

ПОКРАЩЕННЯ МОДЕЛЮВАННЯ ТА ДІАГНОСТИКИ

ПЕЧІНКОВОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ У ЩУРІВ

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України (м. Київ)

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

МОН України (м. Київ)

elinam@ukr.net

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми № 11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № державної реєстрації 0111U004648) ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Вступ. Захворювання печінки є серйозною медико-соціальною проблемою, оскільки 60% хворих, що страждають від цієї патології, складають особи працездатного віку [1]. Серед патологій печінки однією з актуальних і складних проблем є діагностика ускладнень у хворих на цироз печінки (ЦП), особливо печінкової енцефалопатії (ПЕ) [6]. Різкому збільшенню кількості хворих на ЦП сприяло зростання рівня захворюваності вірусними і токсичними (алкогольними) ураженнями печінки. Алкогольний цироз розвивається приблизно в 15-20% осіб, які зловживають алкогольними напоями впродовж 5-20 років, частіше в чоловіків [7]. До 40% хворих на ЦП протягом тривалого часу не висловлюють ніяких скарг, у них зберігається безсимптомний перебіг захворювання. Проте, як тільки розвиваються ускладнення захворювання: ПЕ, асцит, кровотечі з варикозно розширених вен (ВРВ) стравоходу та шлунка, прогресивне погіршення стану стає неминучим [2,4]. Серед ускладнень ЦП найбільш загрозливими для життя є не тільки кровотечі з верхніх відділів шлунково-кишкового тракту, а й енцефалопатія – дистрофічна зміна тканини головного мозку, що призводить до порушення функції цього органу [8]. Важкість основних клінічних проявів ЦП, як правило, визначає прогноз і тактику лікування.

У хворих на ЦП ПЕ зустрічається у 50-80% хворих, з яких виражені клінічні ознаки неврологічних і психічних порушень зустрічаються тільки у 40-46%, а інша частина має латентну (клінічно приховану) форму патології [5,9]. ПЕ є найбільш частим та виснажливим ускладненням захворювання печінки незалежно від його етіології, що серйозно впливає на життя пацієнтів та їх опікунів. Прогрес в діагностиці та лікуванні захворювання обмежується складністю патогенезу захворювання, механізми якого ще не повністю розкриті [3].

Велика поширеність ЦП, прогресивний перебіг захворювання, недостатня ефективність сучасних методів діагностики, розвиток важких інвалідизуючих ускладнень визначає високу медичну і соціально-еко-

номічну значущість вивчення ЦП. Досягнуто помітних успіхів у діагностиці та лікуванні ЦП, однак ще багато питань залишається без відповіді. Це потребує подальшого дослідження механізмів патогенезу ПЕ у хворих на ЦП різної етіології і пошуку нових методів діагностики, диференціальної діагностики. У сучасній науковій літературі наведені експериментальні дослідження та накопичений фактичний матеріал щодо моделей ПЕ при захворюваннях печінки. Але точний прототип моделювання ПЕ відсутній в зв'язку, зокрема, із значною смертністю тварин в результаті ускладнень ЦП. Нині дослідники використовують модель ПЕ, де в якості хімічної сполуки використовують чотирихлористий вуглець (CCl_4) в поєднанні з вазеліновою олією у співвідношенні 1:1, що вводиться одноразово щотижня протягом 4-6 тижнів. ПЕ діагностується за наявності вираженого дистрофічного процесу гепатоцитів, в судинній системі і жовчних протоках портальних трактів. Зміни функціонування мозку були вивчені на моделі формування умовного харчового рефлексу: було виявлено збільшення часу пробіжки щурами до харчового підкріплення на відстань 30 см до 100-150 с по прямій лінії (патент RU 2363990). Але за даної моделі вивчення ПЕ не зрозуміло, чи добігання щурів до їжі пов'язане з порушенням мислення, чи із загальною загальмованістю мозкових процесів та зниженою руховою активністю. Тому актуальним є розробка моделі діагностики ПЕ, в якій враховуються зміни показників основних когнітивних функцій у щурів: мислення, навчання та пам'яті. Більш того, застосування даної моделі в наших експериментах призводило до значного рівня летальності серед лабораторних тварин, що ускладнювало планування досліджень. В зв'язку з цим ми звернули увагу на модель внутрішньочеревинного (в/о) введення 0,75 мл/кг 15%-розчину CCl_4 за Lihua та співавт. (2015) [10]. В даній роботі введення тетрахлорметану для викликання ЦП здійснювали впродовж 8 тижнів, що суттєво збільшує тривалість експерименту. Тому логічним було незначне збільшення дози та частоти введення, щоб моделювати патологію за коротший час з мінімальною летальністю тварин в ході експерименту.

