

16. Crock, H. V. Anatomic studies of the circulation in the region of the vertebral endplate in adult greyhound dogs / H. V. Crock, M. Goldwasser // Spine. — 1984. — Vol. 9, № 7. — P. 702–706.

17. Factors involved in the nutrition of the human intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro / A. Marouds [et al.] // J. Anat. — 1975. — Vol. 120, № 1. — P. 113–130.

18. Moore, R. J. The vertebral endplate: disc degeneration, disc regeneration / R. J. Moore // Eur. Spine. J. — 2006. — Vol. 15, Suppl. 3. — P.333–337.

19. Demonstration of vertebral body end plate veins by magnetic resonance imaging // W. R. Saywell [et al.] // Br. J. Radiology. — 1989. — Vol.62. — P. 290–292.

Поступила 18.10.2011

УДК 616.36-004

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ

А. Г. Скуратов¹, А. Н. Лызиков¹, Е. В. Воропаев¹, С. Л. Ачинович², Б. Б. Осипов²

¹Гомельский государственный медицинский университет

²Гомельский областной клинический онкологический диспансер

Цель исследования: отработать в эксперименте модели острого и хронического токсического повреждения печени, оценить возможности их использования для изучения процессов регенерации печени и ее коррекции.

Материалы и методы: белые крысы-самцы линии Vistar; внутривентрикулярное введение 50 % раствора тетрахлорметана на оливковом масле; внутрижелудочное введение ацетаминофена; морфологические и морфометрические методы.

Результаты. В эксперименте получена модель токсического гепатита и цирроза печени. Цирроз печени является постнекротическим и преимущественно мультилобулярным.

Заключение. Тетрахлорметановая модель токсического гепатита и цирроза печени может быть использована для воспроизведения данной патологии в эксперименте. Однако она не является оптимальной, так как чувствительность крыс к тетрахлорметану неодинакова, изменения в печени носят обратимый характер после отмены препарата.

Ключевые слова: острый токсический гепатит, цирроз печени, тетрахлорметан, ацетаминофен, крысы, экспериментальная модель.

EXPERIMENTAL MODELING OF TOXIC HEPATIC INJURY

A. G. Skuratov¹, A. N. Lyzikov¹, E. V. Voropayev¹, S. L. Achinovich², B. B. Osipov²

¹Gomel State Medical University

²Gomel Regional Oncological Clinic

Objective: to perfect in experiment models of acute and chronic toxic injuries of liver, to evaluate possibilities of their application to study the processes of liver regeneration and its correction.

Materials and methods: white male rats Vistar; intraperitoneal injection of 50 % solution of carbon tetrachloride made on olive oil; intragastric introduction of acetaminophen; morphological and morphometrical methods.

Results. The models of toxic hepatitis and hepatic cirrhosis were received in experiment. Hepatic cirrhosis is postnecrotic and mainly multilobular.

Conclusion. The carbon tetrachloride model of toxic hepatitis and cirrhosis can be used for reproduction of this pathology in experiment. However it is not optimal as the sensitivity of rats to carbon tetrachloride differs and the changes in liver have reversible character after the preparation cancellation.

Key words: acute toxic hepatitis, cirrhosis, carbon tetrachloride, acetaminophen, rats, experimental model.

Введение

В экономически развитых странах хронические заболевания печени и цирроз печени (ЦП) входят в число шести основных причин смерти пациентов от 35 до 60 лет, составляя 14–30 случаев на 100 тыс. населения. Ежегодно в мире умирают 40 млн. человек от цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, развивающейся на фоне носительства вируса гепатита В. В странах СНГ цирроз встречается у 1 % населения. Чаще наблюдается у мужчин: соотношение мужчин и женщин составляет в среднем 3:1. Заболевание может развиваться во всех возрастных группах, но чаще после 40 лет [1].

Чаще цирроз развивается при длительной интоксикации алкоголем (по разным данным, от 40–50 до 70–80 %) и на фоне вирусных гепатитов В, С и D (30–40 %). Более редкие причины цирроза — болезни желчевыводящих путей, застойная сердечная недостаточность, различные химические и лекарственные интоксикации. Цирроз может развиваться и при наследственных нарушениях обмена веществ (гемохроматоз, гепатолентикулярная дегенерация, недостаточность α 1-антитрипсина), и окклюзионных процессах в системе воротной вены (флебопортальный цирроз). Первичный биллиарный цирроз печени возникает без видимой

причины. Приблизительно у 10–35 % больных этиология остается неясна [1, 2].

