

©Коллектив авторов

ВОЗМОЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОМБИНАЦИИ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ РАСТУЩЕЙ ПЕЧЕНИ, ДЛЯ ЕЁ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Э.И. Гальперин¹, Р.И. Атауллаханов², Т.Г. Дюжева¹, Л.В. Платонова¹, Т.М. Мельникова³, М.Ю. Монаков⁴, А.М. Дудченко⁴, А.В. Люндун¹, И.Д. Клабуков^{1*}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; эл. почта: ilya.klabukov@gmail.com

²Государственный научный центр “Институт иммунологии”, Москва

³Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского, Москва

⁴Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва

Отсутствие приемлемого фармакологического решения для восстановления поврежденной печени обусловлено сложностью механизмов регенерации печени и трудностями выбора мишени для воздействия. Целью исследования являлось изучение гепатопротекторной функции экстракта из растущей и регенерирующей печени, содержащего естественный набор факторов, направленных на восстановление органа. Источник получения экстракта: регенерирующая печень крыс после 70% резекции и растущая печень неонатального поросёнка. Экстракт получали по оригинальной разработанной нами методике, отличающейся от способа LaBrequé и соавт. (1975 г.), назвали его *hepatic regeneration set* (HRS). Проводили фракционирование HRS на сорбенте Toyopearl HW-50S. Эффективность действия HRS и фракций оценивали на модели токсического повреждения печени мышей тиацетамидом по активности аминотрансфераз в сыворотке крови. Активность АСТ и АЛТ у интактных животных составила 50 и 80 Е/л, после введения тиацетамида – 2059±212 и 4280±440 Е/л (p<0,05). При использовании HRS из регенерирующей печени крыс активность АСТ составила 924±148 Е/л (p<0,05), АЛТ – 1633±308 Е/л (p<0,05). При использовании HRS из печени неонатального поросёнка активность АСТ составила 937±138 Е/л (p<0,05), АЛТ – 1710±237 Е/л (p<0,05). Выделены две активные фракции, превышающие эффект цельного экстракта в 8-29 раз. Определён диапазон молекулярных масс белковых составляющих активных фракций: 3-60 кДа (фракция 1) и 3-25 кДа (фракция 2а). Показано наличие полинуклеотидов в высокомолекулярной фракции. Таким образом, разработана методика получения естественного набора факторов, полученных из регенерирующей и растущей печени модельных животных, доказана эффективность их использования на модели токсического повреждения печени при отсутствии видовой специфичности. Выявленные белковые и полинуклеотидные фракции, значительно превышающие эффект цельного экстракта, являются основанием для дальнейшей идентификации их составляющих методами иммунохроматографии, ИФА, MRM масс-спектрометрии и ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова: регенерирующая печень, растущая печень, экстракт, токсическое повреждение печени, тиацетамид, комбинация регенерирующей печени, гепатопротективная активность

DOI: 10.18097/PBMC20176305440

ВВЕДЕНИЕ

В 1975 г. LaBrequé et al. [1] показали, что экстракт регенерирующей печени, полученный через 36-48 ч из оставшейся части после её 70%-ной резекции, инициирует и усиливает регенерацию повреждённой печени реципиента в отличие от экстракта, полученного из интактной печени. Экстракт был назван *hepatic stimulator substance* (HSS). В дальнейших многочисленных исследованиях было подтверждено, что такой экстракт усиливает регенерацию и улучшает функциональное состояние печени при различных её повреждениях [2-4].

Есть основания предполагать, что в основе функциональной недостаточности печени при массивных поражениях лежит снижение продукции активных компонентов, составляющих HSS в органе, а введение экстракта из регенерирующей ткани может способствовать быстрому восстановлению органа [3]. Gribilas и др. показали, что содержание компонентов HSS значительно снижено в печени

при экспериментальном циррозе, возникающем через 3 месяца введения тиацетамида (ТАА). Введение HSS предотвращало развитие цирроза печени, стимулировало её регенеративную способность [5]. Yi и др. в опытах на крысах показали, что HSS снижает уровень активных форм внутрипеченочного кислорода, снижает экспрессию трансформирующего фактора роста, тромбоцитарного фактора роста и тканевого ингибитора металлопротеиназы [6].

