

УДК 616.36-002:599.323.4

© Н.А. Рикало, О.Ю. Гумінська, О.В. Андрощук, 2012.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ХРОНІЧНОГО МЕДИКАМЕНТОЗНОГО ГЕПАТИТУ У СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ

Н.А. Рикало, О.Ю. Гумінська, О.В. Андрощук

Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова, м. Вінниця.

THE EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC TOXIC HEPATITIS IN IMMATURE RATS
N.A. Rikalo, O.Yu. Guminskaya, O.V. Androschuk

SUMMARY

A new experimental model of chronic drug (rifampin, isoniazid-induced) in immature rats by intragastral administration by of metal probe with an olive on a standardized solvent Tween-65 isoniazid at a dose 50mg/kg and rifampicin at a dose of 86mg/kg three times a week for 29 days.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОГО МЕДИКАМЕНТОЗНОГО ГЕПАТИТА У
НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС**

Н.А. Рыкало, О.Ю. Гуминская, О.В. Андрощук

РЕЗЮМЕ

Разработана новая экспериментальная модель хронического медикаментозного рифампицин-изониазид индуцированного токсического гепатита у неполовозрелых крыс путем интрагастрального введения металлическим зондом с оливой на стандартизованном растворителе ТВИН-65 изониазида в дозе 50мг/кг и рифампицина в дозе 86мг/кг трижды в неделю в течение 29 дней.

Ключові слова: експериментальна модель, медикаментозний гепатит, статевонезрілі щури.

Проблема токсичних уражень печінки є актуальною як в Україні, та і в світі в цілому [1, 2]. Спостерігають зростання частоти лікарських уражень печінки, зростання частоти хвороб, що вимагають тривалого призначення гепатотоксичних препаратів, а також неконтрольоване вживання ліків з недотриманням показань до призначення, раціональної схеми та неприпустимих поєднань лікарських препаратів у випадках самолікування. На користь наведених даних свідчить співвідношення випадків гострих вірусних гепатитів до лікарських 4–6:1 [4, 5].

За даними британських вчених [3] серед всіх випадків гострої недостатності печінки у дітей 20 % пов'язано з прийомом лікарських препаратів, серед них 5% випадків пов'язано з прийомом протитуберкульозних препаратів. Логічно припустити, що в Україні цей відсоток не менше, а зважаючи на рівень захворюваності на туберкульоз, вірогідно у декілька разів більше.

Особливої актуальності набула проблема побічних ефектів при лікуванні та профілактиці туберкульозу, зважаючи та епідемічний стан в країні, невинне прогресуюче зростання захворюваності та інфікування дуже різноманітних, як соціальних, так і вікових верств населення, зростання відсотку людей, що потребують хіміопротекції, та пролонгованого застосування різноманітних препаратів, зокрема гепатотоксичних [6, 7, 9].

Враховуючи участь печінки в регуляції імунного гомеостазу логічно передбачити розвиток імунної дисфункції на тлі медикаментозного гепатиту [8].

Механізми гепатотоксичності сформовані переважно на досвіді ряду досліджень (в тому числі експериментальних) змін, що відбуваються в дорослому організмі та екстрапольовані на дитячий. Але зважаючи на певні фізіологічні та функціональні особливості дитячого організму та взаємозв'язок печінки та органів центрального імуногенезу у дитячому віці необхідним було відтворити медикаментозний гепатит саме у статевонезрілих щурів.

У літературних джерелах описано значна кількість методик для відтворення токсичних (в тому числі медикаментозних гепатитів), але ці методики використовуються на статевозрілих щурах, з початковою масою 150–200 г [10, 11, 12]. Для того щоб наблизити характер змін, що виникають при медикаментозному гепатиті, до перебігу патології у дитячому організмі та дослідити зрушення в імунному профілі необхідно створити модель токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів.

Мета: розробити ефективну модель токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

З метою максимального наближення експериментальної моделі до патології, що вивчається у дітей, експериментальне дослідження проводилось на 60 статевонезрілих щурах- самицях початковою вагою 50–55 г та віком 1 місяць. Усі експерименти проводились з дотриманням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених

першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та узгоджених із положенням «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей». Перед проведенням експерименту тварини пройшли карантин в умовах віварію протягом 14 днів.

