

УДК 616-092

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЗАСТОЙНОЙ ПЕЧЕНИ НА КРЫСАХ

Р. А. МУХАМАДИЯРОВ, Н. Л. ВОРОНЦОВА, Ю. А. КУДРЯВЦЕВА,
В. В. БОРИСОВ, И. Ю. ЖУРАВЛЕВА

*Федеральное бюджетное государственное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, Россия*

Цель. Оценка способа моделирования хронической печеночной недостаточности, обусловленной венозным застоем в печени.

Материалы и методы. Экспериментальную модель застойной печени выполняли на крысах-самцах линии Вистар. Для получения хронического венозного застоя у лабораторных животных лигировали левую и промежуточную печеночные вены. Адекватность модели оценивали по биохимическим и морфологическим критериям. В печени экспериментальных животных были отмечены застойные явления, венозное полнокровие, расширение пространства Диссе, баллонная дистрофия, нарушение балочного строения печеночных долек, очаговые некрозы гепатоцитов. Были отмечены статистически достоверные изменения основных биохимических маркеров функционального состояния печени, свидетельствующие о развитии печеночной недостаточности. Установленные изменения, обусловленные экспериментальной хронической печеночной недостаточностью, по выраженности и направленности соответствуют нарушениям, отмеченным у больных с пороками трикуспидального и митрального клапанов.

Заключение. Предложенная модель хронической печеночной недостаточности может быть использована в экспериментальных исследованиях для оценки функционального состояния печени и определения эффективности медикаментозной коррекции печеночного застоя.

Ключевые слова: экспериментальная печеночная недостаточность, венозный застой, маркеры, гиперферментемия.

EXPERIMENTAL MODEL OF CONGESTIVE LIVER IN RATS

R. A. MUKHAMADIYAROV, N. L. VORONTSOVA,
Y. A. KUDRYAVTSEVA, V. V. BORISOV, I. Y. ZHURAVLEVA

*Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases»
under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, Russia*

Purpose. The study was aimed at examining structural and functional hepatic changes in an experimental model of chronic hepatic failure due to venous congestion.

Materials and methods. The experimental model of congestive liver was created in male Wistar rats. To model chronic venous congestion the left and intermediate hepatic veins were ligated. The model validity was assessed by biochemical and morphological criteria. In the liver of the experimental rats the signs of stasis, venous congestion, enlarged Disse's space, balloon dystrophy, impaired structure of the lobes and focal hepatocyte necrosis were observed. Statistically significant changes in the main biochemical markers of the functional liver condition showing hepatic failure development were registered in all the study timepoints: 4, 8 and 12 weeks. Those changes due to experimental chronic hepatic failure in their intensity and direction were similar to the changes in patients with tricuspid and mitral disorders.

Conclusion. This experimental congestive liver model can be used for examining liver condition in chronic venous congestion.

Key words: experimental hepatic failure, venous congestion, markers, hyperenzymemia.

Введение

Функциональное состояние печени больных с пороками митрального и трикуспидального клапанов находится в прямой зависимости от продолжительности и тяжести заболевания, что обусловлено взаимосвязью между состоянием гемодинамики организма и функциональным состоянием печени [2].

Разработка способов коррекции хронической печеночной недостаточности (ХПН) из-за сложности

патогенетических механизмов ее развития остается до конца нерешенной проблемой. Экспериментальное моделирование ХПН имеет свои особенности, связанные с тем, что печень обладает чрезвычайно высокой способностью к регенерации, благодаря чему сравнительно быстро компенсирует нанесенные ей повреждения.

Существующие экспериментальные модели ХПН можно разделить на три группы:

1 – модели, вызываемые частичным или полным удалением печени;

2 – поражение клеток печени гепатотропными ядами;

3 – частичная или полная деваскуляризация печени (прекращение притока крови).

Наиболее известным способом моделирования ХПН является токсическое воздействие на печень четыреххлористым углеродом [4, 6, 7, 8, 10, 11]. При этом происходит преимущественное поражение клеток печеночной паренхимы и замещение их клетками соединительной ткани. Развитие ХПН в этом случае идет по типу цирроза. Другим способом является создание холестаза путем перевязки желчных протоков с одновременным введением четыреххлористого углерода во внутривенные желчные протоки [12].