Отже, з огляду на вищезазначене, **метою роботи** було уточнення моделювання ПЕ у щурів з гепатитами та ЦП та оцінка розвитку цієї патології на основі вивчення харчового умовного рефлексу в Т-подібному

МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ

лабіринті з урахуванням оцінки мислення, навчання та пам'яті.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проведено на 14 щурах-самцях згідно нормативів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)».

Тварини були розділені на 2 групи по 7 щурів в кожній: I – інтактні тварини, II – дослідні. Для моделювання експериментальної ПЕ, II групі тварин вводили в/о 1 мл/кг 15% розчину CCl_4 в оливковій олії чотири рази на тиждень впродовж 4 тижнів [10]. Всі тварини мали вільний доступ до води та їжі. Після закінчення введення CCl_4 досліджували порушення роботи мозку (розвиток печінкової енцефалопатії) на моделі вироблення харчового умовного рефлексу, мислення, навчання та пам'яті.

Харчовий умовний рефлекс досліджували в Т-подібному лабіринті у тварин, схема якого зображена на **рисунку 1**.

У тварин оцінювали швидкість утворення харчового умовного рефлексу, який визначали за часом від входження в Т-подібний лабіринт до знаходження їжі в лівому рукаві лабіринту та початку годівлі. Для отримання відтворюваного результату здійснювали наступні маніпуляції. За тиждень до вироблення харчового умовного рефлексу до стандартного корму щурів додавали сир, щоб виробити звикання до цього типу їжі у тварин. Під час дослідження щурів в лабіринті тварин тримали на легкому голоді (тваринам давали корм з розрахунку 15 г комбікорму на щура масою 250 г при нормі 20-30 г). Під час експерименту щура саджали у центральну частину лабіринту, оточену стінками, та розпочинали відлік часу. Через певний час щур знаходив вихід з центральної частини у п-подібний

коридор, що мав два рукави (поворот наліво і направо). В кінці лівого рукава знаходилася їжа (декілька кубічних шматочків сиру загальною масою 30 г). Реєстрували час в секундах, коли тварина знаходила сир (підбігала до нього) та час, коли починала їсти (час до харчового підкріплення). Другий часовий показник був обраний для порівняння. Після знаходження їжі тварини дозволяли їсти впродовж 30 с для зменшення негативного підкріплення, пов'язаного з вилученням щура з лабіринту після початку годівлі, що частково зменшувало стрес та негативні асоціації у тварин з годівлею в лабіринті. Оцінювали запам'ятовування щурів, в якому рукаві знаходиться їжа, за значенням помилкових поворотів у правий рукав. Спостерігали за виробленням харчового рефлексу впродовж 14 днів. Оцінювали динаміку зміни часу від входження тварин обох груп в лабіринт до початку годівлі, а також порівнювали час до харчового підкріплення у щурів двох груп на 14 добу експерименту.

Результати дослідження та їх обговорення.

На початку експерименту тварини інтактної групи знайшли їжу та почали їсти через 157 ± 47 с після входження в центральну частину лабіринту (**рис. 2**). В перший тиждень від початку досліду у інтактних щурів не було зареєстровано скорочення часу до харчового підкріплення. На 5 і 6 добу час до початку годівлі навіть зростав в 1,7 ($p < 0,05$) та 1,8 рази ($p < 0,05$) порівняно з першою добою. Хоча час знаходження їжі скорочувався: тварини підбігали до їжі, потім перебігали в правий рукав, і лише через 60-180 с починали їсти. Позитивну динаміку скорочення часу до харчового підкріплення почали відмічати, починаючи із 7 доби від початку експерименту. Вже на 9 добу зменшення часу харчового підкріплення складало 58% ($p < 0,05$) порівняно з 6 добою від початку вироблення харчового умовного рефлексу. На 11 добу спостерігали стійке вироблення харчового умовного рефлексу: час знаходження їжі та годівлі скорочувався повільніше. З 11 до 14 доби час до харчового підкріплення зменшувався з 31 ± 5 с до $12,6 \pm 2$ с, або на 60% ($p < 0,05$). Порівняно з початком експерименту час знаходження їжі та харчове підкріплення зменшувалося на 80% ($p < 0,05$) на 11 добу експерименту

