

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ АЛКОГОЛЬНОГО ГЕПАТИТА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Петров А.Н., Шевчук М.К., Георгианова Е.К., Сивак К.В., Стосман К.И.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт
токсикологии Федерального медико-биологического агентства»*

Россия, 192019, г. Санкт-Петербург, Бехтерева ул., д. 1

Тел./факс 8 (812) 365-06-80; e-mail: institute@toxicology.ru

Резюме: Представлены две экспериментальные модели алкогольного гепатита, основанные на внутрижелудочном введении прогрессивно увеличивающихся доз ректифицированного спирта интактным животным или животным с предварительно сформированной патологией печени, обусловленной токсическим действием четыреххлористого углерода. В первом случае за 2,5 месяца в зависимости от продолжительности введения и дозы развивается алкогольный гепатит лёгкой и средней степени тяжести, во втором патология развивается в течение 8 дней. Последняя модель может быть использована для быстрого скрининга гепатопротекторных средств.

Ключевые слова: Алкогольный гепатит, экспериментальное моделирование, биомаркеры, гепатопротекторы, цитолиз, холестаза.

DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MODELS OF ALCOHOLIC HEPATITIS OF VARYING SEVERITY

Petrov A.N., Shevchuk M.K., Georgianova E.K., Sivak K.V., Stosman K.I.

*Federal State Institution of Science "Institute of Toxicology, Federal Medical-
Biological Agency"*

Abstract: We represent two experimental models of alcoholic hepatitis based on intragastric administration of progressively increasing doses of rectified alcohol in intact animals or animals with a pre-formed liver disease caused by toxic effects of carbon tetrachloride. In the first case within 2.5 months we obtained alcoholic hepatitis of mild to medium severity depending on the duration of administration and dose; in the second case abnormality develops within 8 days. The latter model can be used for express-screening of hepatoprotective preparations.

Key words: Alcoholic hepatitis, experimental models, biomarkers, hepatoprotective preparations, cytolysis, cholestasis.

Введение

Алкогольный гепатит (АГ) классифицируются (К 70.1) как одна из форм алкогольной болезни печени (К 70 по МКБ 10). По материалам ВОЗ алкогольная болезнь печени развивается у лиц, употребляющих более 8 литров алкоголя в год (в пересчёте на чистый этанол). Несмотря на сокращающееся по информации главного нарколога РФ Е. Брюна среднестатистическое потребление алкоголя в России за последние годы (около 18 л в 2010 г., 15,6 л в 2012 г. и 13,5 л в 2013 г.), этот показатель свидетельствует о высокой вероятности развития различных форм алкогольного поражения печени у определённых контингентов населения.

По данным отечественных клинических наблюдений алкогольные гепатиты являются причиной значительного числа трудопотерь, инвалидизации больных, а также цирроза печени и фатальных осложнений [1, 2, 3, 4, 5]. Весьма важно определение чётких диагностических критериев алкогольного поражения печени в виде АГ для усовершенствования существующих средств и методов лечения и профилактики, разработки стандарта лечения этого патологического состояния. В этой связи актуальной является разработка экспериментальных моделей АГ, поскольку только в эксперименте на животных имеется возможность воздействовать строго определённым этиологическим фактором (в нашем случае – алкоголем) и, в зависимости, от времени его экспозиции и дозы вызывать органное поражение различной степени тяжести. Сложность разработки экспериментальной модели АГ определяется видовыми особенностями реакции объекта исследований – грызунов на вводимый извне алкоголь и, связанной с этим трудностью введения последнего в количествах эквивалентных потреблению людьми, склонными к злоупотреблению спиртными напитками. Кроме того, адекватной алкоголизации животных – грызунов препятствует высокая скорость метаболизма этанола, составляющая у крыс 300-350 мг/кг и у мышей 600-700 мг/кг, что соответственно в 3-4 и в 10 раз выше, чем у человека. Для формирования токсических эффектов крысы должны получать не менее 7-8 г/кг, а мыши – 15 г/кг этанола в сутки [6]. Предлагаемые схемы введения этанола [7, 8, 9, 10] были слишком продолжительны, а использование специальных диет, даже в экспериментах на приматах [11, 12] не приводило к формированию развернутой картины АГ.

Важным условием успешного моделирования любой патологии является подбор маркеров, характеризующих моделируемое состояние. Этими маркерами могут быть

биохимические, иммунологические и гистологические показатели, регистрируемые при формировании АГ.

