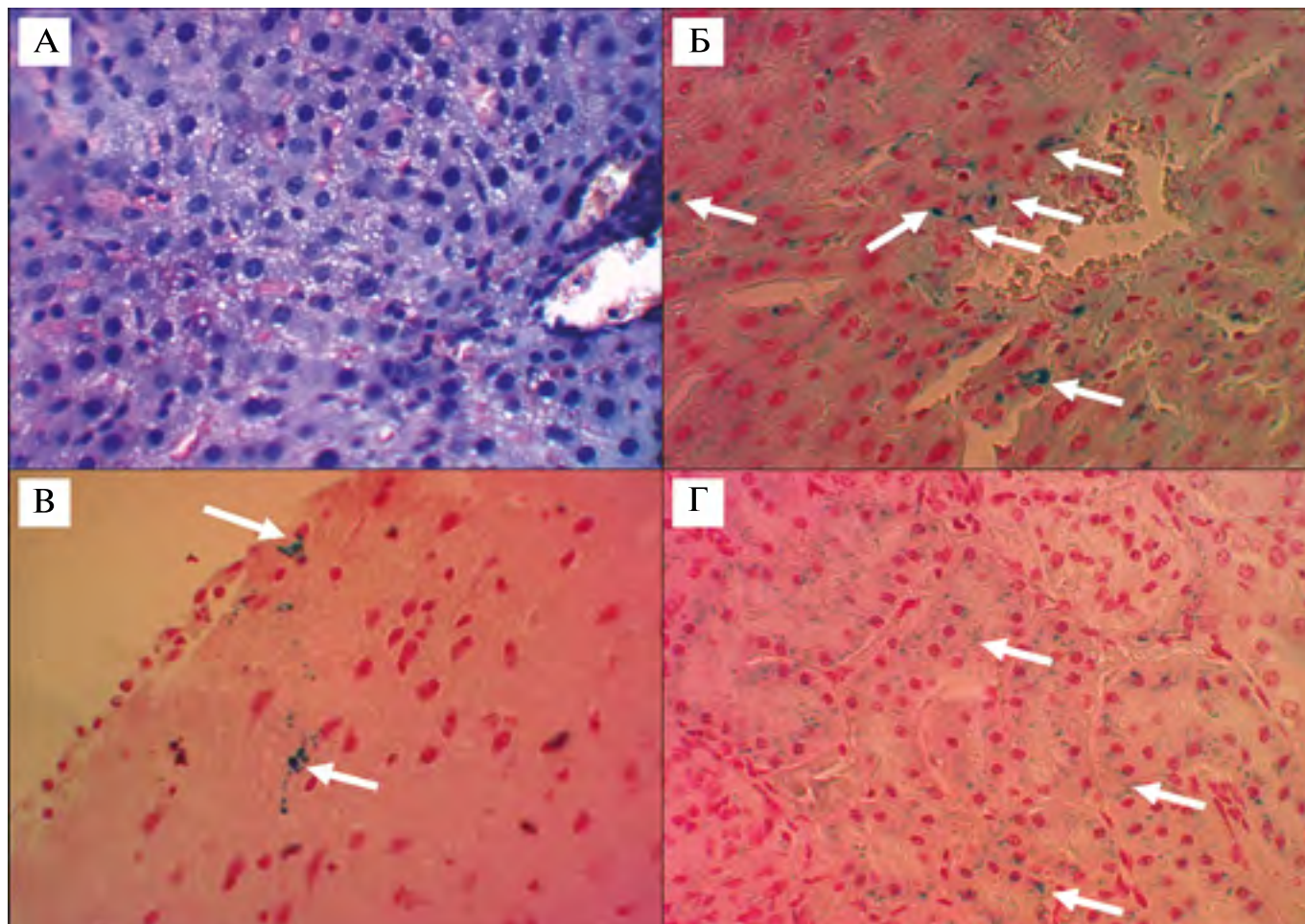


Рис. 2. Патогистологическая картина воздействия сульфата железа на ткани различных органов. Увеличение × 480. (А) Гидропическая дистрофия гепатоцитов на фоне застойного полнокровия. Окраска гематоксилином и эозином. (Б) Пролiferация купферовских клеток, фагоцитирующих железосодержащие продукты. Гранулы берлинской лазури в цитоплазме гепатоцитов центра печёночной дольки. Реакция Перльса. (В). Очаговые скопления гранул берлинской лазури в паравентрикулярной зоне большого полушария головного мозга. Реакция Перльса. (Г). Мелкодисперсные гранулы берлинской лазури в цитоплазме нефроцитов проксимальных извитых канальцев. Реакция Перльса