Роль эндогенных факторов в индукции регенерации печени хорошо изучена. Среди них известны факторы роста и цитокины HGF, EGF, HB-EGF, TGF- α , IL-6 и др. [7-9]. В последние годы были достигнуты успехи в изучении семейства полипептидных гепатопротективных факторов – усилителей регенерации печени у человека и экспериментальных животных [2, 4, 6, 7]. Они тканеспецифичны, не обладают видоспецифичностью [4, 10], и эффективны как усилители процессов клеточной пролиферации в поврежденной печени.

Частичная очистка HSS показала, что его основным действующим веществом является белок, названный *augmenter of liver regeneration* (ALR). ALR, секретируемый гепатоцитами, стимулирует синтез TNF- α , IL-6, оксида азота в клетках Купфера. ALR участвует в окислительном фосфорилировании в митохондриях, проявляет ферментативную активность (сульфгидроксидазы, цитохром *c*-редуктазы) [11].

Стремление многих авторов обнаружить в HSS какое-то одно действующее соединение не приводило к положительным результатам [12]. В связи с этим мы предположили, что для восстановления печени после повреждения необходима совокупность участвующих активных ингредиентов [13, 14]. Получение такой совокупности факторов при дальнейшей очистке HSS и проведении сложных экспериментальных исследований требует получения большого количества экстракта.

В связи с этим в качестве источника набора активных биологических соединений мы использовали печень неонатального поросёнка, для которой имеются лишь отдельные исследования гепатопротективных факторов. Так, Hiyoshi и др. выделили из кондиционной среды с фрагментами печени неонатального поросёнка два фактора пролиферации гепатоцитов с молекулярной массой (М.м.) 26-31 кДа и 71-90 кДа, которые стимулировали синтез ДНК в первичной культуре гепатоцитов [15].

Мы разработали оригинальную методику получения экстракта из регенерирующей и растущей печени модельных животных [16], назвав его *hepatic regeneration set* (HRS).

Цель исследования: изучение гепатопротекторной функции экстракта HRS, состава и активности его отдельных фракций.

МЕТОДИКА

Дизайн исследования

Выполнена экспериментальная работа по получению активных фракций из печени неонатального поросёнка и изучению их гепатопротективного действия *in vivo*.

Условия проведения

Для экспериментов на животных использовали крыс породы Вистар массой 130–160 г и белых лабораторных мышей массой 19–21 г. Забор печени производили у самцов половозрелых крыс весом 190–210 г и самцов 2–3 дневных поросят. У крыс производили 70% резекцию печени по методике Higgens и Anderson [14]. Через 48 ч после операции животных забивали декапитацией. Оставшуюся часть печени забирала после промывания физиологическим раствором. Поросёнку под внутрибрюшинным наркозом раствора гексенала выполняли лапаротомию в правом подреберье, производили забор печени.

Получение экстрактов печени

Для получения экстрактов печени использовали технологию, подробно описанную в патенте Гальперина и соавт. [16]. Свежевыделенную печень размельчали в гомогенизаторе в дистиллированной воде в соотношении 1:3-5 при +3-5°C, гомогенат центрифугировали, супернатант прогревали 7-10 мин. при температуре от 20°C до 38°C, доводили до 100°C и прогревали 15-20 мин – при 100°C. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием (5000 об/мин, 15 мин.). К супернатанту добавляли этанол до концентрации 65-70%, выдерживали 15-17 ч при -18÷20°C, осадок удаляли центрифугированием. Спирт из супернатанта удаляли на роторном испарителе. Полученный экстракт ткани печени хранили при -65÷70°C.

Хроматографическое фракционирование экстракта печени

Гель-проникающую хроматографию выполняли на жидкостном хроматографе “Laboratorni pristroje” (Чехия), детектор – дифференциальный рефрактометр RIDK-102, колонка 850×30 мм (LKB, Швеция), сорбент Toyopearl HW-50S (“Sigma-Aldrich”, США), элюент – дистиллированная вода.

Экстракт печени неонатального поросёнка (5 мл) наносили на колонку в дистиллированной воде. С колонки собирали фракции объёмом 5 мл. Множество пиков хроматограммы собирали в пять фракций – 1, 2а, 2б, 3 и 4. Объединённые фракции лиофилизировали.