Исходя из основных патологических синдромов, развивающихся при алкогольном гепатите [13, 14, 15] такими маркерами могут быть активность аспаргатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и её изоферментов – ЛДГ4 и ЛДГ3; специфических печеночных ферментов: фруктозо-1-фосфатальдолазы, сорбитдегидрогеназы, а также концентрации ферритина, сывороточного железа, витамина В₁₂ и билирубина главным образом за счет повышения прямой фракции, характеризующих синдром цитолиза [16, 17, 18]. Маркерами АГ может быть также повышенный уровень в сыворотке крови щелочной фосфатазы (ЩФ), ГГТФ, холестерина, Р-липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛПВП, ЛПНП) конъюгированной фракции билирубина, желчных кислот, фосфолипидов [14, 19, 20, 21].

Характерными, но не специфическими иммунологическими биомаркерами АГ являются: уровень фактора некроза опухоли (TNF- α), сывороточных противовоспалительных цитокинов (IL-8, IL-1, IL-2, IL-6), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) [22].

Специфических морфологических признаков алкогольного гепатита в клинике до настоящего времени не выявлено [23]. К основным морфологическим характеристикам АГ относят некроз гепатоцитов с мезенхимальной реакцией, алкогольный гиалин (тельца Мэллори), преобладание в воспалительном инфильтрате полиморфно-ядерных лейкоцитов [24].

Целью настоящей работы являлась разработка экспериментальной модели АГ разной степени тяжести и доказательство её адекватности эффективностью применения известных гепатопротекторов – эссенциале и гептрал (адеметионин).

Материалы и методы

АГ различной степени тяжести, в зависимости от концентрации и продолжительности введения этанола, моделировали на белых крысах в соответствии с разработанным нами режимом введения, который заключался в ежедневном внутривнутреннем (в/ж) введении животным 40% ректификованного этилового спирта в увеличивающихся дозах: 5 г/кг, 7 г/кг и 10 г/кг в перерасчете на чистый этанол в течение 4, 3 и 3 недель, соответственно. Эвтаназию и забор биоматериала (крови) для проведения биохимических, иммунологических и патоморфологических исследований осуществляли по окончании 2-го и 3-го срока алкоголизации и после прекращения введения

лекарственных препаратов. Продолжительность формирования АГ с использованием данной схемы составляет 2,5 месяца.

В качестве скрининговой модели АГ, позволяющей получить результаты в более короткие сроки, применялось введение ректификованного этилового спирта крысам с поражением печени, вызванным предварительным введением 50% раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) в растительном масле из расчёта 1 мл/кг массы тела, поскольку известно, что АГ часто может развиваться на фоне гепатопатии неалкогольной этиологии. Оставшимся в живых крысам, на 3-и сутки вводили ректификованный этиловый спирт в виде 40% раствора, в дозах 7 г/кг – 3 дня, 10 г/кг – 3 дня, 12г/кг однократно, после чего через двое суток после последнего ведения проводили эвтаназию животных и производили забор крови с последующей регистрацией биохимических, иммунологических и гистологических показателей. Продолжительность формирования АГ в данном случае составляет 7 дней. Использование данной схемы позволяет моделировать острую форму АГ, однако дифференцировать патологию печени по степеням тяжести при данной постановке эксперимента невозможно, поскольку продолжающееся введение этанола в увеличивающихся дозах после формирования АГ не вызывало дальнейшего углубления патологии печени.

Для доказательства адекватности разработанных моделей в течение 3-х дней крысам после прекращения алкоголизации внутривенно (в/в) вводили гепатопротекторы с разными механизмами действия: эссенциале и гептрал в дозах 150 и 300 мг/кг, соответственно, после чего животных подвергали эвтаназии с забором материала для регистрации биохимических, иммунологических и патоморфологических показателей. Определение биохимических, иммунологических и патоморфологических маркеров АГ проводили стандартными методами [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31].

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием t-критерия Стьюдента

Результаты. По мере алкоголизации посредством в/ж введения этанола в увеличивающихся дозах (1-я модель) у крыс прогрессировало изменение биохимических, иммунологических и гистологических показателей. Как следует из данных, представленных в таблице 1 уже к концу первого срока алкоголизации наблюдалось увеличение активности ферментов, характеризующих процесс цитолиза – АлАТ и АсАТ и холестаза – ЩФ и ГГТФ. В дальнейшем, к 3-му сроку при дальнейшем повышении активности этих ферментов присоединилась гиперхолинестеремия, характеризующая

усиление цитолиза. В клинической практике принято, что повышение уровня активности АлАТ и АсАТ менее чем в 5 раз по сравнению с верхней границей нормы рассматривается как умеренная, от 5 до 10 раз – как средняя и свыше 10 раз – как высокая степень выраженности, что позволяет отнести развившуюся к 3-му сроку алкоголизации патологию к АГ средней степени тяжести.