При исследовании с помощью реакции Перльса тканей головного мозга животных, получавших сульфат железа, в одном наблюдении выявлено очаговое образование берлинской лазури в субэпендимарном отделе (паравентрикулярной зоне) левого полушария большого мозга (рис. 2В). В почках 4 животных реакция Перльса дала положительный результат, который выражался распространённым образованием мелкодисперсных гранул берлинской лазури в цитоплазме нефроцитов проксимальных извитых канальцев (рис. 2Г) и, вероятно, поражениями функциями нефроцитов, на что указывает повышением уровней белка в моче (38 ± 31 мг/100 мл, интактные – 15 ± 10 мг/100 мл, $p = 0,051$). Таким образом, длительный приём сульфата железа приводит к накоплению железа (вероятно, в виде гемосидериновых гранул) во всех исследованных тканях – печени, головном мозге, почках, что соответствует классической картине перегрузки организма железом.

При применении полимальтозного комплекса (Мальтофер, группа 3) активность АЛТ не отличалась от показателя интактных животных (см. табл. 1). Однако, как и в случае сульфата железа, уровни креатинина в крови также достоверно снижались (123 ± 20 мкмоль/л, интактные – 167 ± 8 мкмоль/л, $p = 0,0009$). У крыс, получавших Мальтофер, также отмечено более высокое значение суточного диуреза ($5,6 \pm 2,3$ мл, интактные – $3,2 \pm 2,8$ мл, $p = 0,05$). Таким образом, сульфат железа, очевидно, намного более гепатотоксичен, чем полимальтозный комплекс железа.

Гистологический анализ тканей посредством реакции Перльса показал, что у крыс, получавших препарат Мальтофер, образования берлинской лазури в ткани головного мозга не наблюдалось. Патогистологические изменения печени у крыс этой группы характеризовались очаговой вакуольной дистрофией гепатоцитов центральной зоны печёночной дольки.

Реакция Перльса оказалась положительной и носила очаговый характер в пределах центров печёночных долек, где выявлялись мелкие гранулы берлинской лазури в цитоплазме отдельных гепатоцитов (рис. 3А). Исследование почек показало, что в 3 наблюдениях железосодержащие включения обнаруживались в цитоплазме нефроцитов проксимальных извитых канальцев в виде мелкодисперсных гранул (рис. 3Б). По всей видимости, накопление этих гранул соответствовало частичным поражениям функции почек, т.к. приём Мальтофера был ассоциирован с повышением уровней белка в моче (31 ± 30 мг/100 мл, интактные – 15 ± 10 мг/100 мл, $p = 0,055$).

Введение Лаеннека после 60-дневного курса интоксикации железом оказывало гепатопротекторный эффект и было ассоциировано с достоверным снижением уровней активности АЛТ – маркера повреждения гепатоцитов (см. табл. 1). В случае интоксикации сульфатом железа снижение уровней АЛТ при применении Лаеннека было наиболее выраженным (Активферрин 82 ± 15 Ед/л, Активферрин+Лаеннек – 31 ± 10 Ед/л, $p = 5,3 \cdot 10^{-5}$). Совместное применение Лаеннека с полимальтозным комплексом также снижало уровни АЛТ (Мальтофер – 49 ± 21 Ед/л, Мальтофер+Лаеннек – 29 ± 6 Ед/л, $p = 0,034$). Интересно отметить, что при использовании Лаеннека достигаемые уровни АЛТ были даже ниже, чем в группе интактных животных (53 ± 10 Ед/л). Иначе говоря, Лаеннек приводил не только к существенному уменьшению повреждения гепатоцитов, возникающего в результате перегрузки печени железом, но и улучшал функционирование гепатоцитов.

