

ЗМІНА БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ХРОНІЧНОМУ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ

А. Й. Мазуркевич, Н. І. Золтан, М. О. Малюк, В. Б. Данілов, В. В. Ковпак, Ю. О. Харкевич

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Наводяться результати вивчення зміни окремих біохімічних показників, які характеризують патогенез хронічного токсичного гепатиту після застосування різних доз 50 % розчину карбону тетрахлориду для експериментального моделювання хронічного токсичного гепатиту у щурів. Встановлено, що за умов збільшення дози токсину зміни показників сироватки крові щурів, що характеризують розвиток цитолізу гепатоцитів, синдрому гепатоцелюлярної недостатності та внутрішньопечінкового холестазу, значно зростають.

Ключові слова: ПЕЧІНКА, ЩУРИ, ХРОНІЧНИЙ ТОКСИЧНИЙ ГЕПАТИТ, БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СИРОВАТКИ КРОВІ

Проблема діагностики, профілактики та лікування хронічних гепатитів у тварин залишається актуальною як у науковій сфері, так і в практичній ветеринарній медицині, оскільки даний вид патології в більшості випадків ускладнюється цирозом печінки. Невміле застосування гепатотропних ліків, годівля неякісними незбалансованими кормами, вірусна інфекція та інші етіопатогенетичні чинники призводять до хронічного запалення паренхіми печінки та фібротизації її тканин.

Як відомо, фіброз печінки характеризується надмірним розростанням сполучної тканини в результаті повторної чи довготривалої дії патогенного фактору, що зустрічається при більшості хронічних захворювань печінки [1–3].

Літературні дані свідчать про використання безлічі методів експериментального моделювання різних форм гепатиту з використанням ушкоджуючих факторів, що мають різноманітні механізми токсичного ушкодження печінки [4, 5]. Однак модель ураження печінки з використанням карбону тетрахлориду (CCl₄) одна з найбільш розповсюджених в експерименті [6, 7]. За даними Л. Л. Громашевської та співавторів характер змін в печінці залежить від дози та тривалості дії введення CCl₄ [8].

Без проведення клінічних та біохімічних досліджень розробка ефективних засобів лікування печінкової недостатності тварин та вивчення механізмів розвитку хвороби неможлива. За змінами біохімічних показників крові можна визначити відхилення у синтетичній і видільній функціях печінки, наявність і ступінь розвитку цитолізу та холестазу [4].

Метою нашої роботи було дослідити характер зміни деяких біохімічних показників сироватки крові за експериментально змодельованого хронічного токсичного гепатиту після застосування різних доз карбону тетрахлориду.

Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), «Загальних етичних принципів експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження проведені в умовах проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин НУБіП України.

У досліді використали 50 статевозрілих безпородних лабораторних щурів (самиць) з масою тіла 200–230 г. З них була сформована група інтактних дослідних тварин (10 гол.), яка слугувала контролем. З решти тварин формували 2 дослідні групи по 20 щурів у кожній. Тваринам I групи протягом 12 тижнів через кожні 3 дні підшкірно вводили 50 % олійний розчин карбону тетраклориду (CCl₄) на оливковій олії з розрахунку 0,2 мл на 100 г маси тіла [9], тваринам II дослідної групи вводили цей же розчин, але в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла [8]. Летальність на 84 день застосування препарату в I групі становила 30 %, а в II групі — 40 %.

Клінічний прояв гепатиту оцінювали за поведінкою тварин, їх апетитом, масою тіла, станом шкіри та шерстного покриву, формою живота і болючістю його стінок, консистенцією калових мас. Тварин виводили з експерименту на 3, 14, 30 добу після останнього введення CCl₄. Загальна тривалість досліді становила 124 доби. При дослідженні макроскопічного стану печінки враховували зміну її розміру, кольору та консистенції.

Кров для лабораторних досліджень відбирали із серця на 3, 14 та 30 добу після останнього введення CCl₄. У сироватці крові визначали такі біохімічні показники: концентрацію загального білка, альбуміну, сечовини, глюкози, холестеролу та активність ферментів — аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) та лужної фосфатази (ЛФ) на біохімічному аналізаторі Vitros-250. Підготовку проб і визначення біохімічних показників проводили згідно з інструкцією до приладу.