Электрофорез активных фракций в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия

Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS в трис-трициновой буферной системе позволяет добиться лучшего разделения белков с небольшими М.м. Использовали разделяющий гель с концентрацией акриламида и метиленбисакриламида: Т=16% и С=6%. Использовали стандартные белки с М.м. от 116 до 14,4 кДа. Детекция белков на гелевых пластинах проводилась окрашиванием Кумасси R-250.

Подготовка образцов для исследования нуклеиновых кислот

Образцы фракции 1 разводили в фосфатном буфере до концентрации 5 мг/мл. Проводили агарозный гель электрофорез с добавлением бромистого этидия исходных образцов и образцов, обработанных РНКазой.

Часть образцов переосаждали спиртом: к 200 мкл раствора образца добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали, центрифугировали, верхнюю фазу переносили в новую пробирку, добавляли 1/10 объёма 3 М ацетата натрия и 0,9 объёма изопропанола, инкубировали 2 ч при -20°C, центрифугировали 15 мин при 13000 об/мин, супернатант удаляли, осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в 25 мкл воды. Проводили агарозный гель-электрофорез с добавлением бромистого этидия. В исследуемых образцах определена концентрация нуклеиновых кислот (НК).

*Методы регистрации исходов***Модель токсического повреждения печени *in vivo***

Для изучения воздействия экстрактов и частично очищенных фракций *in vivo* использовали ранее разработанную модель токсического повреждения печени мышей путём внутрибрюшинного введения раствора гепатотоксина ТАА (“Acros”, США) из расчёта 250 мг/кг веса [14]. Через 48 ч собирали кровь животных. В сыворотке крови опытных и интактных мышей определяли активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), используя наборы реактивов (ООО “Диакром”, Россия).

Определение биологической активности экстрактов и выделенных фракций

Экстракты и фракции вводили в брюшную полость мышам через 2 ч после введения ТАА в количестве 0,023 мл на 1 г массы мыши, как было подобрано ранее [3]. Забор крови у мышей производили через 48 ч после введения ТАА. В сыворотке крови мышей измеряли активность аминотрансфераз АСТ и АЛТ.

Для оценки эффективности воздействия экстрактов и фракций рассчитывали индекс восстановления печени в % по формуле 1.1:

$$\frac{\text{АСТ (АЛТ) в контроле} - \text{АСТ (АЛТ) в опыте}}{\text{АСТ (АЛТ) в контроле}} \times 100\% \quad (1.1),$$

где АСТ или АЛТ в контроле – активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови контрольных животных, которым вводили ТАА; АСТ или АЛТ в опыте – активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови опытных животных, которым после ТАА вводили экстракт или хроматографическую фракцию.

Удельный индекс восстановления печени рассчитывали (в %/мг сухого веса) путём деления величины индекса восстановления печени на количество сухого вещества (экстракта или фракции), введенного одной мышью.

Этическая экспертиза

Содержание животных и манипуляции с ними проводили в соответствии с требованиями

законодательства об этике проведения экспериментальных исследований на животных, одобренными Локальным этическим комитетом.

Статистический анализ

Экспериментальные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка измерений среднего. Статистическую значимость определяли по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ*Оценка эффективности экстрактов из различных источников*

В таблице 1 представлены данные активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови интактных животных, мышей, которым вводили только ТАА, а также мышей, которым наряду с ТАА вводили экстракты, полученные из регенерирующей печени крыс после её 70%-ной резекции и печени неонатального поросёнка. Введение мышам гепатотоксина ТАА вызывало повышение активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови в 41 и 53 раза, соответственно. Введение мышам с повреждённой печенью экстракта из регенерирующей печени приводило к снижению активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови животных в 2,2 и 2,6 раз ($p < 0,05$), при введении экстракта из печени неонатального поросёнка – в 2,2 и 2,5 раза ($p < 0,05$), соответственно.

Для выяснения правомерности использования печени неонатального поросёнка в качестве источника биологически активных соединений с регенерирующей активностью мы сравнили эффективность воздействия экстрактов из регенерирующей печени крысы после 70%-ной резекции и печени неонатального поросёнка на повреждённую печень мышей.