Для токсического поражения гепатоцитов вместо четыреххлористого углерода может быть использован также триацетамид [4, 8].

При моделировании ХПН с использованием токсинов требуется их многократное введение, что, кроме выраженного гепатотоксического эффекта, оказывает токсическое воздействие на организм в целом.

Сосудистая форма ХПН формируется в результате нарушения печеночного кровообращения при наложении фистулы Экка и Экка – Павлова, перевязки печеночной артерии, воротной и печеночной вен, одномоментной деваскуляризации печени [4, 7]. В экспериментах на собаках показана возможность получения ХПН путем лигирования печеночных сосудов [1, 4]. Перевязку сосудов выполняют в нескольких вариантах: частичная перевязка печеночных вен, перевязка печеночных артерий, дозированное уменьшение просвета печеночных артерий.

Несмотря на большой объем исследований, проблема адекватного моделирования хронической печеночной недостаточности остается актуальной. Поражения печени, вызванные различными патологическими процессами, требуют использования соответствующих им экспериментальных моделей [13].

Цель

Оценка способа моделирования хронической печеночной недостаточности, обусловленной венозным застоем в печени. Использование такой модели позволяет не только проследить за динамикой развития печеночных нарушений по гемодинамическому типу, характерному для больных с клапанной патологией, но и в дальнейшем оценить эффективность предложенных препаратов и терапевтических процедур для коррекции развивающихся нарушений.

Материалы и методы

Эксперимент выполняли на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Животным под эфирным наркозом в асептических

условиях вскрывали брюшную полость. Для моделирования хронического венозного застоя печень отводили вправо и лигировали левую и промежуточную печеночные вены. После основного этапа операции проводили тщательный гемостаз, затем послойно ушивали ткани брюшной стенки.

Экспериментальные исследования на животных выполняли в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г. и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правилами по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденными МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977).

Ранняя послеоперационная летальность животных (до 20 %) отмечена в течение первых 48 ч после операции. Патоанатомические данные позволяют заключить, что гибель животных происходила в результате развития острой печеночной недостаточности либо внутреннего кровотечения. В последующие 12 недель показатели летальности не превышали 7 %.

Через 4, 6, 8 и 12 недель после операции экспериментальных животных под легким эфирным наркозом забивали декапитацией и брали для исследования образцы печени и крови. Для морфологического исследования кусочки печени фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина. Препараты готовили по стандартной гистологической методике. Парафиновые срезы толщиной 7–10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, соединительную ткань выявляли окраской по Ван-Гизону. В качестве контрольной группы были использованы интактные животные.

Маркером интенсивности воспаления служил церулоплазмин (ЦП), содержание которого в сыворотке крови определяли по модифицированному методу Ravin с парафенилендиаминном солянокислым (п-ФДА) [5]. Для оценки энергетического обмена определяли содержание АТФ в эритроцитах крови. Определение количества АТФ проводили ферментативно с использованием диагностических наборов (BioVision, USA).

В качестве критерия клеточного повреждения печени использовали активность органоспецифических ферментов в сыворотке крови и гомогенатах печени экспериментальных животных. Активность холинэстеразы (ХЭ) определяли с использованием кинетических наборов ЗАО «Вектор-Бест». Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) определяли кинетическим методом, используя диагностические наборы KONE DIAGNOSTICS (Финляндия). Активность аргиназы (АРГ) определяли по скорости образования продукта реакции – мочевины [9].

Все биохимические определения проводили на спектрофотометре Ultrospec plus (Pharmacia, UK).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 7.0. Производили предварительную проверку выборок на нормальность распределения с использованием критерия χ^2 . Рассчитывали значение средней арифметической величины и стандартной ошибки. Для оценки достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании печени крыс через 8 недель (рис. 1) были выявлены дистрофические изменения паренхимы, инфильтрация портальных зон долек печени, зернистая деструкция цитоплазмы гепатоцитов, деструкция печеночных балок, расширение синусов и пространства Диссе. В отдельных участках печени наблюдали некроз.