Таблица 1 – Влияние длительного введения этанола в прогрессивно увеличивающихся дозах на биохимические показатели сыворотки крови крыс

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы			
	Контроль (интактные)	1 срок алкоголизации	2 срок алкоголизации	3 срок алкоголизации
Холестерин, ммоль/л	1,38±0,20	1,42±0,18	1,53±0,24	1,89±0,17*
Билирубин, мкмоль/л	10,6±0,3	12,4±0,7	11,9±1,1	12,9±0,6
АлАТ, МЕ/л	21,0±5,4	40, 8±6,6*	82, 8±13, 2*	131,4±25,8*
АсАТ, МЕ/л	27,0±3,0	75,0±9, 6*	157,8±6,6*	187, 2±15, 0*
ЩФ, Ед/л	277,2±41,2	458,5±51,7*	1105,4±56,2*	1564±113,4*
ГГТФ МЕ/л	4,9±1,3	20,4±1,6*	34,5±2,4*	99,7±6,8*
Примечание – *– достоверные различия по сравнению с контролем (p<0,05)				

Исследование состояния иммунологических маркеров АГ, вызванного введением этанола в прогрессивно увеличивающихся дозах, показало увеличение уровня TNF-α к 1-му сроку алкоголизации и возрастание уровня средне- и низкомолекулярных ЦИК, достоверное к 3-му сроку (таблица 2). Эти данные подтверждают мнение об основополагающей роли TNF-α в алкогольном повреждении печени [32, 33] и правомочность использования этого показателя в сочетании с другими биохимическими и патоморфологическими показателями как неспецифического маркера АГ.

Таблица 2 – Влияние длительного введения этанола в прогрессивно увеличивающихся дозах на уровень ЦИК и TNF-α в сыворотке крови крыс

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы			
	Контроль (интактные)	1 срок алкоголизации	2 срок алкоголизации	3 срок алкоголизации
ЦИК высокомолекулярные, у.ед.	2,7±1,0	4,0±1,1	2,3±0,3	4,0±1,4

ЦИК среднемолекулярные, у.ед.	9,0±1,2	12,3±1,6	14,4±2,5	12,4±1,3*
ЦИК низкомолекулярные, у.ед.	28,1±2,2	34,0±2,0	35,2±3,2	36,0±3,5*
TNF-α, пг/мл	33,9±5,4	54,7±7,2*	24,3±2,9	46,3±6,6
Примечание – * – достоверные различия по сравнению с контролем (p<0,05)				

Морфологические и гистологические исследования печени крыс показали нарастание патологической симптоматики при введении прогрессивно увеличивающихся доз этанола. При введении этанола в дозе 5 г/кг морфологическая картина печени отравленных животных не отличалась от контроля, введение этанола в дозе 7 г/кг в цитоплазме единичных гепатоцитов обнаружены мелкие капельки жира, а при увеличении дозы этанола до 10 г/кг отмечены выраженные патологические изменения: очаговая мелкокапельная жировая дистрофия в сочетании с белковой дистрофией гепатоцитов, при наличии размытости и нечеткости клеточных границ, гиперхромности клеточных ядер клеток, наличие участков диссоциации печеночных клеток.

Сочетание нарастания морфологических и гистологических изменений в печени и биохимических показателей в сыворотке крови, наблюдаемое при введении этанола в увеличивающихся концентрациях позволяет рассматривать синдром, развивающийся ко второму сроку алкоголизации как гепатит легкой степени, а к 3-му сроку как гепатит средней степени тяжести.

При использовании схемы формирования АГ на фоне предварительно созданной патологии печени, вызванной воздействием CCl₄ установлено, что введение CCl₄ приводило к формированию у крыс печеночной патологии, характеризующейся развитием жировой дистрофии гепатоцитов, гипербилирубинемией, и активацией холестаза или воспалительными изменениями желчных канальцев (увеличение активности ГГТФ) (таблица 3), статистически значимым снижением уровня TNF и увеличением уровня цитокинов, особенно за счет низкомолекулярных ЦИК (таблица 4). Гистологические исследования показали наличие умеренно выраженной очаговой крупнокапельной жировой дистрофии печени.

Последующее введение этанола в дозах 7 и 10 мг/кг у крыс с фоновой патологией печени вызывало следующие изменения:

а) дозозависимое увеличение степени повреждения желчных канальцев, выявленное по значимому увеличению активности ферментов-маркеров холестаза ГГТФ и ЩФ;

б) тенденцию к увеличению степени цитолиза – увеличение активности трансаминаз и концентрации билирубина (таблица 3);

в) дальнейшее снижение уровня TNF- α , достоверным по отношению к интактным и животным, получившим CCl₄, что говорит о развитии токсической иммунодепрессии, обусловленной в основном действием CCl₄, усиливающимся при введении этанола [34];

г) нарастание явлений жировой дистрофии, нарушение трабекулярной структуры гепатоцитов, набухание и нечеткость клеточных границ.