Результати й обговорення

Результати досліджень свідчать про те, що змодельована хронічна форма токсичного гепатиту супроводжується вираженими клінічними ознаками. В обох дослідних групах спостерігалось пригнічення загального стану, зменшення маси тіла, скуйовдженість шерстного покриву, зменшення еластичності шкіри та розлади травлення у вигляді проносів.

При патолого-анатомічному розтині щурів дослідних груп у деяких тварин розмір печінки значно збільшений, порівняно з такою у тварин контрольної групи, краї заокруглені, колір паренхіми темно-вишневий, у окремих особин з жовтуватим відтінком, консистенція в'яла. У 3 тварин II дослідної групи черевна порожнина була заповнена асцитною рідиною. У щурів контрольної групи печінка була без видимих змін, мала рівномірний червоно-бурий колір і пружну консистенцію.

Дані клінічного прояву токсичного гепатиту підтверджені результатами гістологічних досліджень печінки, відібраної від дослідних тварин [10].

Отримані результати біохімічного дослідження крові свідчать, що у щурів обох дослідних груп за розвитку у них змодельованого хронічного токсичного гепатиту спостерігаються суттєві зміни показників порівняно з контролем (табл. 1).

Зокрема, на 3 добу після останнього введення CCl₄ достовірно підвищився рівень активності ферментів у I групі: АсАТ — у 2,2 раза, АлАТ — у 1,7 раза, ЛФ — у 1,5; у II групі активність АсАТ та АлАТ була нижчою порівняно з такою у тварин I групи (підвищення було відповідно в 1,6 та на 34, 6 % порівняно з контролем), однак рівень ЛФ підвищився в 2,1 раза.

Оскільки АсАТ та АлАТ містяться в цитоплазмі печінкових клітин (АсАТ також у мітохондріях), то підвищення їх активності зазначених ферментів свідчить про цитолітичний синдром. Причому він у більшій мірі виражений у тварин I групи. Однак у тварин II дослідної групи значне підвищення рівня активності ЛФ вказує на більш розвинений внутрішньопечінковий холестаза. Протягом місяця активність ферментів у сироватці крові поступово знижувалась (рис. 1, 2), що, очевидно, вказує на поступове зменшення кількості зруйнованих гепатоцитів і, можливо, на розвиток компенсаторних процесів у печінці. Однак, на 30 добу рівень АсАТ ще залишався підвищеним в крові тварин I групи на 3,7 %, в II групі — в 1,3 раза та АлАТ відповідно на 17 % і в 1,6 раза. Одночасно активність ЛФ залишалась

підвищеною відповідно на 24,7 та 39 %. На нашу думку, така динаміка активності названих ферментів може свідчити про існування процесів деструкції гепатоцитів та внутрішньопечінкового холестазу внаслідок порушення архітекτονіки печінки та можливого розвитку циротичних змін.

Таблиця 1

Біохімічні показники сироватки крові у щурів за експериментально змодельованого хронічного токсичного гепатиту ($M \pm m$, $n=4$)

Показник	Інтактні тварини	3 доба		14 доба		30 доба	
		I група	II група	I група	II група	I група	II група
Сечовина, ммоль/л	5,4±0,2	7,8±0,1	13,1±0,1	6,4±0,2**	11,9±0,38	6,3±0,1**	5,36±0,06
Глюкоза, ммоль/л	11,4±0,7	2,8±0,1	8,18±1,06	6,1±0,3***	9,95±1,68	8,4±0,9*	12,92±2,09
Холестерол, ммоль/л	1,6±0,1	1,7±0,2	0,7 ±0,04	2,2 ±0,1**	0,97 ±0,02***	2,3 ±0,1**	1,28 ±0,01**
Заг. білок, г/л	61,3±0,4	71,6±0,1	71,75±0,12	65,08 ±0,14***	66,15 ±0,82***	62,75 ±0,29*	61,7±0,04
Альбумін, г/л	34,4±0,6	30,2±0,4**	26,25±0,29	30,8±0,4**	27±0,9***	31,1±0,3**	27,8±0,4***
АсАТ, ммоль/л·год	117,5±9,8	378,3±10,1	305,25±5,93	147,3±8,8	153,3±6,51*	121,8±3,1	275,38±18,2***
АлАТ, ммоль/л·год	72±2,3	193,5±27,4	96,93±1,87*	132,5±9,7	93,25±24,39	84,3±2,5**	188,28±26,38