За основу взяли модель токсичного медикаментозного гепатиту, який моделюється введенням статевозрілим білим щурам-самцям лінії Вістар з масою тіла 160-200 г, ізоніазиду у дозі 50 мг/кг та рифампіцину у дозі 86 мг/кг маси тіла щурам – внутрішньошлунково, щоденно, виходячи з дозових рівнів при їх застосуванні в клініці [10]. Препарати вводили щоденно внутрішньошлунково за допомогою металевого зонду, тривалість експерименту становила 28 днів. Інші патенти для моделювання хронічного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів нам не відомі.

Для створення власної моделі токсичного медикаментозного (рифампіцин-ізоніазид індукованого) гепатиту у статевонезрілих щурів було обрано інтрагастральне введення, на стандартизованому розчиннику ТВІН-65, рифампіцину (ЗАТ НВЦ “Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод”) в дозі 86 мг/кг, ізоніазиду в дозі 50 мг/кг (виробництва ЗАТ Фармацевтична фірма “Дарниця” (Україна)), дози розраховані виходячи з рекомендацій застосування для дитячого віку з урахуванням константи біологічної активності за Риболовцевим Ю.Р.(1979). Тривалість експерименту буде складати 29 днів, кратність введення препаратів – 3 рази на тиждень.

Експериментальні групи формувались шляхом випадкової вибірки, з урахуванням віку, початкової ваги. Перед експериментом та в ході здійснювалось зважування тварин 1 раз на тиждень, велось спостереження за загальним станом тварин, поведінкою, споживанням корму та води. Тваринам дослідної групи вводили інтрагастрально металевим зондом з оливою на стандартизованому розчиннику ТВІН-65 ізоніазид у розрахунку 50мг/кг та рифампіцин у розрахунку 86мг/кг тричі на тиждень, протягом 29 днів. Тваринам контрольної групи з частотою 3 рази на тиждень вводили інтрагастрально металевим зондом з оливою стандартизований розчинник ТВІН-65. Тривалість експерименту складала 29 днів, усі тварини в контрольній та дослідній групах залишилися живими. На 30 день тварин піддавали евтаназії шляхом цервікальної дислокації під тіопенталовим наркозом та здійснювали забір сироватки крові та шматочків печінки.

Після виведення з експерименту для проведення морфологічного дослідження вилучена печінка (шматочок матеріалу розміром 1x1 см) та фіксована у 10% нейтральному формаліні, виготовлені парафінові блоки, з них - зрізи по 3мм, пофарбовані гематоксилін-еозином та за ван Гізон.

В якості тестових параметрів було обрано наступні показники функціонального стану печінки: активність аланінамінотрансферази (АЛТ), аспаргатамінотрансферази (АСТ) та лужна фосфатаза в плазмі крові.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експериментальна модель токсичного медикаментозного гепатиту за методикою Л.Г.Бережної та співав. (2006 р) передбачає введення обох препаратів інтрагастрально у дозі ізоніазиду у дозі 50 мг/кг та рифампіцину у дозі 86 мг/кг маси тіла щурам – внутрішньошлунково, щоденно, протягом 28 днів. При використанні описаної моделі на 30 статевонезрілих щурах на 5 день експерименту у дослідній групі загинуло 8 тварин, а на 10 день експерименту у 2 групі залишилось 12 тварин, на 28 день експерименту в дослідній групі залишилось 2 тварини, кількість щурів у контрольній групі не змінилась.

При візуальному порівнянні тварин дослідної та контрольної груп відмічалась виражена адинамія тварин дослідної групи, тварини малоактивні та постійно спали, що можна розцінити як ознаки енцефалопатії. Тварини дослідної групи відмовлялись від корму, приріст маси тіла в 1.3 рази нижче ніж в контрольній групі. При розтині загиблих тварин були виявлені наступні зміни: венозне повнокрів'я внутрішніх органів, рідина в черевній та плевральній порожнинах, патоморфологічне дослідження виявило в усіх загиблих щурів поширений некроз гепатоцитів, виражене повнокрів'я та лімфоїдну інфільтрацію тканини печінки, крововиливи, ознаки печінкової недостатності. Отже, можна зробити висновок, що дана модель адаптована до дорослих тварин, але не є адекватною для дослідження хронічного токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів.