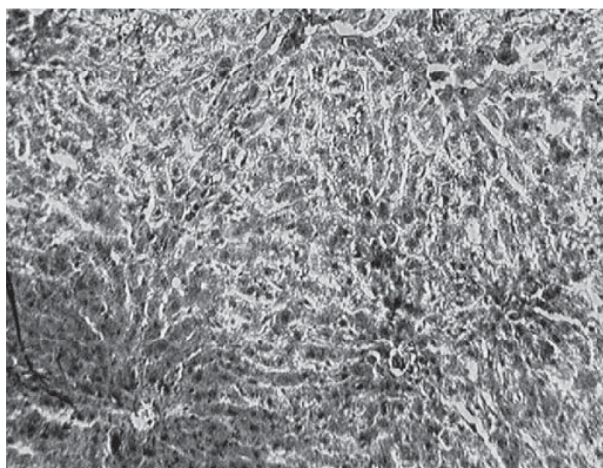


Рис. 1. Срез печени крысы через 8 недель после перевязки промежуточной и правой печеночных вен. Расширение синусных капилляров, участки некроза. Гематоксиллин-эозин. Ув. $\times 200$

Через 12 недель в печени экспериментальных животных были отмечены стереотипные морфологические изменения (рис. 2): портальные сосуды расширены, стенка вен отечна, синусоидные капилляры резко расширены, большинство из них заполнено форменными элементами крови, в паренхиме баллонная дистрофия, небольшое количество клеток некротизировано. Морфологические исследования показали, что, несмотря на наличие регенеративных процессов, в печени сохраняются дистрофические изменения паренхимы. Пролиферации соединительной ткани не наблюдали.

Уже через 4 недели в сыворотке крови животных были отмечены значительное увеличение содержания ЦП ($p < 0,01$) и снижение количества АТФ в крови (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют об активизации анаэробного гликолиза в результате гипоксического повреждения печени. Через 6 недель отмечены изменения направленности ис-

следуемых показателей. Содержание ЦП снижалось до контрольного уровня, однако едва ли этот факт можно объяснить нормализацией метаболических процессов в организме, поскольку такое резкое снижение уровня ЦП при подтвержденном морфологически гипоксическом повреждении печени может свидетельствовать о напряжении антиоксидантных систем. Уровень АТФ к этому сроку незначительно повышался с последующей тенденцией к снижению на 8-й неделе эксперимента и становился достоверно ниже фонового ($p < 0,05$) на 12-й неделе эксперимента. Установленное снижение уровня АТФ может свидетельствовать о метаболических нарушениях, обусловленных уменьшением перфузии печеночной ткани.

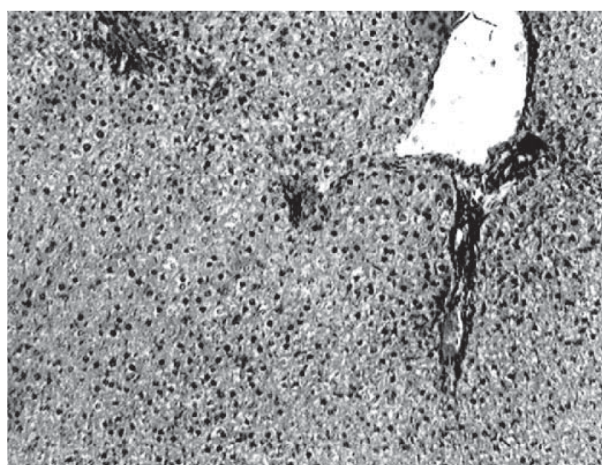


Рис. 2. Срез печени крысы через 12 недель после перевязки промежуточной и правой печеночных вен. Расширенность портальных вен. Гематоксиллин-эозин. Ув. $\times 100$

Таблица 1

Биохимические показатели крови животных в различные сроки после моделирования хронической печеночной недостаточности

Показатель	Параметры	Церулоплазмин, г/л	АТФ, мкМ/л
Контроль	M $\pm$ SEM n	8,67 $\pm$ 0,57 8	125,98 $\pm$ 14,59 8
4 недели	M $\pm$ SEM n p	15,28 $\pm$ 1,39 9 0,0014	88,60 $\pm$ 12,85 9 0,082
6 недель	M $\pm$ SEM n p	8,44 $\pm$ 1,02 10 0,26	159,88 $\pm$ 13,06 6 0,048
8 недель	M $\pm$ SEM n p	11,20 $\pm$ 1,16 10 0,032	82,42 $\pm$ 15,50 9 0,023
12 недель	M $\pm$ SEM n p	6,42 $\pm$ 0,61 7 0,0038	66,66 $\pm$ 13,83 7 0,0081

Примечание. P – уровень значимости различий относительно контроля.

