

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА, ВЫЗВАННОГО ВНУТРИЖЕЛУДОЧНЫМ И ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ РАСТВОРА ТЕТРАХЛОРМЕТАНА

[*А. В. Ерютин, М. Э. Филь, М. А. Шилова, С. В. Мишенина, С. В. Позднякова, К. И. Ершов*](#)

*ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)*

Экспериментальные модели токсического гепатита вызывали внутрижелудочным и интраперитонеальным введением раствора тетрахлорметана. Для оценки тяжести поражения печени были применены биохимический и морфологический методы исследования. На основании полученных данных на обеих моделях подтвержден токсический гепатит. Наиболее тяжелые поражения печени возникают при интраперитонеальном введении тетрахлорметана. Внутрижелудочное введение тетрахлорметана позволяет снизить уровень летальности (до 10 %), избежать нарушения целостности кожных покровов и уменьшить проявление болевого синдрома у животных.

Ключевые слова: тетрахлорметан, гепатит.

Ерютин Александр Владимирович — студент 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: mahonealex@icloud.com

Филь Марина Эдуардовна — студент 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: lucia_di_lammermoor@mail.ru

Шилова Маргарита Анатольевна — аспирант 3-го года обучения (заочная форма) кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: pharmacevt85@list.ru

Мишенина Светлана Владимировна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры

фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: m-svetlana@ngs.ru

Позднякова Светлана Васильевна — доктор биологических наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: svetpozdneyakova@yandex.ru

Ершов Константин Игоревич — ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: ershov_k@bk.ru

Актуальность. Доклинические исследования перспективных гепатопротекторов проводятся, как правило, на классической модели токсического хронического гепатита, вызванного внутрижелудочным или интраперитонеальным введением 50 % масляного раствора тетрахлорметана [3]. Четыреххлористый углерод оказывает прямое повреждающее действие на печень посредством образования ковалентных связей с клеточными макромолекулами, что, в свою очередь, приводит к выраженному повреждению мембран гепатоцитов, активации процессов липопероксидации, дисбалансу в работе ферментативного звена антиоксидантной системы организма, нарушению метаболизма липидов, белков, углеводов [4-7]. Основными механизмами действия уже известных или изучаемых гепатопротекторов являются стабилизация клеточных мембран, антиоксидантный, детоксицирующий, противовоспалительный, антихолестатический, антифибротический, регенерирующий эффекты и др. [1, 2, 8]. Вследствие этого, для получения объективных результатов необходимо, чтобы выбранная методика наиболее полно отражала процессы повреждения печени.

Цель исследования: провести сравнительную характеристику моделей токсического хронического гепатита, вызванных внутрижелудочным и интраперитонеальным введением 50 % масляного раствора тетрахлорметана на основании биохимических и морфологических показателей.

Материалы и методы. Эксперимент был проведен на крысах-самцах Wistar массой 200–250 г. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Выведение животных из опыта проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 года № 755).

50 % масляный раствор тетрахлорметана в дозе 2,0 мл/кг вводили 40 крысам, которые были разделены на 2 группы по 20 особей в каждой. У первой группы животных токсический гепатит вызывали внутрижелудочным введением тетрахлорметана 2 раза в неделю в течение 3-х недель. Забор материала (сыворотки крови и образцов тканей печени) осуществляли путем декапитации под эфирным наркозом на 20-й день от начала эксперимента. Второй группе масляный раствор тетрахлорметана вводили интраперитонеально 1 раз в неделю в течение 4-х недель, забор материала проводили на 23-й день эксперимента. Группа контроля (интактные животные) состояла из 10-ти крыс.

Для биохимических исследований кровь центрифугировали 3000 об/мин 15 мин, отбирали супернатант. В сыворотке крови крыс определяли активность АсАТ, АлАТ, ЩФ, содержание общего билирубина и общего белка по общепринятым методам на полуавтоматическом биохимическом анализаторе MD-9200 Meredith Diagnostics с использованием наборов реагентов производства «Вектор-Бест».

Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях печени оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой. О состоянии антиоксидантной системы судили по активности антиокислительного фермента глутатионпероксидазы (ГПО).