Дальнейшее продолжение введения спирта в дозе 12 г/кг не вызывало выраженного усиления патологического эффекта, судя по динамике изменения биохимических и иммунологических показателей и морфологических показателей.

Выявленные изменения свидетельствует о существенном снижении детоксикационного потенциала системы иммунитета и о значительном уменьшении элиминации ЦИК (таблица 4).

Из представленных данных можно заключить, что введение этанола в прогрессивно увеличивающихся дозах интактным животным (таблицы 1-2) и на фоне патологии печени, вызванной предварительным введением четыреххлористого углерода (таблицы 3-4) вызывает нарушения функции печени пропорционально длительности введения.

Таблица 3 – Влияние введения этанола на биохимические показатели сыворотки крови крыс на фоне гепатопатии, вызванной введением CCl₄

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы				
	Интактные животные	CCl ₄	Этанол 7 г/кг	Этанол 10 г/кг	Этанол 12 г/кг
Билирубин, мкмоль/л	9,2±0,7	16,8±5,8 */**	14,7±2,3*	26,5±5,7*	13,6±1,5
АлАТ, МЕ/л	7,2±0,9	6,3±3,4	6,1±2,8	9,2±4,9	6,9±1,0
АсАТ, МЕ/л	26,6±1,4	34,1±1,9*	49,3±3,1*/**	53,0±6,4*/**	65,7±8,5*/**
ЩФ, нмоль/с×л	348,7±29,0	773,8±103,0*	975,3±99,5 */**	2442,5±151,7 */**	2335±9,1 */**
ГГТФ, нмоль/с×л	31,0±14,1	345,6±63,1*	114,3±20,9*	668,0±101,5 */**	701,1±5,1 */**
Примечания					
1 – * – Отличия достоверные сравнению с группой интактных крыс (p<0,05)					
2 – ** – Отличия достоверные сравнению с группой CCl ₄ (p<0,05)					

Таблица 4 – Влияние введения этанола на иммунологические показатели сыворотки крови крыс на фоне гепатопатии, вызванной введением CCl_4

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы				
	Интактные	CCl_4	Спирт ректификованный 7 г/кг	Спирт ректификованный 10 г/кг	Спирт ректификованный 12 г/кг
ЦИК высокомолекулярные, у.ед.	4,3±1,3	9,3±3,2	8,3±1,8	7,9±4,1	7,7±3,4
ЦИК среднемолекулярные, у.ед.	6,8±2,2	15,0±2,2*	19,7±4,6*	11,1±4,7	10,3±5,4
ЦИК низкомолекулярные, у.ед.	44,1±6,9	152,5±25,4*	157,6±26,4*	148,4±35,8*	150,1±29,8*
TNF- α , пг/мл	23,5±5,3	14,2±3,6*	7,3±2,5*/**	4,2±1,3*/**	5,3±1,7*
Примечания: 1 – * – Достоверные различия по сравнению с интактными ($p < 0,05$) 2 – ** – Достоверные различия по сравнению контролем 2 ($p < 0,05$)					

Для проверки адекватности разработанных моделей АГ были предприняты эксперименты по оценке влияния гепатопротекторов гептрала и эссенциале на биохимические, иммунологические и гистологические показатели на экспериментальных моделях гепатитов (таблица 5-9). Данные, приведенные в таблице 5, демонстрируют развитие патологического процесса, характеризующееся достоверным возрастанием активности всех печеночных ферментов, билирубина и креатинина, АОРР более чем в 2 раза, увеличением протромбинового времени, что свидетельствует о развитии печеночной недостаточности со снижением белковосинтетической и детоксикационной функции печени. Исследуемые гепатопротекторы вызывают уменьшение этих показателей, причем эссенциале благотворно влияет на активность, только АлАТ, что выражает снижение синдрома цитолиза. Эффект гептрала более выражен, происходит уменьшение цитолиза гепатоцитов, выраженности холестаза, уменьшается степень накопления окисленных белков АОРР в крови крыс, т.е. проявляется антиоксидантное действие.