Изменение активности органоспецифических ферментов закономерно отражает степень клеточно-печеночной недостаточности и указывает на активность патологического процесса в печени. Так, было установлено, что при экспериментальном моделировании венозного застоя происходит значительное изменение активности основных маркеров функционального состояния печени (табл. 2), свидетельствующее о развитии хронической печеночной недостаточности. Через 8 недель после перевязки печеночных вен активность АРГ в сыворотке крови животных увеличивалась в 2,5 раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). В эти же сроки активность ГГТ в сыворотке крови животных возрастала в 1,6 раза, что указывает на развитие холестаза. Активность ХЭ сыворотки экспериментальных животных после 8 недель эксперимента снижена на 35 % от величины, отмеченной в контрольной группе ($p < 0,05$), что весьма показательно для хронического поражения печени, так как данная величина отражает степень клеточно-печеночной недостаточности.

Через 12 недель после операции изменения ферментного спектра крови животных усиливались. Было отмечено дальнейшее снижение активности ХЭ – ее величина почти в 2 раза ниже, чем в сыворотке животных контрольной группы ($p < 0,05$). Наиболее значительно возрастала активность сывороточной АРГ: через 12 недель хронического венозного застоя активность фермента увеличивается более чем в 6 раз ($p < 0,01$); активность ЛДГ – в 2 раза ($p < 0,01$), ГГТ – в 1,8 раза ($p < 0,01$) превышала уровень, отмеченный в группе контроля.

Изменения активности ферментов в ткани печени были выражены менее значительно, однако с достаточной статистической достоверностью ($p < 0,05$). Экспериментальный венозный застой в печени обусловил нарушение синтеза ХЭ в печени экспериментальных животных, поэтому через 8 недель

активность ХЭ была меньше в среднем на 11 %, через 12 недель – на 16 % от уровня контрольной группы. Снижение активности аргиназы в гепатоцитах было более выраженным и составляло на 25 % через 8 недель и 33 % через 12 недель эксперимента. Активность ГГТ в печени через 8 недель не имела достоверных отличий от контрольной группы, через 12 недель была снижена на 15 %.

Нарушение кровообращения в тканях печени во все сроки наблюдения приводило, в сущности, к однотипным сдвигам. Гиперферментемия, возникающая после моделирования венозного застоя в печени животных, может быть обусловлена альтерацией печеночной ткани, при этом изменение активности ферментов зависит от объема печеночной ткани, включенной из портального кровообращения.

В целом полученные данные свидетельствуют о развитии в течение периода наблюдения печеночной недостаточности, обусловленной снижением венозного оттока.

Ранее было показано, что изменения ферментного спектра крови больных с митральным стенозом тесно связаны с недостаточностью кровообращения, обусловленной основным заболеванием. Для этой категории больных характерно значительное изменение ферментного спектра сыворотки крови – наличие гепатоспецифической гиперферментемии и снижение активности секреторных ферментов [2]. Установленные в данной работе изменения в сыворотке животных с экспериментальной хронической печеночной недостаточностью по выраженности и направленности соответствуют нарушениям, отмеченным у больных с клапанной патологией.