Возрастание медицинской и социальной значимости хронических заболеваний печени требует новых усилий в разработке вопросов этиологии, патогенеза, иммунологии, диагностики, лечения и профилактики этих заболеваний.

В настоящее время радикальным хирургическим методом лечения циррозов печени является ортотопическая аллотрансплантация печени (С. В. Готье и соавт., 2005). Однако ее техническая сложность, дефицит донорских органов, высокая стоимость лечения ограничивают широкое внедрение этой операции в клиническую практику и стимулируют поиск новых доступных методов лечения [3]. Поэтому воспроизведение в эксперименте на животных моделей гепатита и цирроза печени, близких к клиническим условиям, все еще необходимо [4]. Экспериментальные модели позволяют дать комплексную оценку и разработать методы адекватной коррекции печеночной недостаточности, что не всегда возможно в клинических исследованиях.

Печеночную недостаточность у модельных животных можно вызвать различными способами. К их числу относятся: 1) хирургические способы — гепатэктомия и перевязка сосудов; 2) токсическое поражение печени (тетрахлорметан, тиацетамид, дипин и др.); 3) специальные диеты (холин-дефицитная и др.); 4) сочетание гепатотоксинов с гепатоканцерогенами, подавляющими пролиферацию гепатоцитов; 5) сочетание ретрорсина (ДНК-связывающий пирролизидиновый алкалоид) с гепатэктомией; 6) генетические модели. [5–10].

Среди токсических моделей широкое распространение получила модель ЦП, индуцированного тетрахлорметаном (CCl_4 , четыреххлористый углерод). При данной модели развитие фиброза связано с активацией цитохром Р450-зависимой монооксидазы, расположенной в гладкой эндоплазматической сети перивенулярных гепатоцитов, и с продукцией ими реактивных видов кислорода. Кроме того, сенсibilизация макрофагов способствует выработке провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6, фактор некроза опухоли α (TNF- α). Несмотря на то, что эти нарушения при прекращении действия токсина обратимы, длительное его применение может привести к формированию ЦП. Данная методика используется для крыс, мышей и кроликов. Наиболее эффективными способами введения препарата являются пероральный, интраперитонеальный или ингаляционный. Через 12–15 недель после начала эксперимента у 30–60 % животных формируется микронодулярный ЦП с портальной гипертензией, портосистемным шунтированием и гипердинамической циркуляцией,

через 16 нед появляются признаки варикозного расширения вен пищевода, а к 20 неделе развивается асцит [11, 12].

Однако в литературных источниках описаны противоречивые данные о предпочтении той или иной модели токсического повреждения печени. Указываются недостатки и преимущества различных моделей [13, 14].

Цель

Отработать в эксперименте модель острого и хронического повреждения печени, индуцированного тетрахлорметаном, изучить морфологические изменения в органах, оценить возможности использования этой модели для изучения процессов регенерации печени и ее коррекции.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с приказом Минвуза СССР №742 от 13 ноября 1984 г. «Об утверждении правил работ с использованием экспериментальных животных», Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях, принятой Советом Европы в 1986 г., согласно «Положению о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе Гомельского государственного медицинского института и мерах по реализации требований биомедицинской этики», утвержденному Ученым Советом ГГМУ № 54-А от 23.05.2002 года, и требованиями, регламентирующими работу с экспериментальными животными.