Гистологический анализ показал, что у животных, получавших Лаеннек после перегрузки сульфатом железа, поражение печени железом было заметно ниже. На это указывает, в частности, ограниченное накопление берлинской лазури макрофагами и гепатоцитами в пре-

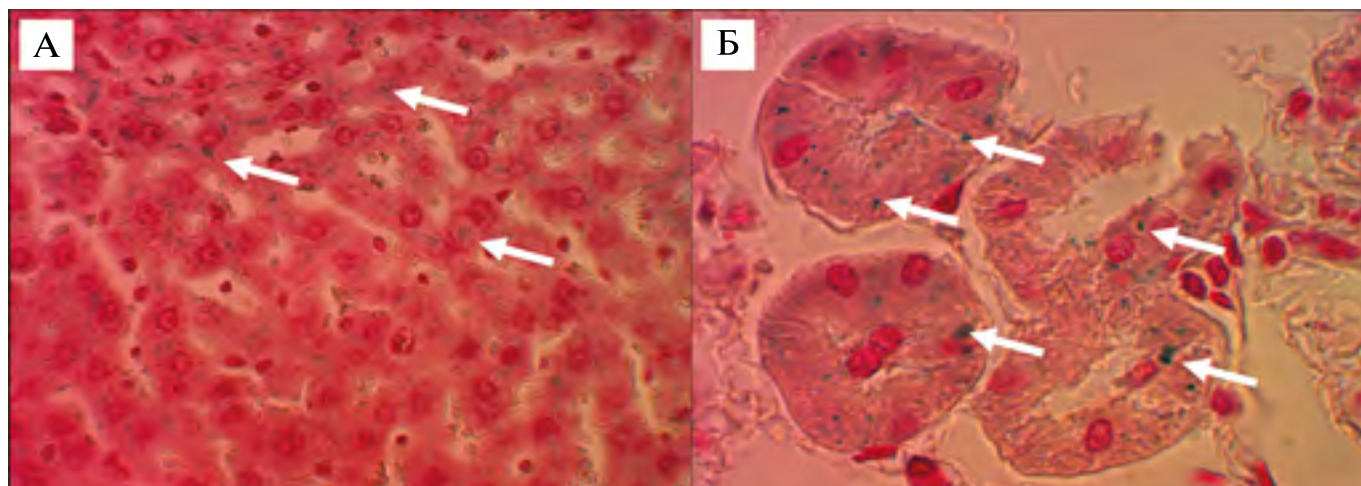


Рис. 3. Эффекты воздействия полимальтозного комплекса на накопление железа в различных тканях. (А) Цитоплазма гепатоцитов содержит мелкие гранулы берлинской лазури. Реакция Перльса. Увеличение $\times 480$. (Б) Отдельные нефроциты содержат мелкие гранулы берлинской лазури. Реакция Перльса. Увеличение $\times 1200$

делах перипортальных зон печёночных долек (рис. 4А). Интенсивность почечной реабсорбции железа в группе «Актиферрин+Лаеннек» была значительно ниже и характеризовалась всего лишь локальным накоплением мелкодисперсных гранул берлинской лазури в нефроцитах извитых канальцев (рис. 4Б). В головном мозге реакция Перльса была отрицательной, т. е. применение Лаеннека полностью предотвращало формирование гемосидероза в головном мозге.

Использование Лаеннека после интоксикации Мальтофером приводило к полному отсутствию прокрашивания берлинской лазурью тканей почек и головного мозга у всех животных группы 5. При исследовании тканей печени отмечался незначительный уровень фагоцитарной активности купферовских клеток, а мелкодисперсные гранулы берлинской лазури обнаруживались в цитоплазме всего лишь отдельных гепатоцитов центральных отделов печёночной дольки (рис. 5).