Таблица 5 – Влияние эссенциале и гептрала на биохимические показатели сыворотки крови крыс с экспериментальным АГ средней степени тяжести, вызванным введением этанола

Показатели	Интактные животные	Нелеченые	Леченые эссенциале	Леченые гептралом
АлАТ, МЕ/л	23,63±3,20	61,00±9,65*	44,64±2,99*/**	39,58±4,58*/**
АсАТ, МЕ/л	66,36±6,90	269,53±14,69*	137,39±13,87*	101,28±12,44*/**
ГТФ, МЕ/л	6,89±2,24	18,71±1,23*	15,82±1,48*	15,04±2,36*
ЩФ, Ед/л	290,4±14,4	463,9±77,7*	429,8±67,7*	342,0±33,4**
Билирубин, мкмоль/л	8,12±0,82	17,56±1,33*	17,28±1,67*	16,25±0,81*
ПТВ, сек	28,20±1,16	43,34±6,57*	31,96±2,78	32,40±3,91
Креатинин, мкмоль/л	27,16±7,17	50,92±9,43*	45,86±2,82*	42,48±6,16*
Мочевина, ммоль/л	4,67±0,32	4,98±0,30	4,62±0,52	4,68±0,44
АОРР, мкмоль/л	111,89±9,89	191,92±24,15*	175,09±18,65*	153,71±13,19*/**
Примечания: 1* – Различия значимы по сравнению с интактными животными, $p \leq 0,05$ 2** – Различия значимы по сравнению с группой нелеченных животных, $p \leq 0,05$				

При оценке фракционного состава ЦИК крыс с признаками АГ отмечено значимое увеличение уровня наиболее токсичной низкомолекулярной фракции ЦИК (таблица 6). Выявленные изменения указывают на существенное снижение детоксикационного потенциала системы иммунитета, значительное уменьшение элиминации ЦИК, а также нарушения в системе комплемента и фагоцитов [35].

Одновременно наблюдалось повышение уровня цитокинов – TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , свидетельствующее об активации воспалительного процесса. В тоже время в крови животных не выявлено изменения уровня IL-6, биологические эффекты которого сходны с таковыми TNF- α и IL-1. Уровень IL-4 также оставался на уровне нормы. Отсутствие повышения уровня IL-4 может свидетельствовать о хронизации воспалительного процесса в печени, т.к. дефицит противовоспалительных цитокинов способствует поддержанию иммунного воспаления и прогрессированию заболевания.

Лечение развившейся патологии эссенциале и гептралом привело к снижению повышенных уровней низкомолекулярных ЦИК, TNF- α , IL-1 α и IL-1 β до нормальных значений. Различий в действии препаратов не выявлено (таблица 6).

Таким образом, снижение содержания основных провоспалительных цитокинов под влиянием изучаемых препаратов, вероятно, приводит к нормальному протеканию процессов регенерации печени.

Таблица 6 – Влияние эссенциале и гептрала иммунологические показатели АГ

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы			
	Интактные животные	Нелеченые животные	Леченые эссенциале	Леченые гептралом
ЦИК высокомолекулярные, у.ед.	13,2±3,4	24,6±9,7	8,2±3,3	16,3±5,2
ЦИК среднемолекулярные, у.ед.	36,2±13,1	64,2±15,0	26,8±12,0	25,8±5,6
ЦИК низкомолекулярные, у.ед.	67,2±8,0	142,8±26,8*	61,4±12,0	121,8±28,3
TNF-α, пг/мл	9,5±2,2	20,4±4,0*	6,8±3,9	12,4±5,4
IL-1α, пг/мл	15,5±6,4	5,2±2,4*	20,9±9,5	32,7±7,8
IL-1β, пг/мл	6,0±1,2	0,9±0,4*	8,2±5,6	13,4±4,0
IL-4, пг/мл	0	0	0	0
IL-6, пг/мл	0	0	0	0
Примечания: 1 – * – Отличия существенны по сравнению с интактными крысами при $p \leq 0,05$ 2 – ** – Отличия существенны по сравнению с нелечеными крысами при $p \leq 0,05$				

Используемые гепатопротекторы уменьшали выраженность гистологических изменений печени, главным образом воспалительных и жировой дистрофии

Таблица 7 – Влияние эссенциале и гептрала на гистологические показатели АГ, вызванного введением этанола

Экспериментальные группы	Выраженность патоморфологических изменений, баллы		
	Жировая дистрофия	Склеротические изменения	Воспалительные изменения
Интактные крысы	0	0	0
Нелеченые животные	II	III	III
Леченые эссенциале	I	II-III	II
Леченые гептралом	I	II-III	II

Используемые гепатопротекторы оказались эффективными и на модели АГ, вызванного введением этанола на фоне токсического поражения печени (АГ смешанного типа).