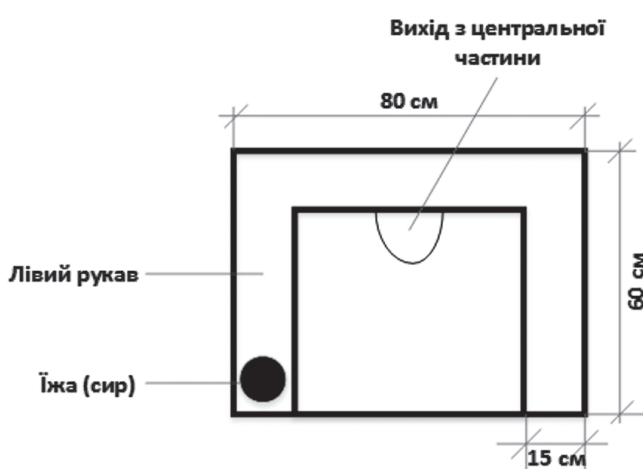


Рис. 1. Фото та схема Т-подібного лабіринту.

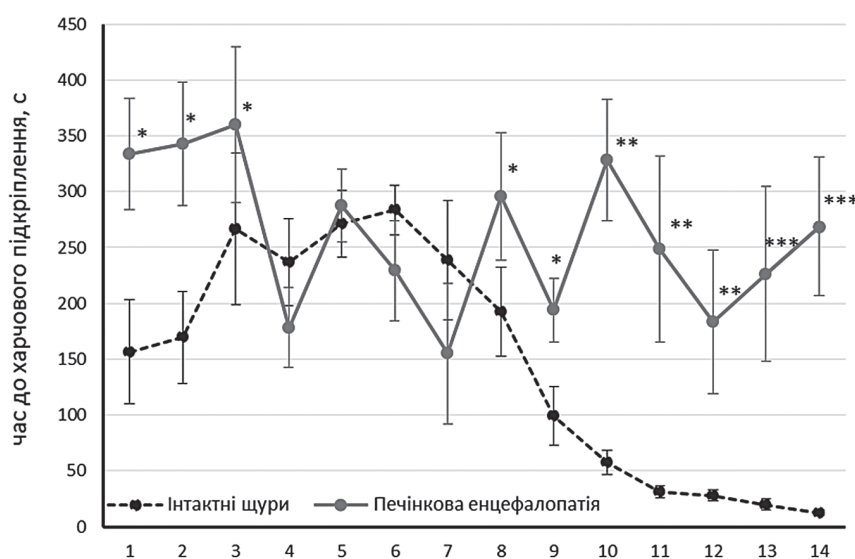


Рис. 2. Час харчового підкріплення в динаміці при виробленні харчового умовного рефлексу за умов моделювання цирозу печінки, викликаного введенням CCl_4 ($n=7$, $M \pm m$).
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – порівняно з показниками інтактних тварин відповідної доби експерименту.

та 92% ($p < 0,05$) на 14 добу експерименту. В наступні дні скорочення часу знаходження їжі не реєстрували. Отже, за нашими даними вироблення умовного рефлексу на знаходження їжі становило 14 діб.

Введення CCl_4 , що супроводжується токсичним ефектом на функціонування печінки, призводило до суттєвого погіршення мислення, навчання та пам'яті у щурів. Послаблення когнітивних процесів було зареєстровано вже на першу добу після початку експерименту. Час до харчового підкріплення становив 334 ± 50 с, що було в 2,1 рази ($p < 0,05$) більше за відповідний показник інтактних щурів (рис. 2). Впродовж всіх 14 діб не виявлено позитивної динаміки скорочення часу від входження в лабіринт до харчо-

вого підкріплення. Варто відмітити, що процесу вивчення, де знаходиться їжа, у щурів з CCl_4 -індукованим цирозом не відбувалося. На 14 добу у цій групі не було значущого зменшення часу харчового підкріплення порівняно з першим днем.