Моделирование токсического гепатита у белых крыс-самцов линии Вистар массой 200 г проводили путем внутрибрюшинного введения 50 % раствора CCl_4 на оливковом масле из расчета 1 мл на кг массы тела два раза в неделю. Для потенцирования развития цирроза печени вместо питьевой воды давали 10 % раствор этилового спирта. У линейных крыс вызывали острый гепатит введением CCl_4 в 50 % растворе на оливковом масле внутрибрюшинно однократно в дозе 1 мл/кг, во второй модели использовали парацетамол (ацетаминофен, ААФ) — в желудок однократно в дозе 1000 мг/кг. На 2, 20, 40, 60 день животных выводили из эксперимента и изучали общую морфологическую и морфометрическую картину органов [5]. Кусочки органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафиновые блоки по стандартной методике. Депарафинированные срезы печени окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону, после чего изучали общую морфологическую картину органа. Подсчитывали митотический индекс (МИ) для определения активности клеточной регенерации и индекс двуядерных гепатоцитов (ИДГ) для оценки степени внутриклеточной регенерации и ацитокинетической актив-

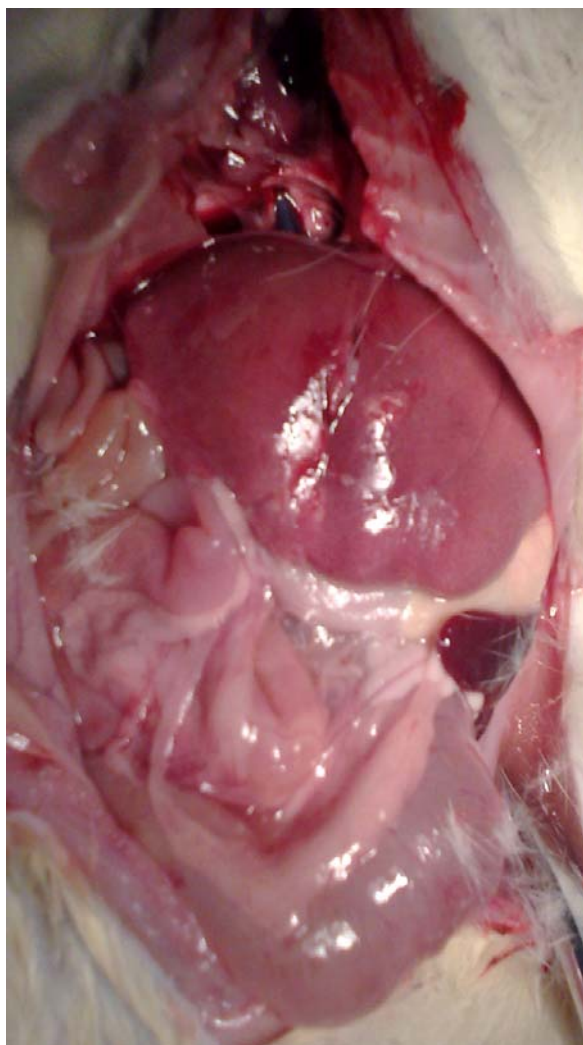
ности. Для оценки выраженности метаболических процессов, связанных с делением клеток, определяли диаметр ядер. Морфометрические исследования выполнялись с помощью аппаратно-системного комплекса Nikon Eclipse E200 с программой MorphoTest. Площадь поля зрения при увеличении $\times 400$ составила 211471 мкм^2 .

Результаты и обсуждение

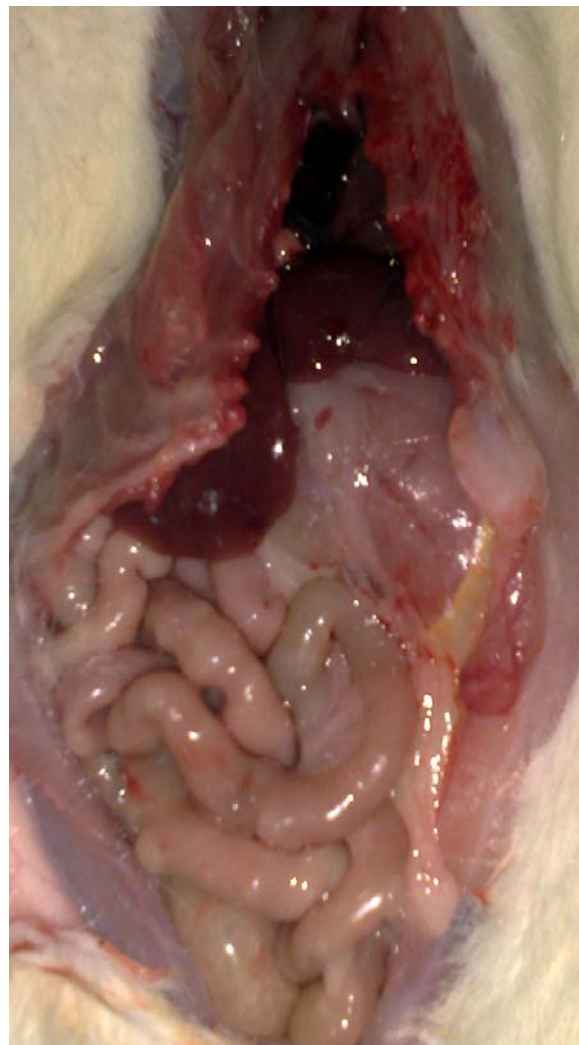
Тетрахлорметановый острый токсический гепатит (ОТГ) характеризовался развитием

