

Лебедева Е. И., Мяделец О. Д., Дубина И. Н., Шиленок А. В., Голубцов В. В.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У БЕСПОРОДНЫХ БЕЛЫХ КРЫС

*Витебский государственный медицинский университет,
Научно-исследовательский институт прикладной ветеринарной медицины
и биотехнологии,*

Витебская областная клиническая больница, Беларусь

В комплексной разработке проблем этиологии, патогенеза, патоморфологии, клиники и терапии болезней печени у человека важное место занимает экспериментальная патология печени. Следует, однако, отметить, что данные о состоянии энергетического метаболизма гепатоцитов, содержании гликогена, развитии фиброзной ткани при циррозе не столь однозначны. По-видимому, одной из главных причин противоречивости данных об изменениях в цирротической печени является то, что авторы используют в своих работах разные экспериментальные модели цирроза (Fernandez-Checa et al., 1993; Fukumura et al., 2003; Huang et al., 2003; Yang et al., 2004). Различие моделей цирроза печени включает в себя не только применение в ходе эксперимента разных повреждающих агентов поодиночке или в сочетании, разную их концентрацию, продолжительность воздействия на животных, но также разные критерии оценки конечного результата. Немногочисленны работы по комплексному изучению состояния печени при токсическом алкогольном циррозе. Модель подострого «алкогольного гепатита» можно получить путем внутрижелудочного введения 40 % раствора этанола. Более существенных нарушений функции печени удастся достичь при комбинированном введении четыреххлористого углерода и этанола. Механизм повреждения паренхимы печени при этом аналогичен, однако степень и глубина пора-

жения клеток повышается вследствие синергизма этих веществ [1, 2]. Следует отметить, что универсальной экспериментальной схемы с внутрижелудочным введением четыреххлористого углерода для создания модели хронического токсического поражения печени, пригодной для оценки безопасности новых фармакологических препаратов и изучения патологического процесса в динамике, пока не предложено. Критериями достоверной экспериментальной модели могут служить хорошая воспроизводимость результатов, низкая смертность животных, использование модели многими исследователями, возможность проведения многократных биопсий, что позволяет изучать патологический процесс в динамике [3].

В связи с этим представляется целесообразным изучить и проанализировать особенности биохимических показателей сыворотки крови и морфофункциональных изменений в ткани печени в динамике у беспородных белых крыс с моделью хронического токсического поражения печени, созданного сочетанным действием четыреххлористого углерода (CCl_4) и этанола методом свободного выпаивания. Для выполнения поставленной цели исследования были поставлены следующие **задачи**: разработать схему эксперимента; создать группы животных, равноценные по возрасту, живой массе и условиям содержания; смоделировать токсический алкогольный цирроз у беспородных белых крыс; выявить патоморфологические закономерности и сроки наступления изменений в печени беспородных белых крыс после введения CCl_4 и этанола в различные сроки; определить некоторые биохимические показатели сыворотки крови животных.

Материалы и методы

Исследования проводили на 100 беспородных белых крысах обоего пола массой 180–250 г в весенне-летний период. Животных содержали в стационарных условиях вивария НИИ ВГМУ в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.2.12-18-2006. Животные были разделены на 3 группы. 1-я группа: крысы внутрижелудочно получали 40%-ный масляный раствор CCl_4 в дозе 0,2 мл/100 г массы тела животного 2 раза в неделю (в утренние часы в одно и то же время за 4 часа до кормления), параллельно с этим вместо воды крысы получали в качестве питья 5%-ный раствор этанола в течение 16 недель; 2-я группа (плацебо) — крысы получали только эквивалентное (в дозе 0,2 мл/100 г массы тела животного) количество растворителя CCl_4 (оливковое масло) и в качестве питья использовали кипяченую воду; 3-я группа — интактные крысы того же возраста и веса, что и исследуемые. Животных опытной группы выводили из эксперимента путем декапитации без использования наркоза с применением гильотины на 6, 9, 12, 16 недель после их 14 часового голодания, в утренние часы. Животных контрольной и интактной групп выводили из опыта по окончании эксперимента. Все биохимические исследования были выполнены в день забора крови согласно утвержденным инструкциям и законодательным актам. Для определения активности индикаторных ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) использовали кинетический метод без применения пиридоксаля; щелочной фосфатазы (ЩФ) — кинетический метод с образованием 4-нитрофенола. Для оценки углеводного и белкового обмена у экспериментальных животных определяли в сыворотке крови содержание глюкозы, общего белка, мочевины, креатинина. Концентрацию глюкозы определяли унифицированным глюкозаоксидазным