Примітка: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$; вірогідні дані порівняно з їх значеннями у тварин контрольної групи

Рівень глюкози на 3 добу після останнього введення CCl_4 вірогідно зменшився в крові тварин I групи на 75,4 %, II групи — на 28,2 %. Протягом місяця її рівень поступово підвищувався, але на 30 добу залишався нижчим норми в крові тварин I групи на 26,3 %, II групи — на 13,3 %. Ймовірно, при ураженні паренхіми печінки знижується рівень окислювальних процесів у гепатоцитах, що призводить до зниження активності глікогенезу та, як наслідок, до порушення участі печінки в регуляції рівня глюкози в крові [11].

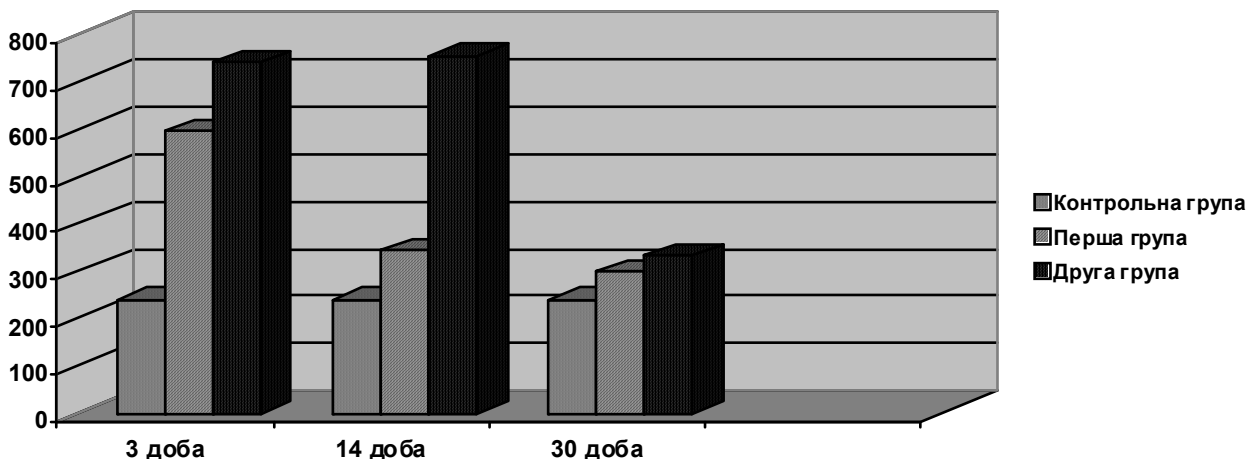


Рис. 1. Зміна активності ЛФ в сироватці крові щурів за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту

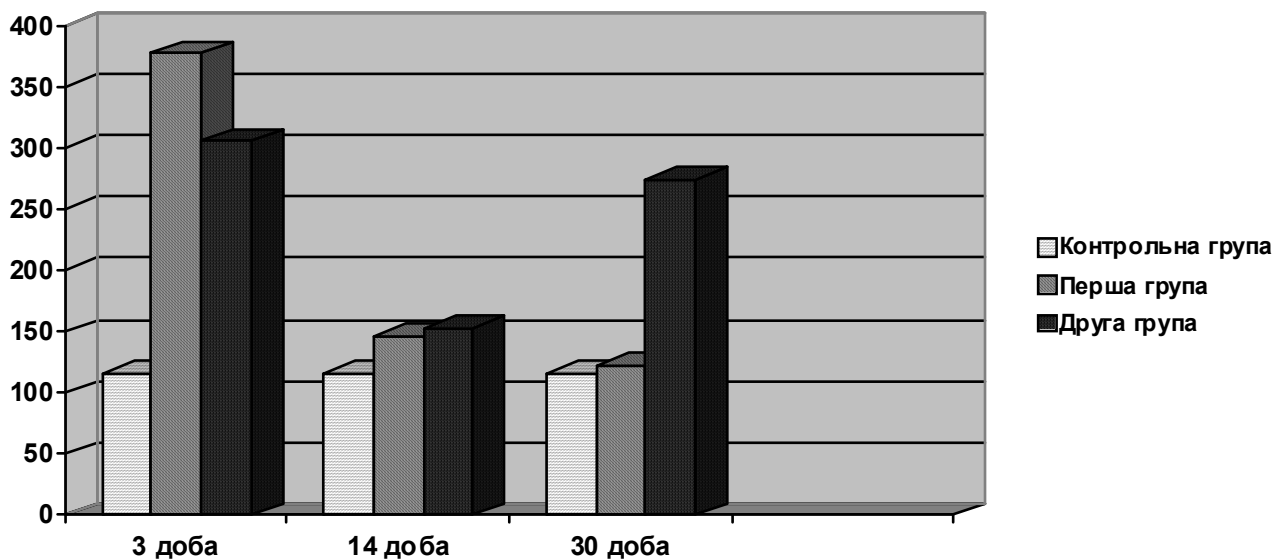


Рис. 2. Зміна активності АсАТ у сироватці крові щурів за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту

У сироватці крові щурів I групи на 3 добу після останнього введення токсину виявлено підвищення вмісту холестеролу на 6,3 % порівняно з контролем та подальше його підвищення протягом місяця; на 30 добу вірогідне збільшення рівня холестеролу досягло 35,3 % (рис. 3), що, очевидно, пояснюється розладами в регуляторній здатності печінки через її токсичне ураження [4]. Як відомо, печінка бере активну участь у всіх етапах обміну жирів. В ній активно відбувається обмін стеринів, зокрема холестеролу, переважна кількість якого синтезується в організмі з ацетилкоензиму А, у тому числі 80 % його утворюється в печінці [11]. На відміну від тварин I дослідної групи, в сироватці крові щурів II дослідної групи на 3 добу після останнього введення токсину встановлено вірогідно зменшений рівень холестеролу на 56,3 % порівняно з контролем, що може бути наслідком глибоких дистрофічних процесів у печінці та порушення синтетичної активності гепатоцитів.

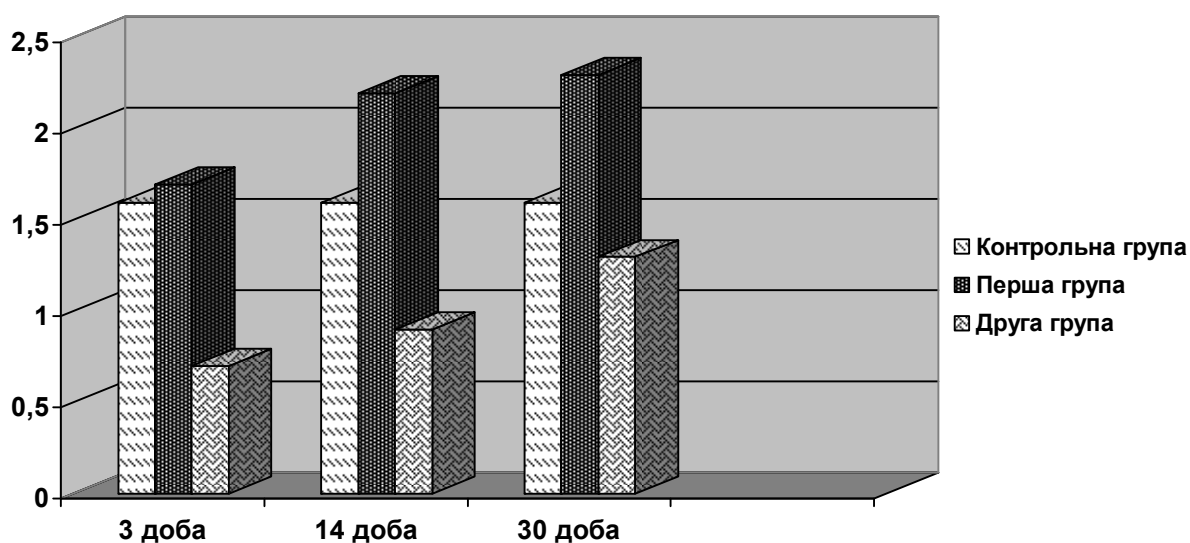


Рис. 3. Зміна вмісту холестеролу в сироватці крові щурів за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту

Встановлено вірогідне зниження рівня альбуміну в сироватці крові дослідних тварин (на 12,2 та 23,7 %) на тлі підвищеного рівня загального білка на 17 % порівняно з контролем (рис. 4). Оскільки всі альбуміни плазми, 75–90 % α -глобулінів і 50 % β -глобулінів синтезуються гепатоцитами [11], то гіпоальбумінемія може свідчити про зниження інтенсивності білоксинтетичних процесів у гепатоцитах, що, як відомо, характерно для цитолітичного синдрому при ураженні печінки. Гіперпротеїнемія на початкових стадіях розвитку хронічного експериментального токсичного гепатиту з одночасним зниженням в сироватці крові рівня альбуміну, можливо, відбувається за рахунок підвищення рівня фракції глобулінів, що може характеризувати запальні процеси [12].