Більш того, якщо в один день щур швидко знаходив їжу, в наступний день цього могло не спостерігатися, що свідчить про відсутність запам'ятовування, в якому рукаві лабіринту міститься їжа. Якщо інтактні щури після 7 доби повертали після виходу з центральної частини лабіринту наліво в напрямку їжі, то щури, яким вводили CCl_4 , часто помилялися, повертаючи в лабіринті не в лівий, а в правий рукав.

З рисунку 2 видно, що у тварин, яким вводили CCl_4 , на 9, 10, 11, 12, 13 добу час до харчового підкріплення перевищував відповідні показники інтактних щурів в 2,0 ($p < 0,05$), 5,7 ($p < 0,01$), 7,9 ($p < 0,01$), 6,6 ($p < 0,01$) та 11,4 рази ($p < 0,001$). На 14 добу після початку вироблення харчового умовного рефлексу час до знаходження їжі і початку годівлі у щурів з CCl_4 -індукованим цирозом перевищував показники контролю в 21,4 рази ($p < 0,001$) (рис. 3).

Отже, отримані дані свідчать про розвиток печінкової енцефалопатії у групі щурів з CCl_4 -індукованим ЦП. Дана схема моделювання ЦП та ПЕ є покращеною, оскільки результати можна реєструвати вже через місяць після початку введення чотирьоххлористого вуглецю, і при цьому досягається незначна смертність ($< 10\%$). Покращення діагностики ПЕ було досягнуто застосуванням методики формування харчового умовного рефлексу у щурів. Її результати свідчать про значне збільшення часу пробіжки до харчового підкріплення, відсутністю запам'ятовування та мислення у щурів з патологією печінки. Описаний метод може бути рекомендований, як основний для моделювання ПЕ.

Висновки

1. Моделювання печінкової енцефалопатії у щурів здійснювали шляхом внутрішньочеревинного введення 1 мл/кг 15% розчину CCl_4 в оливковій олії чотири рази на тиждень впродовж 4 тижнів.

2. Зниження когнітивної функції у тварин, яким вводили CCl_4 , було діагностовано за порушенням формування харчового умовного рефлексу тваринами в Т-подібному лабіринті.

Перспективи подальших досліджень. Розроблена модель є підґрунтям для тестування нових препаратів для покращення когнітивної функції в умовах розвитку печінкової енцефалопатії на тлі патології печінки. Одним з перспективних напрямів є дослідження ефективності гліатиліну (холін альфосцерату) в порівнянні зі стандартним лікуванням цирозу із застосуванням лактулози, ларнаміну та рифаксиміну.

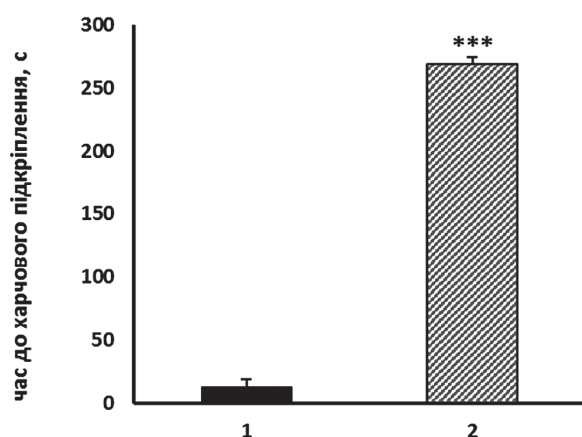


Рис. 3. Час харчового підкріплення при виробленні харчового умовного рефлексу на 14 добу за умов моделювання цирозу печінки, викликаного введенням CCl_4 ($n=7$, $M \pm m$).
1 – інтактні щури,
2 – щури з печінковою енцефалопатією.