Проведенные исследования показали, что эффективность экстракта из печени неонатального поросёнка сравнима с эффективностью экстракта из печени крыс после её резекции, что позволяет рассматривать печень неонатального поросёнка в качестве источника большого количества биологически активного материала.

Таблица 1. Активность АСТ и АЛТ в сыворотке крови интактных мышей и мышей с моделью токсического повреждения печени до- и после введения экстрактов, полученных из печени крыс после 70%-ной резекции и печени неонатального поросёнка

Группы исследования	n	АСТ		АЛТ	
		активность, Е/л	индекс восстановления печени, %	активность, Е/л	индекс восстановления печени, %
Интактные мыши	3	50 \pm 5	-	80 \pm 7	-
Повреждение печени мышей ТАА (контроль)	130	2059 \pm 212	0	4280 \pm 440	0
Экстракт из печени крыс после 70%-ной резекции	224	924 \pm 148	55 $p < 0,05^*$	1633 \pm 308	62 $p < 0,05^*$
Экстракт из печени неонатального поросёнка	128	937 \pm 138	54 $p < 0,05^*$	1710 \pm 237	60 $p < 0,05^*$

Примечание: * - достоверность относительно контроля.

Фракционирование экстракта и определение активности фракций

С целью получения материала с более высокой биологической активностью проведено хроматографическое фракционирование экстракта из печени неонатального поросёнка с помощью гель-фильтрации на колонке с Toyopearl HW-50S. Как видно из профиля хроматографической элюции (рис. 1), экстракт представляет собой сложную многокомпонентную смесь веществ. Множество пиков хроматограммы собирали в пять фракций (1, 2а, 2б, 3, 4).

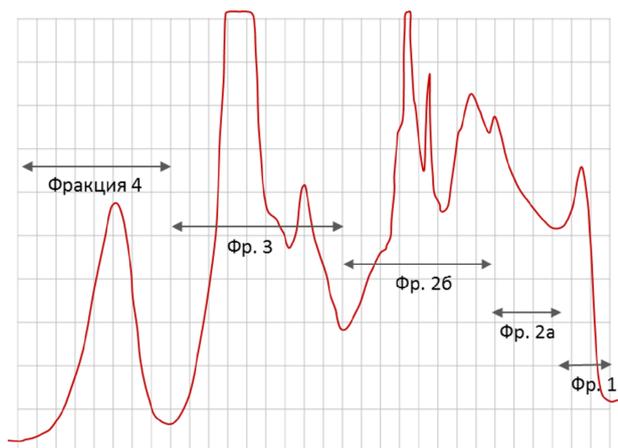


Рисунок 1. Гель-проникающая хроматография экстракта печени неонатального поросёнка на колонке с Toyopearl HW-50S (по оси абсцисс - фракции, по оси ординат - показания рефрактометра).

Фракция 1 (высокомолекулярная) составляла 5-8% от сухого веса исходного экстракта, фракция 2а – 14-16% , фракция 2б – 16-18% , фракция 3 – 40-49%, фракция 4 (низкомолекулярная) – около 1%.

Для выявления фракций, содержащих биологически активные вещества, определяли воздействие всех полученных фракций на поврежденную печень мышей. Модель повреждения печени и оценочные критерии её восстановления оставались теми же, что и в опытах с изучением экстрактов из печени крысы и поросёнка (табл. 1).

В таблице 2 представлены данные активности аминотрансфераз АСТ и АЛТ в сыворотке крови мышей с поврежденной печенью после введения ТАА, а также экстракта и его фракций.

Проведенные исследования показали, что фракции 1 и 2а показали выраженный эффект (индекс восстановления печени по АСТ составил 48 и 61%, по АЛТ – 43 и 47%, соответственно), тогда как фракции 2б, 3 и 4 не оказывали достоверного эффекта по снижению активности АСТ и АЛТ на модели токсического повреждения печени.

Величины удельного индекса восстановления печени под действием экстракта печени неонатального поросёнка и активных фракций 1 и 2а представлены в таблице 2.

Таким образом, в результате хроматографического фракционирования экстракта из печени неонатального поросёнка получены активные фракции с удельным индексом восстановления печени, превышающим индекс восстановления печени под действием экстракта, для фракции 1 в 29 и 21 раз (по АСТ и АЛТ) и для фракции 2а – в 13 и 8 раз (по АСТ и АЛТ).