Для светоптического морфологического исследования вырезали образцы из большой доли печени, фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, подвергали стандартной обработке с последующей заливкой в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином Лилл-Майера и 1 % эозином, а также проводили гистохимическое окрашивание для выявления соединительной ткани по Ван Гизону пикрофуксином. Морфометрический анализ срезов был проведен при $\times 400$ увеличении микроскопа с использованием окулярной сетки на 289 точек. Подсчет проводили в 15-ти полях зрения каждого препарата. В тканевом микрорайоне печени подсчитывали объемную плотность гепатоцитов с дистрофическими и некротическими изменениями, синусоидов, соединительной ткани, определяли объемную плотность каждого структурного компонента.

Статистическая обработка результатов включала подсчет среднеарифметических значений (M) и их ошибки (m). Для выявления достоверности полученных значений применяли тест множественных сравнений Дункана (Duncan's test, ANOVA) с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования. При оценке биохимических показателей сыворотки крови было выявлено, что на фоне введения тетрахлорметана уровень АлАТ, АсАТ, ЩФ и общего билирубина экспериментальных групп значительно превышают значения интактных животных. Коэффициент Де Ритиса у опытной группы, получающей тетрахлорметан внутривенно, составляет 1,54 в то время как у животных с гепатитом, вызванном интраперитонеальным путем введения, достигает 2,44, указывая на более тяжелые поражения печени. В обоих случаях наблюдается угнетение белок-синтетической функции печени (табл. 1).

Таблица 1

Биохимические показатели крови крыс

Наименование показателя	Интактные животные	Гепатит, вызванный внутрижелудочным введением CCl_4	Гепатит, вызванный интраперитонеальным введением CCl_4
АсАТ, Е/л	$208,72 \pm 37,74$	$968,08 \pm 443,59^*$	$1772,12 \pm 381,27^*$
АлАТ, Е/л	$86,35 \pm 14,18$	$628,54 \pm 273,08^*$	$725,19 \pm 122,42^*$
ЩФ, Е/л	$749,30 \pm 81,84$	$1886,06 \pm 336,42^*$	$1602,50 \pm 165,54^*$
Общий билирубин, мкмоль/л	$15,58 \pm 3,73$	$29,41 \pm 13,84$	$24,37 \pm 2,33^*$
Общий белок, г/л	$74,37 \pm 6,02$	$56,69 \pm 7,25$	$66,14 \pm 3,05$

Примечание: * — достоверность по сравнению с контролем

Повышенное содержание МДА у опытных групп животных свидетельствует об интенсификации процессов ПОЛ, особенно при интраперитонеальном введении тетрахлорметана. Наблюдается повышение активности ферментативного звена антиоксидантной системы в тканях печени. Активность ГПО в опытных группах увеличилась в 3 раза относительно контроля, составив 32 и 34 процента активности ГПО при интраперитонеальном и внутрижелудочном введении соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Биохимические показатели крови крыс, характеризующие интенсивность процессов ПОЛ

Наименование показателя	Интактные животные	Гепатит, вызванный внутрижелудочным введением CCl_4	Гепатит, вызванный интраперитонеальным введением CCl_4
МДА, мкмоль	$1,54 \pm 0,40$	$3,38 \pm 0,35^*$	$5,03 \pm 0,42^*$
ГПО, %	$10,50 \pm 1,16$	$32,43 \pm 1,47^*$	$34,49 \pm 2,11^*$

Примечание: * — достоверность по сравнению с контролем

При визуальном макроскопическом исследовании органов брюшной полости первой группы крыс наблюдалась незначительно увеличенная печень красновато-бурого цвета, мягкой консистенции, спайки отсутствовали, в то время как у группы крыс, получавших тетрахлорметан интраперитонеально, печень была твердой, серо-желтого цвета с большим количеством спаек.

При исследовании гистологических препаратов печени крыс первой группы зарегистрирована тотальная полиморфная жировая дистрофия, синусоиды значительно сужены, в просветах отмечаются редкие клетки Купфера, преобладающим видом дистрофии является средне- и мелкоvesикулярная липидная инфильтрация, в перипортальных и центролобулярных зонах наблюдались мелкоочаговые некрозы гепатоцитов без инфильтрации.

У группы крыс, получавших тетрахлорметан интраперитонеально, наблюдается мелкоvesикулярная дистрофия гепатоцитов, некрозы носят диссеминированный характер. В перипортальных пространствах обнаружена воспалительная инфильтрация. Часть паренхимы печени замещена соединительной тканью. Численная плотность двуядерных гепатоцитов снижена относительно показателей интактного контроля (табл. 3).