*** $p < 0,05$ – порівняно з показниками інтактних тварин.

Література

1. Grover V. P. The why and wherefore of hepatic encephalopathy / V. P. Grover, J. M. Tognarelli, N. Massie [et al.] // International journal of general medicine. – 2015. – Vol. 8. – P. 381-390.
2. Huang Y.-W. Pathogenesis and management of alcoholic liver cirrhosis: a review / Y.-W. Huang, S.-S. Yang, J.-H. Kao // Hepatic medicine : evidence and research. – 2011. – Vol. 3. – P. 1-11.
3. Liu A. Advances in cirrhosis: optimizing the management of hepatic encephalopathy / A. Liu, R. B. Perumpail, R. Kumari [et al.] // World journal of hepatology. – 2015. – Vol. 7, № 29. – P. 2871-2879.
4. Mendizabal M. Liver transplantation in acute liver failure: a challenging scenario / M. Mendizabal, M. O. Silva // World journal of gastroenterology. – 2016. – Vol. 22, № 4. – P. 1523-1531.
5. Nand N. Clinical profile of alcoholic liver disease in a tertiary care centre and its correlation with type, amount and duration of alcohol consumption / N. Nand, P. Malhotra, D. K. Dhoot // The Journal of the Association of Physicians of India. – 2015. – Vol. 63, № 6. – P. 14-20.
6. Rahimi R. S. Hepatic encephalopathy: how to test and treat / R. S. Rahimi, D. C. Rockey // Current opinion in gastroenterology. – 2014. – Vol. 30, № 3. – P. 265-271.
7. Wang J.-Y. Prevalence of minimal hepatic encephalopathy and quality of life evaluations in hospitalized cirrhotic patients in china / J.-Y. Wang, N.-P. Zhang, B.-R. Chi [et al.] // World journal of gastroenterology. – 2013. – Vol. 19, № 30. – P. 4984-4991.
8. Yang L. Effect of allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of hepatic cirrhosis / L. Yang, Y. Wang, X. Wang, Y. Liu // Journal of traditional Chinese medicine. – 2015. – Vol. 35, № 1. – P. 63-68.

УДК 616.36-004+615.917+612.821.5

ПОКРАЩЕННЯ МОДЕЛЮВАННЯ ТА ДІАГНОСТИКИ ПЕЧІНКОВОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ У ЩУРІВ

Манжалій Е. Г., Кондратюк В. Є., Фалалєєва Т. М., Вірченко О. В., Голишкін Д. В.

Резюме. Було уточнено моделювання печінкової енцефалопатії (ПЕ) у щурів з гепатитами та цирозом печінки та оцінений розвиток цієї патології на основі вивчення харчового умовного рефлексу в Т-подібному лабіринті. З огляду на дані літератури та шляхом підбору доз було запропоновано для оптимального моделювання ПЕ тваринам вводити внутрішньочеревинно 1 мл/кг 15% розчину CCl_4 в оливковій олії чотири рази на тиждень впродовж 4 тижнів. Розвиток ПЕ, а саме порушення здатності тварин до запам'ятовування, навчання та мислення, вивчали за виробленням умовного харчового рефлексу в Т-подібному лабіринті. Оцінювали динаміку зменшення часу добігання тварин до харчового підкріплення в лабіринті внаслідок запам'ятовування місця знаходження їжі. Результати свідчать про значне збільшення часу пробіжки до харчового підкріплення, відсутністю запам'ятовування та мислення у щурів з патологією печінки. Описаний метод може бути рекомендований, як основний для моделювання ПЕ.

Ключові слова: CCl_4 , цирроз печінки, печінкова енцефалопатія, харчовий умовний рефлекс.

УДК 616.36-004 + 615.917 + 612.821.5

УЛУЧШЕНИЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У КРЫС

Манжалій Э. Г., Кондратюк В. Е., Фалалеева Т. М., Вирченко А. В., Гольшкін Д. В.