Таблица 2. Активность АСТ и АЛТ в сыворотке крови мышей с токсическим повреждением печени до и после введения экстракта печени неонатального поросенка и выделенных фракций

Группы исследования	n	Количество сухого вещества, мг**	АСТ			АЛТ		
			активность, Е/л	индекс восстановления печени, %	удельный индекс восстановления печени, %/мг веса	активность, Е/л	индекс восстановления печени, %	удельный индекс восстановления печени, %/мг веса
Повреждение печени мышей при введении ТАА (контроль)	10	-	836±68	0	-	886±150	0	-
Экстракт из печени поросенка	10	14,18	621±61	26	1,8	613±80	31 p<0,05*	2,2
Фракция 1	10	0,94	437±162	48 p<0,05*	52,1	507±112	43 p<0,05*	45,7
Фракция 2а	10	2,65	327±65	61 p<0,05*	22,6	471±142	47 p<0,05*	17,7
Фракция 2б	9	--	670±71	20	-	688±119	22	-
Фракция 3	10	-	635±79	24	-	753±122	15	-
Фракция 4	9	-	657±91	21	-	705±101	20	-

Примечание: * - достоверность относительно контроля; ** - количество сухого вещества, введённое одной мышью, мг.

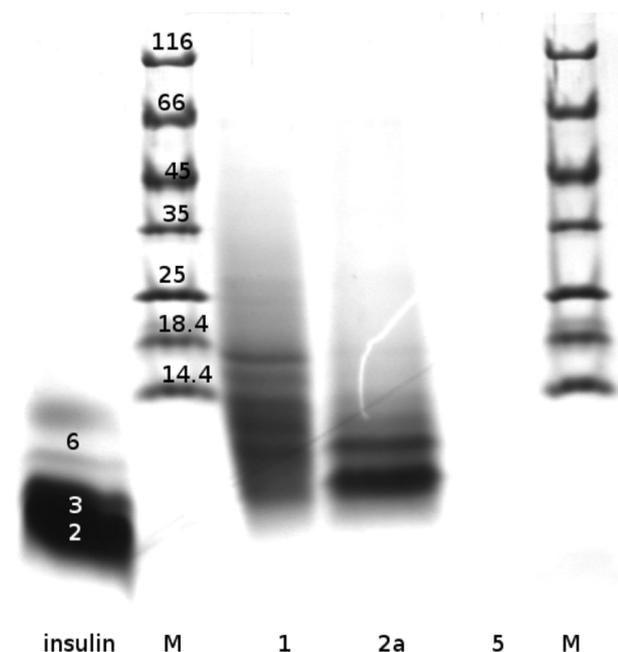


Рисунок 2. Электрофорез в полиакриламидном геле (16%) в трис-трициновой системе в присутствии SDS: дорожка "insulin" - 2 - цепь А инсулина (21 аминокислотный остаток), 3 - цепь В инсулина (30 аминокислотных остатков), 6 - инсулин (М.м. 5,73 кДа); дорожка М - стандартные белки с М.м. от 116 (бета-галактидаза) до 14,4 (лизоцим) кДа; дорожка 1 - фракция 1; дорожка 2а - фракция 2а.

Изучение белкового и нуклеотидного состава фракций

Оценку диапазона М.м. белков в активных фракциях 1 и 2а проводили с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (рис. 2).

Проведённое исследование показывает, что в образце фракции 1 присутствуют белок с м.м. около 60 кДа и полипептиды массой от 3 до 35 кДа (мажорные компоненты – около 15, 16, 14, 10, 8, 6 кДа), в образце фракции 2а полипептиды массой от 3 до 25 кДа (мажорные компоненты — около 6 и 3 кДа).

Агарозный гель-электрофорез показал отсутствие высокомолекулярных НК во фракции 1. Концентрация НК в исходных образцах фракции 1 составила $0,549 \pm 0,161$ мг/мл, а после осаждения этиловым спиртом $0,063 \pm 0,024$ мг/мл. При переосаждении спиртом выпадают в осадок только высокомолекулярные НК, короткие НК и нуклеотиды остаются в супернатанте. После переосаждения, несмотря на меньший в 8 раз объём, оптическая плотность при 260 нм упала в 4-16 раз, что говорит об отсутствии высокомолекулярных НК в образцах. Таким образом, НК во фракции 1 представлены низкомолекулярными полинуклеотидами (не более 10 оснований).