методом; концентрацию общего белка — биуретным методом; мочевины — ферментативно — кинетическим с уреазой; креатинина — кинетическим методом, основанным на реакции М. Jaffe. Для оценки липидного обмена в плазме крови определяли содержание общего холестерина и общих триглицеридов. Холестерин определяли энзиматическим колориметрическим (РАР-методом); триглицерид — энзиматическим колориметрическим М. W. McGowan et al. Биохимические исследования крови крыс проводили с использованием готовых наборов реагентов фирмы «Corma» с помощью автоматического биохимического анализатора EUROlyser. Для гистологического исследования кусочки печени фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм, окрашенные гематоксилином-эозином и по методу Массона, изучали с использованием светового микроскопа OLYMPUS BX41 при увеличении $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$. Степень фиброзных изменений печени оценивали по шкале Knodell. Полученные результаты были обработаны статистическими общепринятыми методиками.

Результаты и обсуждение

Во второй и третьей группах животных (плацебо, интактные) структура печени соответствовала норме. В первой группе моно-мультилобулярный цирроз печени умеренной стромальной и слабой паренхиматозной активности с преобладанием жировой паренхиматозной дистрофии гепатоцитов (75 %) подтвержден у самцов к концу 9-й недели, а у самок к концу 16-й недели интоксикации визуальным осмотром брюшной полости, биохимическими и гистологическими исследованиями печени. Степень фиброза соответствовала 4-м баллам по шкале Knodell. У животных отмечались невыраженная желтушность кожных покровов, гиподинамия, выпадение волос, плотная поверхность печени, зернистость, закругленность краев, достоверное увеличение относительной массы печени у самцов в 2,5 раза и у самок в 3 раза. Морфологически наблюдалась белковая и жировая дистрофия гепатоцитов, воспалительно-клеточная инфильтрация стромы, потеря балочной структуры паренхимы печени, разрастание соединительной ткани, узловая трансформация паренхимы печени с формированием ложных долек, разделенных между собой фиброзными тяжами. Наряду с дистрофией, некрозом, фибробластическими процессами и перестройкой печеночных долек, почти во всех случаях в разной степени наблюдались признаки слабовыраженной регенераторной активности. Она проявлялась гипертрофией гепатоцитов и наличием небольшого количества двуядерных клеток. В ходе эксперимента смертность самцов превысила достоверно смертность самок. После внутрижелудочного введения в течение 16 недель четыреххлористого углерода и этанола животным в сыворотке крови отмечалось достоверное увеличение ЩФ: у самцов в 4,3 раза у самок — в 3,3, АЛТ — у самцов в 3,6 раза у самок — в 2,5 раза, АСТ — у самцов и самок в 1,9 раза, холестерина у самцов и самок — в 1,6 раза, общего белка — у самцов и самок в 1,2 раза, креатинина — у самцов и самок в 1,2 раза, триглицеридов у самцов — в 1,2 раза; при этом содержание триглицеридов у самок осталось без изменений по сравнению с интактной и контрольной группами животных. Вместе с этим, наблюдалась тенденция к достоверному снижению мочевины: у самцов в 1,5 раза у самок — в 1,2 раза. Содержание глюкозы в сыворотке крови у экспериментальных животных оставалось без изменений.

Выводы. Предложенный способ моделирования цирроза печени в эксперименте является надежным и легковоспроизводимым. Развитие у животных цирроза печени сопровождается выраженными нарушениями углеводного, жирового и белкового обмена, о чем свидетельствуют изученные биохимические показатели. Предложенный способ моделирования цирротического поражения печени приводит к развитию моно-мультилобулярного цирроза, который у самцов формируется значительно раньше, чем у самок (соответственно 9-я и 16-я неделя эксперимента). Соответственно изученные биохимические показатели у самок были менее выраженными, чем у самцов. Это может свидетельствовать о большей устойчивости самок, чем самцов к действию токсических гепатотропных веществ, что определяется различным гормональным статусом у этих животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доклиническое исследования лекарственных средств : метод. рекомендации / под ред. А. В. Стефанова. Киев : Авиценна, 2002. 568 с.
2. Скакун, Н. П. Эффективность антиоксидантов при комбинированном поражении печени четыреххлористым углеродом и этанолом / Н. П. Скакун, С. Ф. Ковальчук // Фармакология и токсикология. 1987. Т. 50, № 3. С. 97–100.
3. Экспериментальная патология печени. Серия «Экспериментальная медицина 16». Рига : Зинатне, 1983. 148 с.