Резюме. Было уточнено моделирование печеночной энцефалопатии (ПЭ) у крыс с гепатитами и циррозом печени и оценено развитие этой патологии на основе изучения пищевого условного рефлекса в Т-образном лабиринте. Учитывая данные литературы и путем подбора доз было предложено для оптимального моделирования ПЭ животным вводить внутрибрюшинно 1 мл/кг 15% раствора CCl_4 в оливковом масле четыре раза в неделю в течение 4 недель. Развитие ПЭ, а именно нарушение способности животных к запоминанию, обучению и мышлению, изучали по выработке условного пищевого рефлекса в Т-образном лабиринте. Оценивали динамику уменьшения времени добегающего животного к пищевому подкреплению в лабиринте вследствие запоминания места нахождения пищи. Результаты свидетельствуют о значительном увеличении времени пробежки до пищевого подкрепления, отсутствии запоминания и мышления у крыс с патологией печени. Описанный метод может быть рекомендован как основной для моделирования ПЭ.

Ключевые слова: CCl_4 , цирроз печени, печеночная энцефалопатия, пищевой условный рефлекс.

UDC 616.36-004 + 615,917 + 612.821.5

IMPROVEMENT OF THE MODELING AND DIAGNOSIS OF HEPATIC ENCEPHALOPATHY IN RATS

Manzhaliy E. G., Kondratiuk V. E., Falalyeyeva T. M., Virchenko O. V., Golyshkin D. V.

Abstract. One of the challenging problem in gastroenterology is the treatment of liver cirrhosis (LC) and hepatic encephalopathy (HE) as one of its dangerous complications. HE is the frequent disorder that hits approximately 50-80% of cirrhotic patients. This pathology is associated with progressive dystrophy of brain tissue and can lead to patients' disability. Therefore, the study of the mechanisms of etiology and pathogenesis and possible strategies of treatment of HE is current issue of scientists all over the world.

Today CCl_4 is used for modeling of LC and HE in rats. However, this method has some limitations namely high mortality of lab animals or high duration of LC formation. Also diagnosis of HE was made on the study of the food conditioned reflex that allowed to evaluate only locomotor activity of animals but not their ability to think and remember. That is why the aim of the study was the optimization of HE modeling and diagnose.

The modeling of HE in rats with hepatitis and liver cirrhosis was improved. Considering the literature data and selecting doses, intraperitoneally administration of 1 ml/kg 15% solution of CCl_4 in olive oil four times a week for

4 weeks has been suggested for optimal simulation of HE in rats. The development of HE, namely the ability of animals to memorization, learning and thinking was studied by the formation of a food conditioned reflex in the T-shaped maze. 14 rats were divided into two groups: 1 – intact rats and 2 – rats pretreated with CCl_4 . The dynamic of reducing the time of getting animals to the food reinforcement in the maze as a result of remembering the location of food was estimated during 14 days.

In the first day of food conditioned reflex study it was established that intact rats reached the food in 157 ± 47 sec. Contrary, the time of getting to food of CCl_4 -rats was 2,1 times ($p < 0.05$) longer that suggests the less activity and lethargy of these animals. In the next 7 days, there were not any changes in the time of getting to food in T-shape maze in the intact group as well as in the group pretreated with CCl_4 . Since the 7th day we have shown a steady acceleration of finding the food by intact rats. However, there were not registered data about faster food reinforcement in the group of animals that got CCl_4 injection. Moreover, in the group of intact rats we have established the decrease in time of finding the food by 92% ($p < 0.05$) as compared with the first day of experiment. Such changes were not obvious for the CCl_4 -group: we did not find the significant difference between the reaching food of CCl_4 -rats at the start and at the 14th day of experiment in the T-shaped maze. Thus, we registered that the time of finding the food in the CCl_4 group was 21.4 ($p < 0.001$) greater than in the intact group at the 14th day of study in the T-shaped maze. The impairment of food conditioned reflex formation has showed lack of remembering and thinking in rats pretreated with CCl_4 . This confirms the progression of liver pathology and concomitant dystrophy of brain tissue with the development of HE.

In conclusion, we have updated the scheme of modeling LC and HE by the decrease of time of the LC development and the reduction of animal mortality as result of toxic action by CCl_4 . The improved diagnosis of HE was achieved by using the methodology of forming a food conditioned reflex in rats. This method can be recommended as a basic for HE modeling and can be used for study new treatment strategies of this disease.

Keywords: CCl_4 , liver cirrhosis, hepatic encephalopathy, food conditioned reflex.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 01.02.2016 року