Обсуждение

Проведённые исследования на животных показывают, что значительный прогресс в лечении тяжелых заболеваний печени может быть получен с помощью тканевых индукторов, полученных

из регенерирующей печени, обладающих гепатопротективными свойствами, механизм действия которых не видоспецифичен.

Наиболее распространённым способом получения экстракта печени, обладающего регенеративной активностью, является описанный в 1975 г. LaVreque и др. способ получения цитозольной фракции печени крыс, подвергнутых частичной её резекции [1]. Отличительной особенностью технологических приемов, используемых нами при получении экстрактов из ткани печени, является стадия прогревания гомогената ткани печени при температуре от 20°C до 38°C [16]. Использование этой процедуры направлено на активацию эндогенных протеолитических ферментов и процессингу природных высокомолекулярных соединений с образованием низкомолекулярных соединений с широким спектром биологического действия. Например, ограниченный протеолиз высокомолекулярных белков (гемоглобина, актина, фибронектина и др.) приводит к образованию пептидов, обладающих свойством, которым не обладал высокомолекулярный предшественник, в том числе, пролиферативным эффектом. Некоторые ростовые факторы (HGF, TGF) секретируются в виде неактивных предшественников. Для HGF показано *in vitro*, что активация осуществляется на уровне внеклеточного гидролиза пептидной связи сериновой протеиназой – активатором плазминогена урокиназного типа [17]. Прогревание гомогената печени при указанной выше температуре обеспечивает протекание таких реакций.

Другой особенностью получения экстракта было то, что после обработки этанолом и последующего центрифугирования использовали супернатант, то есть спирторастворимую фракцию, в то время как LaVreque и др. использовали для исследования преципитат [1].

Имеется множество методов оценки действия экстрактов, полученных из печени. Их изучали на модели с частичной деваскуляризацией печени, резекцией печени различного объёма, а также с химическим повреждением печени токсическими веществами [3, 4, 18].

В данном исследовании выбор модели повреждения печени мышей ТАА был обусловлен следующими соображениями: это простая модель, так как не требует выполнения резекции печени, ограничивается однократным внутрибрюшинным введением гепатотоксина и наиболее приближена к токсическому повреждению печени в клинической практике. Для оценки эффективности экстракта измерялась активность аминотрансфераз АСТ и АЛТ в сыворотке крови животных, так как было показано [18], что эти показатели положительно коррелируют с выраженностью повреждения печени. Оценка состояния печени по активности ферментов АСТ и АЛТ проста, наглядна, не требует большого количества времени и финансовых средств.

В литературе отсутствуют сравнительные данные об активности разных экстрактов на одной модели повреждения печени, между тем это их свойство

является определяющим в выборе метода воздействия на повреждённую печень. Наши исследования, проведенные на большом количестве модельных животных (табл. 1), показали, что эффективность экстракта из печени неонатального поросёнка идентична эффективности экстракта, полученного из печени крыс после её 70%-ной резекции. Эти данные убеждают, что экстракт из печени неонатального поросёнка обладает активным восстановительным действием при повреждении печени, и механизм его действия не видоспецифичен. Отсутствие видоспецифичности допускает возможность экстраполяции данных о механизмах гепатопротекции при использовании гепатотропных фракций на ситуации, возникающие при диффузных заболеваниях печени у человека.

В данной работе была выполнена хроматография экстракта печени неонатального поросёнка (рис. 1) и выделены две активные фракции – фракция 1 и 2а (табл. 2).

В литературе имеется достаточно много сведений по выделению и очистке HSS из регенерирующей печени. Из резецированной печени крыс частично очистили HSS, используя набор хроматографических процедур [19, 20], имеются данные о выделении HSS из фетальной печени человека с помощью ряда методов хроматографии (ионообменной, гель проникающей, высокоэффективной жидкостной) [19]. В отношении экстрактов, полученных из печени неонатального поросёнка, таких данных нет. Нами получены фракции с удельным индексом восстановления печени, превышающим индекс восстановления печени под действием целого экстракта (HRS) в 21-29 (для фракции 1) и 8-13 (для фракции 2а). Это может быть связано с более высокой концентрацией специфичных гепатотропных факторов вследствие очистки цельного экстракта от соединений с противоположным эффектом, в том числе их ингибиторов.