колликвационного некроза, белковой и жировой дистрофии гепатоцитов, локализованных преимущественно в центральной зоне печеночной доли, где максимальна активность зависимых от цитохрома Р-450 монооксигеназ и преобладает продукция повреждающих метаболитов гепатотоксина.

Макроскопически печень увеличена в размерах, уплотнена, край закруглен (рисунок 1А). При модели с парацетамол гепатомегалии не наблюдалось (рисунок 1Б).



А



Б

Рисунок 1 — Фотография брюшной полости при моделировании острого токсического гепатита у крысы: А — тетрагидрофуран, Б — парацетамол

При ОТГ определялись деструкция, растворение и распад печеночных клеток, особенно резко выраженные в центральных отделах долек. Клеточная пролиферативная и инфильтративная реакция выражена слабо. Определяется также отек долек, связанный с токсическим повреждением стенок капилляров. Местами отек умеренно выражен и ведет к расши-

рению пространств между трабекулами и капиллярами (пространств Диссе), местами отек более выражен и проявляется дисконфлексацией печеночных клеток: нарушением связи и образованием щелевидных пространств между отдельными клеточными элементами, составляющих трабекулу, в результате чего стирается нормальная архитектура печени (рисунки 2, 3).

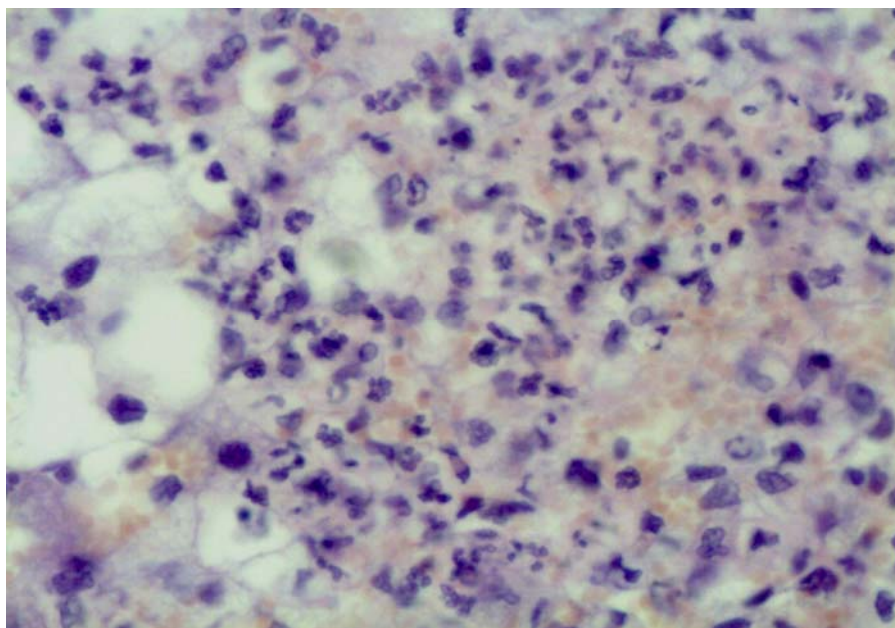


Рисунок 2 — Ткань печени крысы при ОТГ (тетрахлорметан): деструкция гепатоцитов в центральных отделах долек, инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами, жировая дистрофия гепатоцитов.× 400. Окраска гематоксилин-эозин