Можно заключить, что полученные данные свидетельствуют не только об эффективности гепатопротекторов при АГ, но и о предполагаемом механизме их действия, возможности использования их для купирования разных форм АГ и вероятности развития побочных эффектов. Например, CCl_4 обладает не только гепато-, но и нефротоксическим действием, что приводит к снижению скорости клубочковой

фильтрации и нарастанию уровня креатинина и мочевины. При этом введение эссенциале способствовало снижению выраженности нарушения функции почек, предотвратив переход фазы печеночной недостаточности в синдром полиорганной недостаточности. Напротив, введение гептрала вызывало ухудшение функции почек (таблица 8), что может быть обусловлено образованием комплексов метаболитов этанола и CCl_4 с гептралом и усилением в связи с этим нефротоксичности.

Таблица 8 – Влияние эссенциале и гептрала биохимические показатели АГ смешанного типа

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы				
	Интактные животные	CCl_4	CCl_4 + спирт (на начало лечения)	Леченые эссенциале	Леченые гептралом
АлАТ, МЕ/л	31,73 ±2,97	19,62 ±7,64	27,6 ±2,22	32,34 ±7,47	21,94 ±1,04
АсАТ, МЕ/л	96,97 ±14,32	187,43 ±10,66 *	164,15 ±13,35*	117,8 ±20,16	122,12 ±15,8
ГТФ, МЕ/л	10,56 ±2,94	18,64 ±1,5*	25,36 ±2,04*	13,6 ±1,93**	15,32 ±1,03**
ЩФ, Ед/л	219,8 ±25,1	303,8 ±39,2*	312,5 ±28,9*	344,1 ±38,6*	236,4 ±20,2**
Билирубин, мкмоль/л	8,24 ±1,11	26,82 ±4,13*	50,71 ±4,12*	8,37 ±0,52**	8,57 ±0,21**
ПТВ, сек	31,20 ±1,28	40,00 ±2,44*	45,80 ±2,60*	33,80 ±3,33**	35,40 ±4,40**
Креатинин, мкмоль/л	56,2 ±6,09	137,4 ±16,3*	236,8 ±45,4*	101,6 ±12,7*/**	214,6 ±35,2*
Мочевина, ммоль/л	6,35 ±1,31	10,31 ±1,34*	9,9 ±1,07*	7,31 ±1,06	22,44 ±6,89*/**
АОРР, мкмоль/л	91,92 ±18,00	298,53 ±44,71 *	553,75 ±41,63*	58,47 ±11,73**	61,62 ±6,90**
Примечания: 1 – * – Отличия существенны по сравнению с интактными крысами при $p \leq 0,05$ 2 – ** – Отличия существенны по сравнению с нелечеными крысами при $p \leq 0,05$					

Представленные в таблице 9 данные свидетельствуют о почти 2-х кратном повышении наиболее патогенной низкомолекулярной фракции ЦИК при совместном действии CCl_4 и этанола. Хотя достоверных изменений других регистрируемых показателей не отмечено, что может свидетельствовать о развивающейся токсической иммунодепрессии. Так как известно, что острая этанол-индуцированная иммуносупрессия возникает в связи со снижением продукции TNF- α [36]. В тоже время уровни

интерлейкина-4 (IL-4) и интерлейкина 6 (IL-6) соответствовали значениям в норме при недостоверно повышенных уровнях интерлейкина- α (IL- α) и интерлейкина- β (IL- β).

Введение эссенциале и гептрала позволило нормализовать наметившуюся тенденцию. При этом введение гептрала вызывало повышение концентрации TNF- α , в то время как при использовании эссенциале уровень данного цитокина соответствовал норме.

Таблица 9 – Влияние эссенциале и гептрала на иммунологические показатели АГ смешанного типа

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы				
	Интактные животные	CCl ₄	CCl ₄ + спирт до лечения	Леченые эссенциале	Леченые гептралом
ЦИК высокомолекулярные, у.ед.	25,1 ±7,8	17,6 ±2,3	19,6 ±7,0	11,0 ±4,2	16,3 ±5,2
ЦИК средномолекулярные, у.ед.	55,1 ±10,9	67,8 ±24,1	45,6 ±17,0	38,0 ±12,6	40,4 ±7,5
ЦИК низкомолекулярные, у.ед.	109,8 ±16,7	224,6 ±38,7*	191,6 ±26,0*	136,0 ±19,2	121,8 ±28,3
TNF- α , пг/мл	9,5 ±2,2	4,5 ±2,2	7,5 ±3,0	11,3 ±3,3	25,3 ±11,3
IL-1 α , пг/мл	15,5 ±6,4	28,1 ±8,2	19,7 ±5,2	52,1 ±26,3	82,3 ±25,4
IL-1 β , пг/мл	6,0 ±1,2	12,6 ±6,1	8,3 ±7,3	20,0 ±12,3	51,3 ±21,2
IL-4, пг/мл	0	0	0	0	0
IL-6, пг/мл	0	0	0	0	0

Примечание – * – Отличия существенны по сравнению с интактными крысами при $p \leq 0,05$

Изменения гистологических показателей при введении гепатопротекторов крысам с развившимся АГ смешанного типа представлены в таблице 10. Из этих данных следует, что введение эссенциале уменьшает выраженность жировой дистрофии, а при введении гептрала жировая дистрофия, склеротические и воспалительные проявления нивелируются.