Таким образом, перевязка левой и промежуточной печеночных вен у крыс приводит к значительному повреждению паренхиматозных клеток и вызывает существенное нарушение функции печени. Реакция клеточных структур на нарастающее застойное

Таблица 2

Динамика активности ферментов в сыворотке крови и гомогенатах печени животных в различные сроки после моделирования хронической печеночной недостаточности

Показатель	АРГ	ЛДГ	ГГТ	ХЭ
Сыворотка:	мкмоль/мл ч	ммоль/л ч	Е/л	Е/л
Контроль, n = 9	2,6±0,06	16,81±0,60	28,86±1,12	427,8±10,6
8 недель, n = 10	6,14±0,11	36,38±0,62	46,66±1,67	282,4±7,1
p	0,0014	0,00006	0,00016	0,00025
12 недель, n = 8	14,39±0,16	38,06±0,95	52,58±2,23	241,8±6,4
p	0,00096	0,0001	0,0007	0,0006
Печень:	ммоль/г мин		ммоль/г мин	мкмоль/г мин
Контроль, n = 9	12,3±0,83		6,75±1,4	2,31±0,20
8 недель, n = 8	9,25±1,37		6,37±0,3	2,05±0,15
p	0,00082		0,23	0,15
12 недель, n = 7	8,16±1,09		5,89±0,23	1,95±0,07
p	0,00061		0,044	0,023

Примечание. Р – уровень значимости различий относительно контроля.

полнокровие печени характеризуется несколькими стадиями своего развития, что находится в полном соответствии с закономерностями ответных реакций организма на органном и системном уровнях и отражает динамику различного соотношения собственно патологических и компенсаторных реакций в ходе развития хронической печеночной недостаточности. Наибольшие изменения установлены через 12 недель после моделирования ХПН, однако во все сроки эксперимента как биохимические, так и морфологические показатели свидетельствуют о наличии у животных метаболических нарушений, обусловленных венозным застоем.

Заключение

Экспериментальная модель хронической печеночной недостаточности, воспроизведенная путем перевязки левой и промежуточной вен печени крысы линии Вистар, адекватно отражает метаболические нарушения в печени, обусловленные венозным застоем. Предложенная модель ХПН может быть использована в экспериментальных исследованиях для оценки функционального состояния печени и для определения эффективности медикаментозной коррекции печеночного застоя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асадулаев Ш. М. Состояние нижней полой вены и межкавадных перетоков при портальной гипертензии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Спец. 14.00.27 – хирургия. Великий Новгород, 2007. 25 с.
2. Оценка динамики некоторых биохимических показателей сыворотки крови больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения / Н. Л. Воронцова [и др.] // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 1994. № 3. С. 44–49.
3. Скворцов В. В. Оптимизация лечения хронических диффузных заболеваний печени с использованием лазеротерапии. Волгоград, 2006. 133 с.
4. Abalde J. G., Pasarin M., Garcia-Pagan J. C. Animal models of portal hypertension // World J. Gastroenterol. 2006. Vol. 41, № 12. P. 6577–6584.
5. Arnaud Ph., Gianazza E., Miribel L. Ceruloplasmin // Meth. Enzymol. 1997. Vol. 163. P. 441–452.
6. Hepatic ^{31}P MRS in rat models of chronic liver disease: assessing the extent and progression of disease / I. R. Corbin [et al.] // GUT. 2003. Vol. 52. P. 1046–1053.
7. Diaz-Gómez D., Jover M., del-Campo J. A. Experimental models for hepatic encephalopathy // Rev Esp Enferm Dig. Madrid. 2011. Vol. 103, № 10. P. 536–541.
8. Gandillet A., Vidal I., Alexandre E. Experimental models of acute and chronic liver failure in nude mice to study hepatocyte transplantation // Cell Transplant. 2005. Vol. 14, № 5. P. 277–290.
9. Geyer J. W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // Anal. Biochem. 1971. Vol. 39, № 2. P. 412–417.
10. Fujii T., Fuchs B. C., Yamada S. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor // BMC Gastroenterology. 2010. Vol. 79, № 10. P. 5–11.
11. Kobayashi N., Ito M., Nakamura J. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis // Hepatology. 2000. Vol. 31. P. 851–857.
12. Kountouras J., Billing B. H., Scheuer P. J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat // Br. J. Exp. Pathol. 1984. Vol. 65. P. 305–311.
13. Mullen K. D., McCullough A. J. Problems with animal models of chronic liver disease: Suggestions for improvement in standardization // Hepatology. 1989. Vol. 9, issue 3. P. 500–503.

Статья поступила 21.11.2012.