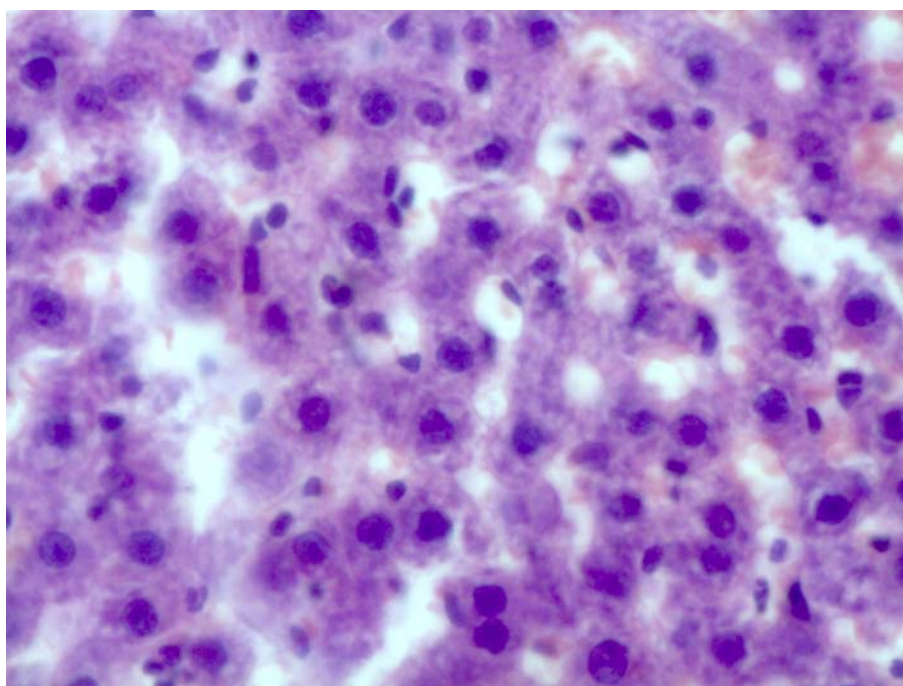


Рисунок 3 — Ткань печени крысы при ОТГ (ацетаминофен): моноцеллюлярные и фокальные некрозы гепатоцитов, инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами, жировая и гиалиново-капельная дистрофия гепатоцитов.× 400. Окраска гематоксилин-эозин

Через 20 дней введения тетрахлорметана в ткани печени крысы определялись:

- 1) жировой гепатоз и централобулярные некрозы;
- 2) централобулярные кровотоечения и клеточная инфильтрация;
- 3) гистиоцитарная инфильтрация в очагах некрозов;
- 4) разрушение центров части долек с разрастанием соединительной ткани;

5) регенерация печеночных клеток;

6) аутолитические изменения, закупорка мелких желчных протоков желчными тромбами чередуются с пролиферацией мелких желчных протоков.

Наблюдались фиброзные изменения (рисунок 4). Так, площадь фиброза в печени контрольной крысы составила 49 мкм^2 , а в ткани печени опытной крысы — 294 мкм^2 .