Таблица 3

Показатель относительной площади (V_{vi}) зон альтернативных изменений и микроциркуляции в ткани печени крыс

Наименование группы	Объемная плотность V_{vi} (%) зон				Двуядерные гепатоциты N_{ai} , %
	Соединительной ткани	Дистрофических изменений	Некроза паренхимы	Синусоидов	
Интактные животные	$2,24 \pm 0,72$	$64,99 \pm 0,81$	$15,71 \pm 1,21$	$19,3 \pm 1,99$	$2,07 \pm 0,33$

Токсический гепатит, вызванный внутрижелудочным введением CCl_4	$8,23 \pm 0,65^*$	$62,35 \pm 3,06$	$12,84 \pm 2,10$	$16,28 \pm 2,14$	$3,25 \pm 1,0$
Токсический гепатит, вызванный интраперитонеальным введением CCl_4	$7,44 \pm 0,11^*$	$67,7 \pm 3,16$	$11,91 \pm 2,11$	$18,4 \pm 1,89$	$1,31 \pm 0,14^*$

Примечание: * — достоверность по сравнению с контролем

Дополнительно был оценен уровень летальности крыс в экспериментальных группах. У группы животных, получавших тетрахлорметан внутрижелудочно, летальность составляла 10 %, в то время как при интраперитонеальном введении четыреххлористого углерода летальность увеличилась до 50 % (табл. 4).

Таблица 4

Уровень летальности животных с токсическим гепатитом

Наименование показателя	Интактные животные	Гепатит, вызванный внутрижелудочным введением CCl_4	Гепатит, вызванный интраперитонеальным введением CCl_4
Количество экспериментальных животных в группе	10	20	20
Количество погибших животных	10	2	10
Процент летальности, %	0	10*	50*

Примечание: * — достоверность по сравнению с контролем

Заключение. Согласно полученным лабораторным данным токсический гепатит наблюдается как при интраперитонеальном введении тетрахлорметана, так и при внутрижелудочном. В обоих случаях фиксируется разрушение клеточных мембран гепатоцитов, холестаза, воспалительные, дистрофические и фибротические изменения тканей печени.

Выводы

1. Внутрижелудочное и интраперитонеальное введение тетрахлорметана вызывает подтвержденный лабораторно токсический гепатит.
2. Наиболее тяжелые поражения печени возникают при интраперитонеальном введении тетрахлорметана.
3. Внутрижелудочное введение тетрахлорметана позволяет снизить уровень летальности (до 10 %), избежать нарушения целостности кожных покровов и уменьшить проявление болевого синдрома у животных.

Список литературы

1. Журавлева Л. В. Сравнительная характеристика гепатопротекторных средств — ключ к рациональному применению / Л. В. Журавлева, Е. М. Кривоносова // Современная гастроэнтерология. — 2013. — № 4 (72). — С. 93–101.
2. Кучерявый Ю. А. Гепатопротекторы : рациональные аспекты применения : пособие для

- врачей / Ю. А. Кучерявый, С. В. Морозов. — М. : ФортеПринт , 2012. — 36 с.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова. — М. : Гриф и К, 2012. — Ч. 1. — 944 с.
 4. Bigoniya P. A comprehensive review of different liver toxicants used in experimental pharmacology / P. Bigoniya, C. S. Singh, A. Shukla // *Int. J. Pharm. Sci. and Drug Res.* — 2009. — Vol. 1 (3). — P. 125-135.
 5. Патоморфоз и современная эволюция профессиональных и производственно обусловленных заболеваний / И. О. Маринкин, Е. Л. Потеряева, Л. А. Шпагина, А. Я. Поляков // *Медицина труда и промышленная экология.* — 2010. — № 8. — С. 1-6.
 6. Особенности распределения хондроитинсульфатов и коллагена в области триад и центральных вен в зависимости от морфологических изменений в печени при персистенции бактериальной инфекции / И. П. Жураковский, М. Г. Пустоветова, С. А. Архипов, Т. А. Кунц, М. В. Битхаева, И. О. Маринкин // *Кубанский научный медицинский вестник.* — 2011. — № 4. — С. 79-83.
 7. Активация митохондриального пути апоптоза гепатоцитов при персистенции бактериальной инфекции / И. П. Жураковский, С. А. Архипов, М. Г. Пустоветова, Т. А. Кунц, М. В. Битхаева, И. О. Маринкин // *Забайкальский медицинский вестник.* — 2011. — № 2. — С. 125-131.
 8. Особенности развития фиброза печени на фоне формирования синдрома дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе / И. П. Жураковский, С. А. Архипов, М. Г. Пустоветова, Т. А. Кунц, М. В. Битхаева, И. О. Маринкин // *Сибирский медицинский журнал (г. Томск).* — 2011. — Т. 26, № 3-2. — С. 140-143.