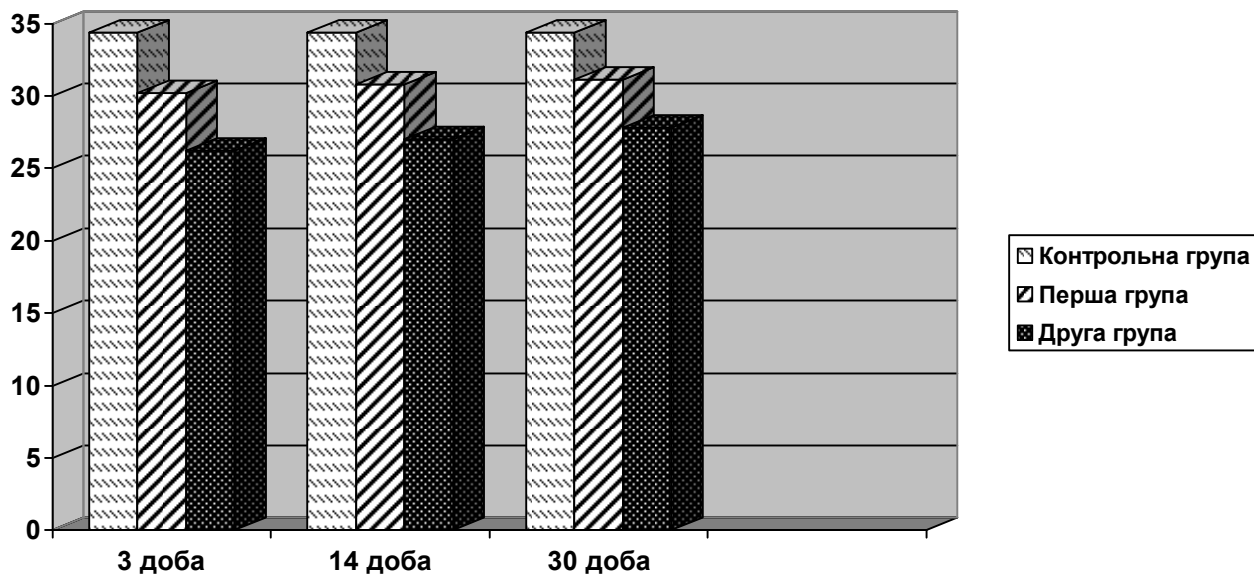


Рис. 4. Зміна рівня альбуміну в сироватці крові щурів за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту

Концентрація сечовини як кінцевого продукту обміну білків та основної складової частини залишкового азоту у ссавців залежить від інтенсивності її синтезу та виведення. Тому її визначення є важливим діагностичним тестом як для печінки, де вона синтезується, так і для нирок, через які вона виводиться. Дані, наведені в таблиці 1, свідчать про те, що на 3 добу після останнього введення CCl_4 сечовиносинтетична функція печінки посилюється, про що свідчить підвищення вмісту сечовини в крові тварин I групи на 44 % і II групи — в 1,4 раза порівняно з таким у тварин контрольної групи. Одночасно такий показник слугує доказом можливого зниження активності видільної функції нирок за цих умов.

Висновки

1. Підшкірні ін'єкції 50 % олійного розчину карбону тетраклориду (CCl_4) на оливковій олії з розрахунку 0,2 мл та 0,5 мл на 100 г маси тіла через кожні 3 дні викликають на 84 день досліді хронічний токсичний гепатит у щурів.
2. Збільшення дози токсину призводить до зниження рівня альбуміну в крові і свідчить про зниження інтенсивності білоксинтетичних процесів у печінці.
3. Різке зростання активності ферментів: АлАТ, АсАТ та ЛФ характеризує розвиток цитолізу гепатоцитів, біохімічного синдрому гепатоцелюлярної недостатності та внутрішньопечінкового холестазу.