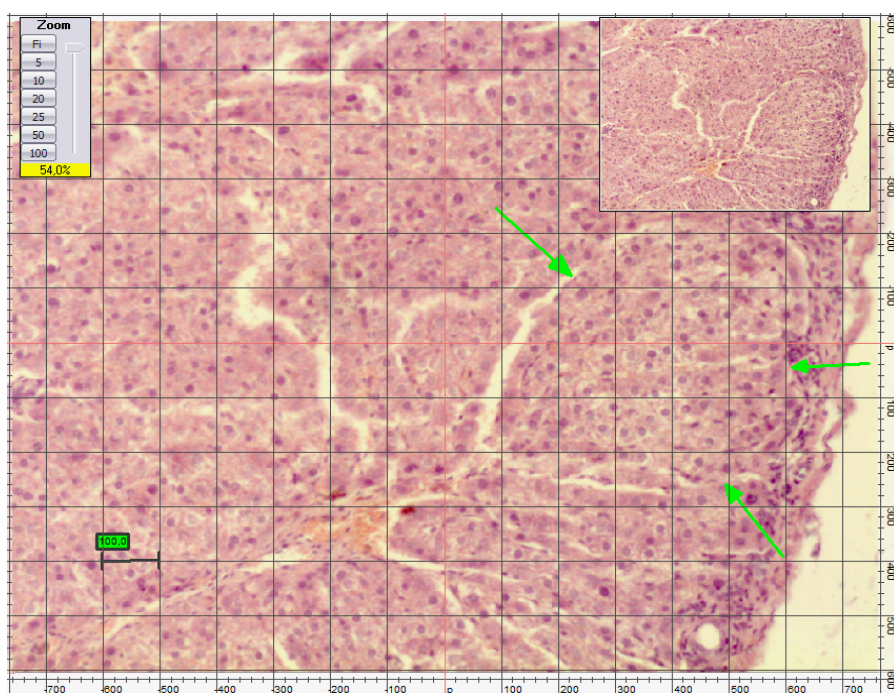
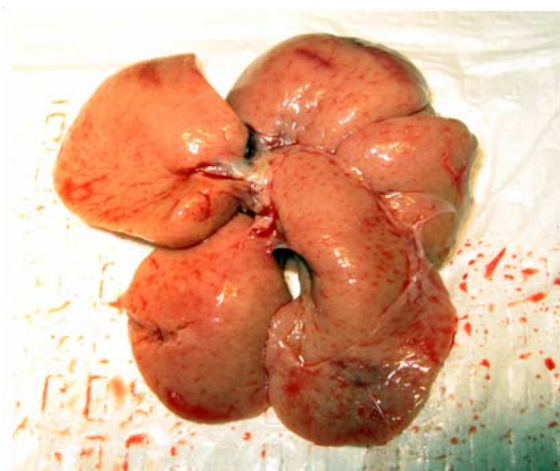


Рисунок 4 — Ткань печени крысы через 20 дней после введения тетрахлорметана: фиброзные изменения в строме с тенденцией к формированию ложных долек (указано стрелками) × 100. Окраска гематоксилин-эозин

Через 60 дней введения тетрахлорметана у крыс развился цирроз печени (ЦП). Однако

изменения в печени у разных крыс носили неодинаковый характер (рисунок 5).



А



Б

Рисунок 5 – Фотография печени крысы через 60 дней введения тетрахлорметана: А — Крыса № 1: печень увеличена, мелкобугристая, уплотнена, край закруглен; Б — Крыса № 2: печень уменьшена, крупнобугристая, плотная, имеются признаки портальной гипертензии (асцит, спленомегалия)

Таким образом, можно говорить о различной чувствительности крыс к тетрахлорметану.

При микроскопическом исследовании отмечено: вокруг просвета центральной вены располагается неокрашенный круглый светлый участок большего или меньшего радиуса с разбросанными по нему ретикулярными элементами,

клетками инфильтрата и отдельными мелкими группами уцелевших, часто гипертрофированных и регенерирующих клеток паренхимы печени. Этот светлый круг окаймляется прослойкой сохранившихся периферических отрезков печеночных трабекул, еще не потерявших своего радиального расположения. Между печеночными

дольками определяются разрастания соединительнотканых волокон. В местах, где периферические части печеночных трабекул подверглись гибели, видны пролиферирующие желчные ходы, проникающие в область бывшей дольки. Печеночные клетки главным образом на периферии долек формируют фокусы узловой гиперплазии, не имеющие правильно сконструированной кровеносной и желчевыводящей систем, беспорядочно располагаются среди соединительной ткани и формируют цирротическую печень. При этом паренхима представлена ложными дольками равномерной величины, разделенными прослойками соединительной ткани — септами. В септах —

инфильтрация из полиморфно-ядерных лейкоцитов с примесью гистиоцитов и отдельных лимфоцитов и пролиферация желчных протоков. В ложных дольках отсутствует балочное строение, характерна жировая дистрофия гепатоцитов. Цирроз является постнекротическим и преимущественно мультилобулярным, при этом определяется полное нарушение пластинчатого строения долек и формируются очень мелкие узелки, лежащие среди фиброзной ткани. Некроз, приведший к циррозу, чаще начинается центрлобулярно и распространяется от центра дольки к ее периферии, встречаются также мостовидные некрозы (рисунок 6).