COMPARATIVE ANALYSIS OF TOXIC HEPATITIS CAUSED BY INTRAGASTRIC AND INTRAPERITONEAL INJECTION OF TETRACHLORMETHANE SOLUTION

[*A. V. Eryutin, M. E. Fil, M. A. Shilova, S. V. Mishenina, S. V. Pozdnyakov, K. I. Yershov*](#)

FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)

Experimental models of toxic hepatitis caused intragastric and intraperitoneal injection of tetrachlormethane solution. Biochemical and morphological methods of research were applied to assessment of gravity of liver lesion. Toxic hepatitis is confirmed on the basis of the obtained data on both models. The most severe damages of liver arise at intraperitoneal injection of tetrachlormethane. Intragastric injection of tetrachlormethane allows to reduce lethality level (up to 10 %), to avoid disturbance of integrity of integuments and to reduce implication of pain syndrome at animals.

Keywords: tetrachlormethane, hepatitis.

About authors:

Eryutin Alexander Vladimirovich — student of the 3rd course of therapeutic faculty at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: mahonealex@icloud.com

Fil Marina Eduardovna — student of the 3rd course of therapeutic faculty at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: lucia_di_lammermoor@mail.ru

Shilova Margarita Anatolyevna — three-year extramural post-graduate student of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: pharmacevt85@list.ru

Mishenina Svetlana Vladimirovna — candidate of medical science, assistant professor of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: m-svetlana@ngs.ru

Pozdnyakova Svetlana Vasilyevna — doctor of biological science, professor of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: svetpozdnyakova@yandex.ru

Ershov Konstantin Igorevich — assistant of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: ershov_k@bk.ru

List of the Literature:

1. Zhuravleva L. V. The comparative characteristic of hepatoprotective agents — key to rational usage / L. V. Zhuravleva, E. M. Krivonosova // Modern gastroenterology. — 2013. — N 4 (72). — P. 93-101.
2. Kucheryavyi Y. A. Hepatoprotector : rational aspects of usage: guidance for doctors / Y. A. Kucheryavyi, S. V. Morozov. — M. : Fortepoint, 2012. — 36 p.
3. Guidance to carrying out preclinical trials of medicines / Under the editorship of A. N. Mironov. — M. : Grif and K, 2012. — P. 1. — 944 p.
4. Bigoniya P. A comprehensive review of different liver toxicants used in experimental pharmacology / P. Bigoniya, C. S. Singh, A. Shukla // Int. J. Pharm. Sci. and Drug Res. — 2009. — Vol. 1 (3). — P. 125-135.
5. Pathomorphism and modern evolution of professional also production-associated diseases / I. O. Marinkin, E. L. Poteryaeva, L. A. Shpagin, A. Y. Polyakov // Medicine of work and an industrial bionomics. — 2010. — N 8. — P. 1-6.
6. Features of distribution of chondroitin sulfate and collagen in the field of triads and the central veins depending on morphological changes in liver at persistention of bacterial infection / Nominative Zhurakovsky, M. G. Pustovetova, S. A. Arkhipov, T. A. Kuntz, M. V. Bitkhayeva, I. O. Marinkin // Kuban scientific medical bulletin. — 2011. — N 4. — P. 79-83.
7. Activation of mitochondrial method of apoptosis of hepatocytes at persistention of bacterial infection / I. P. Zhurakovsky, S. A. Arkhipov, M. G. Pustovetova, T. A. Kuntz, M. V. Bitkhayeva, I. O. Marinkin // Transbaikalsk medical bulletin. — 2011. — N 2. — P. 125-131.
8. Features of development of fibrosis of liver against the background of formation syndrome of dystrophic and degenerative changes of mesenchymal derivatives at local chronic inflammatory process / I. P. Zhurakovsky, S. A. Arkhipov, M. G. Pustovetova, T. A. Kuntz, M. V. Bitkhayeva, I. O. Marinkin // Siberian medical magazine (Tomsk). — 2011. — Vol. 26, N 3-2. — P. 140-143.