Перспективи подальших досліджень. Наведені дані біохімічних показників сироватки крові при експериментальному хронічному токсичному гепатиті у щурів використовуватимуться в подальших дослідженнях з вивчення ефективності застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) при лікуванні печінкової недостатності у тварин.

A. Y. Mazurkevich, N. I. Zoltan, M. O. Malyuk, V. V. Kovpak, Y. O. Kharkevich

CHANGES OF BIOCHEMICAL INDECIES OF RAT OF BLOOD SERUM IN EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC TOXIC HEPATITIS

S u m m a r y

Interprets some biochemical investigation results, which characterize pathogenesis of chronic toxic hepatitis after application 50 % solution of karbon tetrachloride in different doses for experimental chronic toxic hepatitis design in rats. It is detect that at the terms of increase toxin dose of indexes change of rats blood serum, which characterize development of hepatocyte cytotoxicity, syndrome of hepatocellular failure and intrahepatic cholestasis, which considerably grows.

*A. Y. Mazurkevich, N. I. Zoltan, H. A. Malyuk,
V. B. Daniilov, V. V. Kovpak, Y. O. Kharkevich*

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

А н н о т а ц и я

Представлены результаты изучения изменения отдельных биохимических показателей, которые характеризуют патогенез хронического токсического гепатита после применения разных доз 50 % раствора карбона тетраоксида для экспериментального моделирования хронического токсического гепатита у крыс. Установлено, что в условиях увеличения дозы токсина изменения показателей сыворотки крови крыс, которые характеризуют развитие цитолиза гепатоцита, синдрома гепатоцеллюлярной недостаточности, и внутрипеченочный холестаза, значительно растут.

1. *Friedman S. L.* Liver fibrosis — from bench to bedside / S. L. Friedman // *Hepatology*. — 2003. — Vol. 38. — P. 38–53.
2. *Friedman S. L.* Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis — is it all hype? / S. L. Friedman // *Nat. clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* — 2007. — Vol. 4. — P. 236–237.
3. *Benyon R. C.* Is liver fibrosis reversible? / R. C. Benyon, J. Iredale // *Gut*. — 2000. — Vol. 46. — P. 443–446.
4. *Мельничук Д. О.* Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та ін. ; За ред. Д. О. Мельничука. — К. : НУБіПУ, 2010. — 400 с.
5. *Гуськова Т. А.* Доклинические токсикологические исследования лекарственных средств как основа их безопасного применения в клинике / Т. А. Гуськова // *Клинические исследования лекарственных средств в России*. — 2004. — № 3, 4. — С. 8–15.
6. *Kuo T. K.* Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success for using bone marrow mesenchymal stem cells / T. K. Kuo, S. Hung // *Gastroenterology*. — 2008. — Vol. 134. — P. 2111–2121.

7. *Yagi K.* Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine / K. Yagi, M. Kojima, S. Oyagi et al. // *Yakugaku Zasshi*. — 2008. — Vol. 128. — P. 3–9.
8. *Алексеева И. Н.* Противопеченочные антитела и функции печени / И. Н. Алексеева. — К. : Наук. думка, 1980. — 184 с.
9. *Dong-Chang Zhao.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats / Dong-Chang Zhao, Jun-Xia Lei et al. // *World J. Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 11. — P. 3431–3440.
10. *Золтан Н. І.* Морфологічні зміни печінки щурів при експериментально змодельованій хронічній печінковій недостатності / Н. І. Золтан, Я. К. Сердюков // *Наук. вісник Луганського національного аграрного ун-ту.* — Луганськ : Елтон-2, 2012. — № 37. — С. 37–40. — (Серія «Ветеринарні науки»).
11. *Левченко В. І.* Ветеринарна клінічна біохімія / За ред. В. І. Левченка. — Біла Церква, 2002. — С. 327–347.
12. *Грищенко В. А.* Біохімічні показники сироватки крові при медикаментозному гепатиті щурів та їх зміни за різних способів корекції / В. А. Грищенко, О. М. Литвиненко // *Наук. вісник Львівського національного ун-ту вет. мед. та біотехнологій ім. С. З. Гжицького* — 2007. — Т. 9, № 3 (34). — С. 54–57.

Рецензент: кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри гістології, цитології та ембріології Національного університету біоресурсів і природокористування України Мазуркевич Т. А.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Вудмаска І. В.