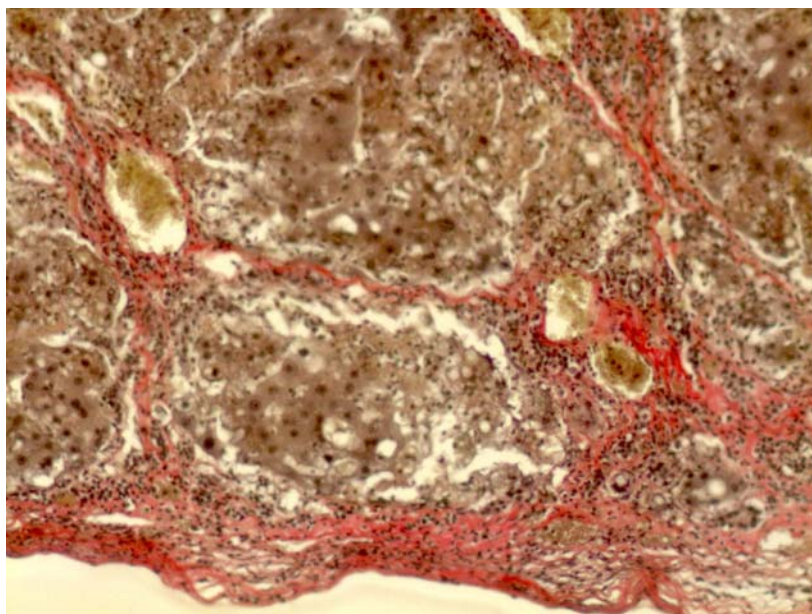


Рисунок 6 — Ткань печени крысы № 2 при постнекротическом циррозе: формирование мультилобулярных ложных долек, разделенных полями соединительной ткани, периллобулярный и центрлобулярный фиброз, жировая дистрофия гепатоцитов. × 100. Окраска по Ван-Гизон

Для определения активности клеточной регенерации был рассчитан митотический индекс (МИ), а для оценки степени внутриклеточной регенерации и ацитокинетической активности — индекс двуядерных гепатоцитов

(ИДГ). Для оценки выраженности метаболических процессов, связанных с делением клеток, определяли диаметр ядер (ДЯ), а в ядрах, имеющих овальную и неправильную форму, измеряли наибольший диаметр (таблица 1).

Таблица 1 — Изменения в ядрах клеток печени

Группы	МИ (M ± σ)	ИДГ (M ± σ)	ДЯ (M ± σ)
ОТГ ССІ ₄	3,4 ± 0,48	114,46 ± 11,69	16,96 ± 4,78
ОТГ ААФ	1,1 ± 0,12	80,56 ± 6,59	14,7 ± 3,48
ССІ ₄ 20 дней	2,9 ± 0,74	65,4 ± 7,1	14,24 ± 1,86
ССІ ₄ 40 дней	1,6 ± 0,35	66,48 ± 7,61	13,04 ± 5,18
ЦП 60 дней	1,9 ± 0,25	91,04 ± 8,5	18,56 ± 3,12
Контроль	1,7 ± 0,46	115,8 ± 12,6	8,15 ± 0,66
Достоверность различия (значение p, однофакторный дисперсионный анализ)	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Примечание. МИ — митотический индекс (%); ИДГ — индекс двуядерных гепатоцитов (%); ДЯ — диаметр ядер (мкм)

Таким образом, активность клеточной регенерации была наиболее выраженной при ОТГ в модели с тетрахлорметаном, снижалась к 40 дню и далее. Внутриклеточная регенерация имела тенденцию к снижению к 20–40 дню, а к 60 суткам снова повышалась. Диаметр ядер гепатоцитов на протяжении всего опыта был статистически значимо больше, чем у контрольной крысы.

При оценке фиброзных изменений по индексу хронизации было отмечено, что уже к 20 суткам эксперимента в печени крыс развивались фиброзные изменения 1 степени хронизации, а к 40–60 суткам имела место III–IV степень хронизации фиброзных изменений. У контрольных крыс и в модели ОТГ фиброзные изменения не обнаружены.

Выводы

1. Токсическое повреждение печени развиваются при введении лабораторным животным тетрахлорметана. Изменения в печени происходят быстрее при внутрибрюшинном введении препарата: острый токсический гепатит — через 2 суток, цирроз печени — через 2 месяца. Гепатотропное действие тетрахлорметана потенцируется пероральным назначением 10 % раствора этилового спирта вместо питьевой воды.