Таблица 10 – Влияние эссенциале и гептрала на гистологические показатели АГ смешанного типа

Экспериментальные группы	Выраженность патоморфологических изменений, баллы		
	Жировая	Склеротические	Воспалительные

	дистрофия	изменения	изменения
Интактные животные	0	0	0
Интактные крысы	II-III	I	I
Нелеченные животные	II	I	I
Леченные эссенциале	I	I	I
Леченные гептралом	0	0	I

Заключение

В результате проведенных исследований разработана схема принудительной алкоголизации животных, приводящая к развитию экспериментального АГ. Использование схемы с длительным (в течение 2,5 месяцев) введением этанола в увеличивающихся дозах позволит моделировать АГ легкой и средней степени тяжести. Схема с использованием предварительного поражения печени четырёххлористым углеродом создаст возможность для формирования в короткий срок (8 дней) экспериментального АГ, что позволяет моделировать острую форму АГ, а также проводить скрининговую оценку лекарственных препаратов – гепатопротекторов для лечения данной патологии. Изучена эффективность лекарственных препаратов эссенциале и гептрала как эталонных гепатопротекторов на разработанных моделях АГ. Установлено, что введение использованных препаратов приводило к уменьшению выраженности проявлений АГ. По спектру нормализуемых признаков поражения печени и выраженности их коррекции предоставляется возможность судить о механизмах действия оцениваемых препаратов и патологических процессах, на которые проявляется их нормализующее действие. С другой стороны, в зависимости от сроков алкоголизации и доз вводимого этилового спирта можно изучать влияние лекарственных препаратов на проявления АГ различной степени тяжести и на разных стадиях развития патологического процесса.

Литература

1. Сухарева Г.В. Алкогольная болезнь печени // Consilium medicum. Гастроэнтерология. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 26-27.
2. Мухин А.С. Алкогольная болезнь печени: автореф. дис. д-ра мед. наук. – М., 1980.– 32 с.
3. Иванников И.О., Сюткин В.Е. Общая гепатология. – М.: Медпрактика, 2003. – 160 с.

4. Логинов А.С., Блок Ю.Е., Джалалов К.Д. Алкоголь и печень – М.: Высшая школа, 1987. – 94 с.
5. Никитин И.Г. Иммунные механизмы прогрессирования алкогольной болезни печени // Гепатологический форум. – 2005. – № 4. – С. 8-11.
6. Буров Ю.В., Жуков В.Н. Биологические модели хронического алкоголизма // Токсикология ВИНТИ. – 1984. – Т.13. – С. 57-92.
7. Tokeyama Y., Kamimura S. et al. Role of Kupfer cell-derived reactive oxygen intermediates in alcoholic liver disease in rats in vivo // Alcohol Clin. Exp. Res. – 1996. – V.20 (Suppl.). – P. 335-339.
8. Nawasurit P., Ward T.H., Dodd N.J.F. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants // Carcinogenesis. – 2000. – V. 21. – P. 93-99.
9. Corsetti G., Stacchiotti A., Tedesco L., D'Antona G., Pasini E., Dioguardi F.S., Nisoli E., Rezzani R. Essential amino acid supplementation decreases liver damage induced by chronic ethanol consumption in rats // Int J Immunopathol Pharmacol. – 2011. – V. 24(3). – P. 611-619.
10. Habib-ur-Rehman M., Mahmood T., Salim T., Afzal N., Ali N., Iqbal J., Tahir M., Khan A. Affect of silymarin on serum levels of ALT and GGT in ethanol induced hepatotoxicity in albino rats // J. Ayib. Med.Col. Abbottabad. – 2009. – V. 21. – P. 73-75.
11. Lieber C.S., De Carli L.M. Quantitive relationship between the amount of dietary fat and the alcoholic fatty liver // Amer. J. Clin. Nutr. – 1970. – V. 23. – P. 474-478.
12. Popper H., Lieber L.S. Histogenesis of alcoholic fibrosis and cirrosis in the baboon // Amer. J. Pathol. – 1980. – V.98. – P. 695-716.
13. Григорьев П.Я., Яковенко Э.Я. Диагностика и лечение хронического гепатита и цирроза печени // Советская медицина. – 1985. – № 12. – С. 61-67.
14. Костюкевич О.И. Алкогольное поражение печени: социальное звучание, клинические последствия и аспекты патогенетической терапии // Болезни органов пищеварения. – 2007. – №2. – С. 62-67.
15. Дегтярева А.В., Мухина Ю.Г., Володин Н.Н. Проект протокола дифференциальной диагностики и лечения синдрома холестаза у новорожденных детей. – М.: Изд-во ММА, 2010. – 14 с.
16. Alatalo P., Koivisto H., Puukka K., Hietala J., Anttila P., Bloigu R., Niemelä O. Biomarcers of liver status in Heavy drinkers, moderat drinkers and abstainers Alcohol // Alcohol. – 2009. – V. 44(2). – P. 199-203.