В настоящем исследовании определён диапазон молекулярных масс белковых составляющих активных фракций 3-60 кДа (фракция 1) и 3-25 кДа (фракция 2а). Проведённые ранее исследования по определению диапазона М.м. основного компонента HSS, выявили следующие вариации диапазона: 15-18 кДа [1], 15-50 кДа [4]. Таким образом, в составе фракций могут существовать несколько активных соединений с различной эффективностью восстановления печени.

В настоящее время начаты исследования по изучению состава фракций. Предварительные результаты с учётом данных литературы позволили выделить факторы, масса которых попадает в определённый диапазон двух фракций HRS: 1 фракция (HPF-2 и hepatocyte growth factor) и 2а фракция (ALR), что практически исключает влияние интерлейкинов (IL-6, IL-10) и других неспецифичных факторов. Во фракции 1 также могут содержаться микроРНК-белковые комплексы, выделяющиеся неспецифически после повреждения клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

По оригинальной методике получен экстракт печени неонатального поросёнка (HRS), из которого выделены две активные высоко- и среднемoleкулярные фракции с удельным индексом восстановления печени, значительно превышающим этот показатель для не фракционированного HRS.

Показано отсутствие видоспецифичности гепатопротекторного действия HRS. Показано наличие полинуклеотидов в высокомолекулярной фракции. Полученные результаты позволяют продолжить дальнейшие исследования по идентификации активных составляющих HRS в белковых и полинуклеотидных фракциях методами иммунохроматографии, ИФА, MRM масс-спектрометрии и ПЦР в реальном времени.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №16-54-53090). Часть исследований была выполнена на оборудовании ЦКП “Регенеративная медицина” (ID310020) и ЦКП “Протеом человека” ИБМХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *LaBrecque D.R., Pesch L.A.* (1975) *J. Physiol.*, **248**(2), 273-284.
2. *Margeli A.P., Manolis E., Skaltsas S.N., Tsarpalis K.S., Mykoniatis M.G., Theocharis S.E.* (2002) *Digestive Diseases Sci.*, **47**(10), 2170-2178.
3. *Гальперин Э.И., Карагюлян С.Р., Абакумова О.Ю., Сванадзе Н.Л., Шехтер А.Б.* (1985) *Хирургия*, **61**(4), 82-87.
4. *Francavilla A., Ove P., Polimeno L., Coetzee M., Makowka L., Rose J., van Thiel D.H., Starzl T.E.* (1987) *Cancer Res.*, **47**(21), 5600-5605.
5. *Gribilas G., Zarros A., Zira A., Giaginis C., Tsourouflis G., Liapi C., Spiliopoulou C., Theocharis S.E.* (2009) *Digestive Diseases Sci.*, **54**(11), 2367-2376.
6. *Yi X., Song M., Yuan Y., Zhang X., Chen W., Li J., Tong M., Liu G., You S., Kong X.* (2012) *Digestive Diseases Sci.*, **57**(8), 2079-2087.
7. *Cressman D.E., Greenbaum L.E., DeAngelis R.A., Ciliberto G., Furth E.E., Poli V., Taub R.* (1996) *Science*, **274**(5291), 1379-1383.
8. *Xue F., Takahara T., Yata Y., Kuwabara Y., Shinno E., Nonome K., Minemura M., Takahara S., Li X., Yamato E., Watanabe A.* (2003) *Gut*, **52**(5), 694-700.
9. *Mitchell C., Nivison M., Jackson L.F., Fox R., Lee D.C., Campbell J.S., Fausto N.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**(4), 2562-2568.
10. *LaBrecque D.R.* (1991) *Digestive Diseases Sci.*, **36**(5), 669-673.
11. *Gandhi C.R.* (2012) *Fibrogenesis and Tissue Repair*, **5**(1), 10.
12. *Blindenbacher A., Wang X., Langer I., Savino R., Terracciano L., Heim M.H.* (2003) *Hepatology*, **38**(3), 674-682.
13. *Gal'perin E.I., Abakumova O.Y., Platonova L.V., Shono N.I., Chevokin A.Y., Sakevarashvili G.R., Tsvetkova T.A., Kondakova L.I.* (1999) *Bull. Exper. Biol. Med.*, **127**(1), 47-49.