Таким образом, длительное (в течение 2 мес) применение соединений железа в эксперименте, как в виде сульфата железа (группа 2), так и железа в составе полимальтозного комплекса (группа 3), приводило к возникновению признаков хронической перегрузки железом в форме гемосидероза. Нарушения функции печени и почек были более выражены при использовании сульфата железа и несколько менее выражены при использовании полимальтозного комплекса. Последующее двухмесячное введение Лаеннека уменьшало повреждение печени и отложение железа в печени и почках как в случае интоксикации сульфатом железа (группа 4), так и в случае железа в составе полимальтозного комплекса (группа 5).

Защитный эффект препарата Лаеннек по отношению к клеткам печени, почек и головного мозга при хронической перегрузке железом связан, по всей видимости, с наличием в составе препарата биологически

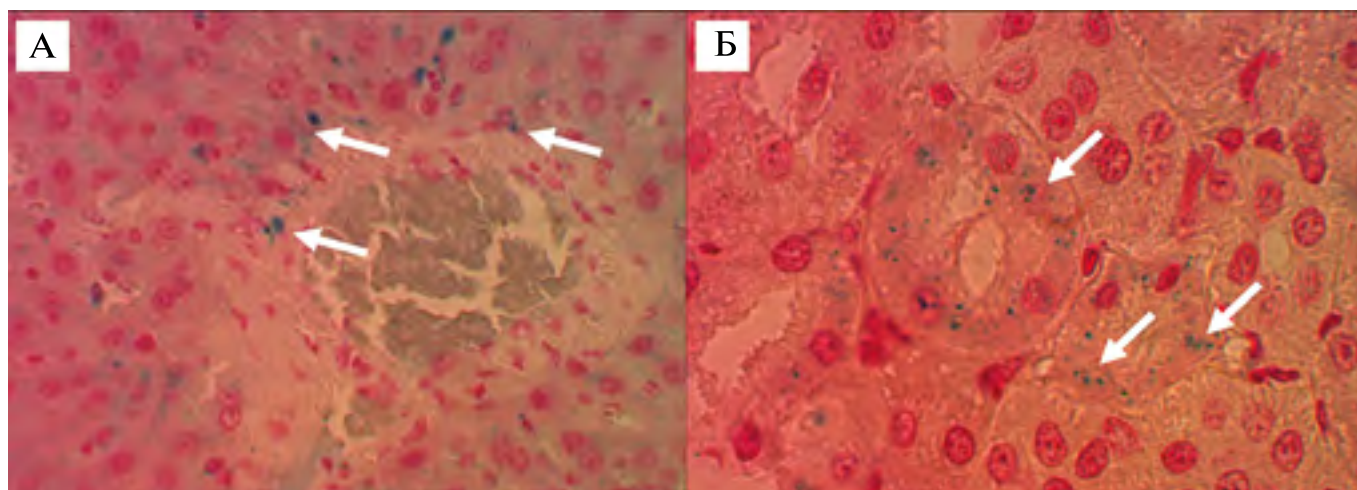


Рис. 4. Гистологический анализ тканей животных, получавших одновременно сульфат железа и Лаеннек. (А) Берлинская лазурь содержится в макрофагах и гепатоцитах перипортальной зоны печёночной дольки. Реакция Перльса. Увеличение $\times 480$. (Б) Железом перегружены лишь отдельные проксимальные извитые канальцы. Реакция Перльса. Увеличение $\times 1200$

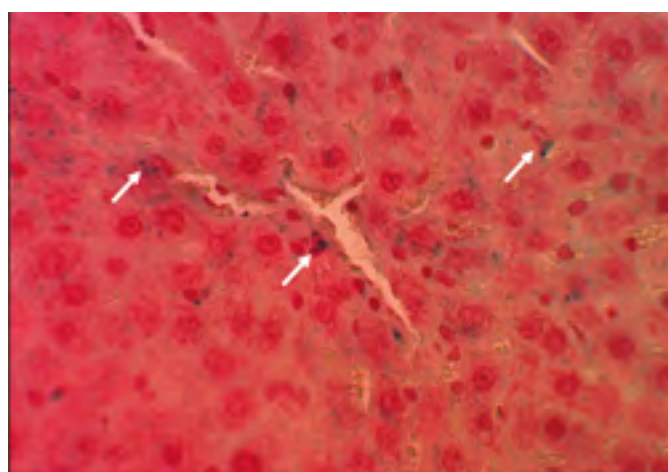


Рис. 5. Исследование тканей печени. В цитоплазме единичных макрофагов и гепатоцитов содержатся гранулы берлинской лазури. Реакция Перльса. Увеличение $\times 480$

активных пептидных фрагментов инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1). Также, в составе Лаеннека содержится дегидроэпиандростерон, повышающий секрецию ИФР-1 [8]. ИФР-1 является частичным аналогом гормона инсулина и проявляет анаболический эффект.