2. Цирроз печени является постнекротическим и преимущественно мультилобулярным. Некроз, приведший к циррозу, чаще начинается центрлобулярно и распространяется от центра дольки к ее периферии, встречаются также мостовидные некрозы.

3. Несмотря на гепатотропность тетрахлорметан оказывает токсическое влияние и на другие органы: выявлены дистрофические изменения в почках, миокарде, легких, головном мозге.

4. Данная экспериментальная модель цирроза печени не является оптимальной, поскольку чувствительность крыс к тетрахлорметану неодинакова, изменения в печени развиваются различной степени выраженности и имеют обратимый характер после отмены препарата, что нарушает однородность опыта при

изучении процессов регенерации поврежденной печени и разработке способов ее коррекции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Садовникова, И. И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения / И. И. Садовникова // РМЖ. — 2003. — Т. 5. — № 2. — С. 32–38.
2. Белякин, С. А. Смертность от цирроза печени как индикатор уровня потребления алкоголя в популяции / С. А. Белякин, А. Н. Бобров // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2009. — Т. 3. — С. 189–194.
3. Долгих, М. С. Перспективы терапии печеночной недостаточности с помощью стволовых клеток / М. С. Долгих // Биомедицинская химия. — 2008. — Т. 54, Вып. 4. — С. 376–391.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. член-корр. РАМН проф. Р. У. Хабриева. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
5. Constandinou, C. Modeling liver fibrosis in rodents / C. Constandinou, N. Henderson, J. P. Iredale // Methods Mol Med. — 2005. — Vol. 117. — С. 237–250.
6. Abalde, J. G. Animal model of portal hypertension / J. G. Abalde, M. Pasarin, J. C. Garcia-Pagan // World J. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 12, № 41. — P. 6577–6584.
7. Hayashi, H. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models / H. Hayashi, T. Sakai // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. — 2011. — Vol. 300(5). — С. 729–738.
8. Лопухин, Ю. М. Экспериментальная хирургия / Ю. М. Лопухин. — М.: Медицина, 1971. — 344 с.
9. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited / W. Laleman [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. — 2006. — Vol. 36, № 4. — P. 242–249.
10. Evaluation of different models of experimentally induced liver cirrhosis for MRI research with correlation to histopathologic findings / B. Krefl [et al.] // Invest. Radiol. — 1999. — Vol. 34, № 5. — P. 360–366.
11. Jiang, Y. Changes in the gene expression associated with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis persist after cessation of dosing in mice / Y. Jiang [et al.] // Toxicol. Sci. — 2004. — Vol. 79, № 2. — P. 404–410.
12. Jimenez, W. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease / W. Jimenez, J. Claria, V. Arroyo // J Gastroenterol Hepatol. — 1992. — № 7. — С. 9097.
13. Mullen, K. D. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization / K. D. Mullen, A. J. McCullough // Hepatology. — 1989. — № 9. — P. 500–503.
14. Tu, C. T. Antifibrotic activity of rofecoxib in vivo is associated with reduced portal hypertension in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury / C. T. Tu, J. S. Guo, M. Wang // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2007. — Vol. 22, № 6. — P. 877–884.
15. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — 383 с.

Поступила 02.02.2012

УДК 616-079:575

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ В МЕДИЦИНЕ

Н. Е. Фомченко, Е. В. Воропаев, Е. В. Серикова

Гомельский государственный медицинский университет

Фундаментальные исследования в генетике обеспечивают прогресс медицины. Генетический подход позволяет приблизиться к пониманию биологической сущности заболеваний, а получаемые при таком подходе данные создают базу для дальнейшего развития теоретической, клинической и профилактической медицины. Молекулярно-генетические методы в диагностике болезней сегодня — это большая и разнообразная группа методов, предназначенных для выявления полиморфизмов в структуре гена.

Значимость молекулярной диагностики для медицины очевидна: это раннее выявление болезни и лечение препаратами, которые считаются безопасными и эффективными на основании молекулярной диагностики; интеграция молекулярной диагностики и терапии; мониторинг лечения и определение прогноза.

Ключевые слова: генодиагностика, молекулярная биология, ПЦР, биочипы.