14. Гальперин Э.И., Дюжева Т.Г., Платонова Л.В., Атауллаханов Р.И., Ионочкина Н.Н., Погосян Г.С., Кочергин М.В. (2008) *Анналы хирургической гепатологии*, **13**(1), 51-55.
15. Hiyoshi M., Ohkubo T., Tsuji K., Hagihara M., Nakasaki H., Mukai M., Makuuchi H., Yamamura M., Tsuda M. (2002) *BioFactors*, **16**(102), 1-14.
16. Гальперин Э.И., Дюжева Т.Г., Абакумова О.Ю., Платонова Л.В. (2015) Способ получения вещества, стимулирующего регенерацию повреждённой печени. Патент РФ 2548750.
17. Miyazawa K. (2010) *FEBS J.*, **277**(10), 2208-2214.
18. Margeli A.P., Skaltsas S.D., Spiliopoulou C.A., Mykoniatis M.G., Theocharis S.E. (1999) *Liver*, **19**(6), 519-525.
19. Yao Z.Q., Yang W.S., Chen B.F., Shang P., Zhang W.B., Chen Y. (1993) *Chinese Med. J.*, **106**(7), 527-532.
20. LaBrecque D.R., Steele G., Fogerty S., Wilson M., Barton J. (1987) *Hepatology*, **7**(1), 100-106.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 11. 09. 2017.

POSSIBLE USE OF THE GROWING LIVER BIOLOGICAL SET FOR HEPATIC RECOVERY AFTER TOXIC DAMAGE (AN EXPERIMENTAL STUDY)

E.I. Gal'perin¹, R.I. Ataullakhanov², T.G. Dyuzheva¹, L.V. Platonova¹, T.M. Melnikova³, M.Yu. Monakov⁴, A.M. Dudchenko⁴, A.V. Lyundup¹, I.D. Klabukov¹

¹Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; e-mail: ilya.klabukov@gmail.com

²NRC Institute of Immunology, Moscow, Russia

³Institute of Organic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

The lack of acceptable pharmacological approaches for restoration of the injured liver is associated with complex of mechanisms involved in hepatic regeneration and with difficulty of the target selection. The aim of this research was to study the hepatoprotective function of the extract from both the growing and regenerating liver containing a natural set of factors crucial for the hepatic restoration. Extracts from both regenerating liver of rats after 70% hepatic resection and the growing liver of neonatal pigs were obtained using own original technique. The set of resultant extracts was named as the hepatic regeneration set (HRS). HRS fractionation was carried out using the Toyopearl HW-50S sorbent. The efficiency of HRS and its fractions was estimated using a model of the mouse liver thioacetamide injury and monitoring hepatic enzyme activity in blood serum. The activities of AST and ALT in intact animals were 50 U/l and 80 U/l, respectively; after thioacetamide administration they increased to 2059±212 U/l and 4280±440 U/l, respectively (p<0.05). Treatment of injured animals with HRS from the rat regenerating liver resulted in a significant decrease of transaminase activities to 924±148 U/l (AST; p<0.05) and 1633±308 U/l (ALT; p<0.05). A similar effect was observed after treatment with HRS from the neonatal pig liver: the AST decreased to 937±138 U/l (p<0.05), while ALT activity decreased to 1710±237 U/l (p<0.05). HRS fractionation resulted in identification two active fractions characterized by much higher (8-29) hepatotropic effect that that of the whole extract. These fractions contained peptide/protein components with the range of molecular mass of 3-60 kDa (fraction 1) and 3-25 kDa (fraction 2a). Fraction 1 also contained some polynucleotides in fraction 1. Subsequent studies of these fractions exceeding the hepatotropic effect of original HRS is clearly needed to identify their individual components by immunochromatography methods, ELISA, MRM mass spectrometry and quantitative PCR.

Key words: regenerated liver, growing liver, extracts, toxic hepatic injury, thioacetamide, hepatic regeneration set, hepatoprotective activity