17. Puukka K., Hietala J., Koivisto H., Anttila P., Bloigu R., Niemelä O. Addictive effects of moderate drinking and obesity on serum gamma-glutamyl transferase activity // *Am J Clin Nutr.* – 2006. – V. 83(6). – P. 1351-1354.
18. Niemelä O. Biomarker in alcoholism // *Clin Chim Acta.* – 2007. – V. 377(1-2). P. 39-49.
19. Дегтярева А.В., Мухина Ю.Г., Володин Н.Н. Проект протокола дифференциальной диагностики и лечения синдрома холестаза у новорожденных детей. – М.: Изд-во ММА, 2010. – 14 с.
20. Сивак К.В. Биомаркеры алкогольного поражения печени и поджелудочной железы // *Человек и алкоголь (алкогольные болезни): материалы 3-го междисциплинарного российского конгресса 23-24 апреля 2009 г.* – СПб., 2009. – С. 68.
21. Булгакова В.С., Высокогорский В.Е., Притыкина Т.В., Титов С.С. Нарушение обмена углеводсодержащих соединений при алкогольной интоксикации // *Наркология.* – 2008. – № 5. – С. 50-53.
22. Albano E., Vidali M. Immune mechanism in alcoholic liver disease // *Genes Nutr.* – 2010. – V. 5(2). – P. 141-147.
23. Алексеенко С.А., Щупак А.Ю., Лебедько О.А., Пучков Ю.А. Острый токсический гепатит, развившийся вследствие употребления спиртосодержащих дезинфектантов. – Хабаровск, 2010. – 157 с.
24. Алятин Ю.С., Турьянов М.Х. Алкогольное поражение печени: дифференциальная диагностика с вирусными гепатитами // *Эпидем. и инфекц. болезни.* – 2003. – №1. – С. 58.
25. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. – СПб.: Гиппократ, 1998. – 156 с.
26. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. – М., 1987. – 365 с.
27. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ (В сб. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ). – М., 2000. – С. 228.
28. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor // *Ann. Clin. Biochem.* – 1969. – V.6. – P. 24.

29. Macut D. et al. Oxidised lowdensity lipoprotein concentration – early marker of an altered lipid metabolism in young women with PCOS // *Eur. J. Endocrinol.* – 2006. – V.155, № 1. – P. 131-136.
30. Winn-Deen T.S. Development of a direct assay for alpha-amylase // *Clin.Chem.* – 1988. – V. 34, №10. – P. 2005-2008.
31. Ridnour L.A., Sim J.E., Hayward M.A., Wink D.A., Martin S.M., Buettner G.R., Spitz D.R. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media // *Anal Biochem.* – 2000. – V.281 – P. 223-229.
32. Мехтиев С.П., Кравчук Ю.А., Карпов С.В., Широких А.В. Патогенез и подходы к терапии при остром алкогольном гепатите. Материалы 3-го междисциплинарного российского конгресса «Человек и алкоголь (алкогольные болезни)». – СПб, 2009. – С. 12-17.
33. Nchez Perez M.J., Lez-Reimers E.G. et al. Lipid peroxidation and serum cytokines in acute alcoholic hepatitis // *Alcohol and Alcoholism.* – 2006. – V. 41. – P. 593-597.
34. Лужников Е.А., Гольдфарб Ю.С., Марупов А.М. Эндотоксикоз при острых экзогенных отравлениях. – М.: «Бином», 2008. – 200 с.
35. Маевская М.В., Буеверов А.О. Цитокины в патогенезе алкогольного гепатита и возможности терапии // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.* – 2009. – №2. – С. 14-19.
36. Ильницкий А.Н., Жернакова Н.И., Постникова Л.И., Борисов О.А., Позднякова Н.М. Молекулярные механизмы нейроиммуноэндокринных эффектов алкоголя и соматическая патология // *Научные ведомости Серия Медицина. Фармация.* – 2011. – № 4 (99). Выпуск 13. – С. 5-12.