Невдала спроба використання описаної методики для моделювання токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів спонукала до створення власної моделі токсичного медикаментозного гепатиту, призначеної саме для статевонезрілих щурів.

При проведенні експерименту за власною моделлю була відмічена зміна поведінки тварин дослідної групи – вони, в порівнянні з контролем, були кволими, споживали менше корму, їх вага, порівняно з контролем, була на 12,5% нижча. Печінка тварин 2-ї групи була збільшена та неоднорідної, щільної структури.

Після закінчення експерименту показники активності АЛТ (аланінамінотрансферази), АСТ (аспаргатамінотрансферази) та ЛФ (лужної фосфатази) в плазмі крові тварин експериментальної та контрольної груп були наступними (середній показник по групі):

Активність АЛТ, АСТ та ЛФ у сироватці крові статевонезрілих щурів самиць контрольної та дослідної груп

Біохімічний показник	1 група – інтактні тварини	2 група дослідні тварини-
Лужна фосфатаза (нмоль/мл/хв)	361,8	540,4
АСТ(нмоль/мл/хв)	46,8	54,6
АЛТ(нмоль/мл/хв)	33	45,2

Після закінчення експерименту показники активності АЛТ, АСТ, ЛФ в плазмі крові тварин експериментальної та контрольної груп склали: ЛФ (ммоль/мл/хв) – 1 група – 361,8, 2 група – 540,4; АСТ (ммоль/мл/хв) 1 група – 46,8, 2 група - 54,6; АЛТ (ммоль/мл/хв) – 1 група – 33, 4 група – 45,2, що вказує на розвиток синдрому цитолізу.

У ході експерименту відмічено зростання активності ЛФ: в 2 групі - у 1,5 рази більше в порівнянні з контрольною групою, зростання АСТ- у 1,16 раз, зростання АЛТ - у 1,3 рази, що доводить розвиток хронічного запалення печінки.

При вивченні гістологічних зрізів печінки у тварин 1-ї (контрольної) групи жодних патологічних змін не виявлено (рис. 1).

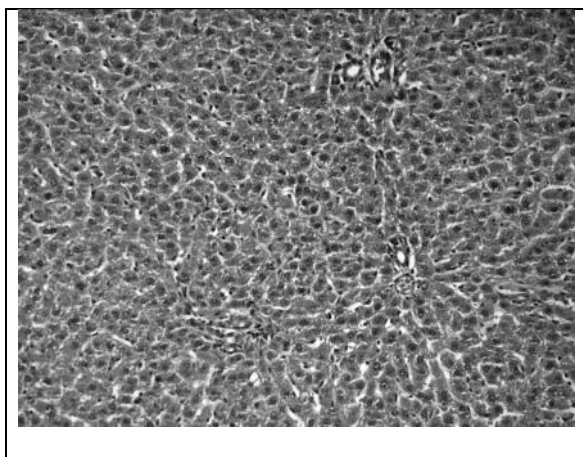


Рис. 1. Печінка щура контрольної групи гістологічна картина відповідає нормі. Фарбування гематоксилін-еозином x 200.

У тварин 2-ї (дослідної) групи спостерігаються порушення балкової структури, поліморфізм гепатоцитів, повнокрів'я центральних вен, зони запальної інфільтрації, мостоподібні некрози, зерниста, вакуольна дистрофія гепатоцитів; ознаки розладів кровообігу- стази в кровоносних судинах, повнокрів'я, дрібні крововиливи. Відмічається лімфоїдноклітинна інфільтрація сполучної тканини портальних трактів, що відповідає морфологічним змінам, характерним для хронічного гепатиту (рис. 2).