ИФР-1 оказывает воздействие непосредственно на молекулярные механизмы гомеостаза железа [5]. Так, ИФР-1 регулирует экспрессию рецепторов трансферрина, осуществляющего перенос ионов железа между поверхностью клетки и эндосомами внутри клетки. Воздействие ИФР-1 на клетки в культуре вызывает быструю транспортировку рецепторов трансферрина из внутриклеточного пространства на поверхность клетки. ИФР-1 увеличивает экспрессию рецепторов трансферрина на поверхности клетки, вследствие чего происходит увеличение скорости экзоцитоза и торможение эндоцитоза ионов железа [6]. Кроме того,

ИФР-1 стимулирует процессы регенерации в печени [7]. Поэтому, препарат Лаеннек и может оказывать гепатопротекторное действие при перегрузке организма низкоусвояемыми препаратами на основе железа.

Заключение

Длительное (в течение 2 месяцев) применение препаратов железа внутрь (сульфата железа, полимальтозного комплекса железа) в дозах, близких к максимальным, вызывает хроническую перегрузку железом, что подтверждается результатами биохимических и гистологических исследований. По сравнению

с сульфатом железа, полимальтозный комплекс железа проявляет намного более слабую гепатотоксичность. Курсовое применение Лаеннека в течение 60 сут после хронической перегрузки организма железом снижает уровень накопления гемосидерина в печени, почках и головном мозге; способствует стабилизации физиологического обмена железа. Таким образом, после проведения курсов железо-содержащих препаратов (особенно на основе сульфата железа) весьма желательным является проведение реабилитационного курса препарата Лаеннек, способствующего снижению гемосидероза и восстановлению функциональной активности клеток печени, почек и головного мозга.

Литература

1. 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. 2013;12(1): 33–45.
2. Pal P., Mallick S., Mandal S.K., Das M., Dutta A.K., Datta P.K., Bera R., Bhadra R. A human placental extract: in vivo and in vitro assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. Int J Dermatol. 2002; 41(11): 760–767. doi: 10.1046/j.1365-4362.2002.01524.x
3. Lee Y.K., Chung H.H., Kang S.B. Efficacy and safety of human placenta extract in alleviating climacteric symptoms: prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Obstet Gynaecol Res. 2009; 35(6): 1096–1101. doi:10.1111/j.1447-0756.2009.01066.x
4. Минушкин О.Н., Масловский Л.В., Елизаветина Г.А., Калинин А.В., Дубовая Т.К., Диброва Е.А. Препарат «Лаеннек» в гастроэнтерологической практике. Кремлевская медицина. Кремлевский вестник. 2011; 3: 88–92.

5. Громова О.А., Торшин И.Ю., Минушкин О.Н., Диброва Е.А., Каримова И.М., Кустова Е.В. Об эффективности и молекулярных механизмах действия препарата «Лаеннек» в лечении патологических состояний печени, связанных с отложением железа в печени. Медицинский журнал «Дело Жизни». 2015; 1(1): 44–51.
6. Davis R.J., Faucher M., Racaniello L.K., Carruthers A., Czech M.P. 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.
7. Vera M., Sobrevals L., Zaratiegui M., Martinez L., Palencia B., Rodriguez C.M., 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): 203–210. doi:10.1038/sj.gt.3302858
8. Villareal D.T., Holloszy J.O., Kohrt W.M. Effects of DHEA replacement on bone mineral density and body composition in elderly women and men. Clin Endocrinol (Oxf). 2000; 53 (5): 561–568. doi:10.1046/j.1365-2265.2000.01131.x