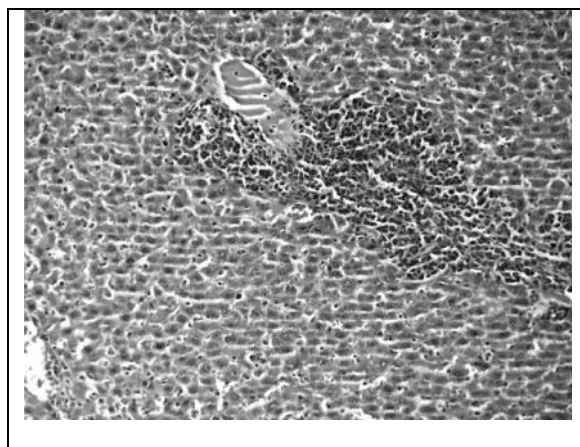


Рис. 2. Печінка щура дослідної групи після введення ізоніазид у розрахунку 50мг/кг та рифампіцин у розрахунку 86мг/кг тричі на тиждень, протягом 29 днів. Вакуольна дистрофія гепатоцитів, лімфоїдноклітинна інфільтрація сполучної тканини портальних трактів. Фарбування гематоксилін-еозином x 200.

ВИСНОВКИ

Розроблена нова експериментальна модель відтворення токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів шляхом інтрагастрального введення металевим зондом з оливою на стандартизованому розчиннику ТВІН-65 ізоніазиду в розрахунку 50мг/кг та рифампіцин у розрахунку 86мг/кг тричі на тиждень, протягом 29 днів з метою максимального наближення патології, що вивчається до перебігу в дитячому організмі.

Перспективи подальших досліджень. Розроблена експериментальна модель токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів дасть можливість проводити доклінічні дослідження фармакологічних препаратів для удосконалення лікування медикаментозних гепатитів у дітей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Скрипник І. Н. Эссенциальные фосфолипиды в лечении и профилактике медикаментозных поражений печени / И. Н.

- Скрипник // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – № 4 (48). – С. 60-63.
2. Yew W. W. Antituberculosis drags and hepatotoxicity / W. W. Yew, C. C. Leung // *Respirology*. – 2006. – № 11. – P. 699-707.
3. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure / K.F. Murray, N. Hadzic, S. Wirth [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2008. – Vol. 47(4) – С. 395-405.
4. Швец Н. И. Лекарственные поражения печени, связанные с приемом антибиотиков / Н. И. Швец, Т. М. Бенца // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – № 3. – С. 43-49.
5. Шульпекова Ю. О. Лекарственные поражения печени / Ю. О. Шульпекова // *Врач*. – 2010. – № 7. – С. 13-18.
6. Abdullah S. Potentiation of isoniazid – induced liver toxicity by rifampicin in a combinational therapy of antitubercular drugs (rifampicin, isoniazid and pyrazinamide) in Wistar rats: a toxicity profile study / S. Abdullah, R. Kamal // *Hepatology Research*. – 2007. – Vol. 37, № 10. – P. 845-853.
7. Мороз В. М. Экспериментальне обґрунтування патогенетичної терапії хронічної патології печінки / В. М. Мороз, Н. А. Рикало // *Вісник морфології*. – 2010. – № 16 (2). – С. 236–241.
8. Кузнецова Л. В. Роль печени в иммунной системе организма человека / Л. В. Кузнецова // *Сімейна медицина*. – 2008. – № 2. – С. 37-40.
9. Фещенко Ю. І. Туберкульоз у дітей та підлітків. Оцінка сучасної ситуації / Ю. І. Фещенко, В. П. Костроміна, О. О. Речкіна // *Журнал АМН України*. – 2007. – Т. 13, № 4. – С. 688-699.
10. Бережна Л. Г. Роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 в патогенезі гепатотоксичності ізоніазиду : автореф. дис. на здобуття наук. Ступеня канд. мед. наук : спец.14.03.06 «Токсикологія» / Л. Г. Бережна. – К., 2006. – 20 с.
11. Рикало Н. А. Експериментальна модель хронічного тетрахлорметанового гепатиту та цирозу печінки у нестатевозрілих щурів / Н. А. Рикало // *Вісник Української медичної стоматологічної академії*. – 2009. – Т. 9, № 2. – С. 116–118.
12. Верифікація моделі гострого флуконазоллового гепатиту / С.М. Солтик, Т.В. Чабан, К.Л. Сервецький [та ін.] // *Гепатологія*. – 2011. – №1. – С. 46-53.