

© І. Я. ДЗЮБАНОВСЬКИЙ, М. С. ГНАТЮК, Т. В. РОМАНЮК

ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”

Моделювання цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії. Критерії ефективності

I. Ya. DZYUBANOVSKY, M. S. HNATIUK, T. V. ROMANIUK

SHEI “Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky”

MODELING LIVER CIRRHOSIS WITH PORTAL HYPERTENSION SYNDROME. CRITERIA OF EFFECTIVENESS

У науковій роботі запропоновано авторську експериментальну модель цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії. Визначено критерії ефективності корисної моделі в експерименті на дослідних тваринах.

Author's experimental model of liver cirrhosis with portal hypertension syndrome was proposed in scientific work. Criteria of experimental model effectiveness on animals also was determined.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Одним з ефективних методів вивчення синдрому портальної гіпертензії є експериментальна модель. Саме експериментальна модель дозволяє детально дослідити патофізіологічні механізми, дати їм оцінку, напрацювати методи хірургічної корекції, визначити їх ефективність, що не завжди можливо в клінічних умовах [1].

На сьогодні відомо багато численних способів моделювання синдрому портальної гіпертензії. Найбільш поширеним способом є часткове лігування портальної вени, що є оптимальним на сьогодні для моделювання позапечінкової портальної гіпертензії [1, 9], але абсолютно не підходить для моделювання внутрішньопечінкової портальної гіпертензії [1, 23, 25, 14].

Серед способів моделювання внутрішньопечінкової портальної гіпертензії “стандартним” на сьогодні вважається спосіб з введенням в організм піддослідній тварині гепатотоксичної отрути – чотирихлористого вуглецю, чи тіоацетаміду [1, 19, 21, 12, 16, 20, 18, 15].

При моделюванні захворювання чотирихлористим вуглецем піддослідній тварині 40 % розчин чотирихлористого вуглецю вводять внутрішньо з їжею двічі на тиждень з розрахунку 2 мл/кг [13, 12]. При даній моделі розвиток фіброзу пов’язаний з активацією цитохром Р450-залежної монооксидази, розташованої в перивенулярних гепатоцитах, і з продукцією ними реактивних видів кисню. Незважаючи на те, що ці порушення при припиненні дії токсину обо-

ротні, тривале його застосування може призвести до формування цирозу печінки. При цьому процес формування цирозу печінки починається через 1,5–2 міс. від початку експерименту з чітким вираженням патологічного процесу через 3–4 місяці [24, 1, 24, 20]. Суттєвим недоліком відомого способу є значна тривалість процесу моделювання цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії, недостатня ефективність методики, що впливає з недостатньої керованості експериментальної моделі. Так, відповідно до програми виконання способу, захворювання моделюється лише у 30–40 % дослідних тварин, а в близько 20 % – закінчується летально [3].

Досить ефективною є експериментальна модель, сутність якої ґрунтується на лігуванні загальної жовчної протоки [1, 5, 6, 4, 10, 11], однак останній все ж віддається перевага при моделюванні саме біліарного цирозу.

Існує і ряд інших ефективних експериментальних моделей: спосіб з вживленням в організм тварини специфічних паразитів *Shistosoma mansoni*, *Shistosoma japonicum* [1, 22] чи введенням в портальний кровотік тварини спеціальних мікросфер [1, 17] або в шлунок – монокроталіну – алкалоїду піролізидину (рослина *Clotalaria*) [1, 8, 7].

Описані способи характеризуються технічною складністю, “дефіцитністю” складових або ж потребують додаткового інвазивного втручання, що може спотворювати результати дослідження.

Отже, існуючі способи експериментального дослідження цирозу печінки з синдромом порталь-

ної гіпертензії вирізняються недостатньою ефективністю і потребують доопрацювання та оптимізації.

Мета роботи: розробити експериментальну модель синдрому портальної гіпертензії; дослідити критерії ефективності експериментальної моделі.

Матеріали і методи. Змодельовано цироз печінки з синдромом портальної гіпертензії у 18 в'єтнамських свинок, що склало основну групу. Результати порівнювали з контрольною групою інтактних тварин того ж виду.

В основу роботи покладено оптимізацію відомого способу моделювання цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії [1], в якому шляхом комбінування гепатотропних речовин досягали кращої керованості і швидшого формування цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії, що свідчить про підвищення ефективності.

При вирішенні технічного завдання було взято до уваги те, що ацетамінофен (N-(4-гідроксифеніл) ацетамід) є високотоксичним середником. Дія ацетамінофену пов'язана з виснаженням резервів глутатіону і кумуляцією проміжних метаболітів у печінці з гепатотоксичним ефектом, а саме з утворенням токсину N-ацетилімідохінон шляхом гідроксилювання цитохрому P450 та ацетамінофену. Враховано, що ацетамінофен швидко адсорбується з шлунково-кишкового тракту і швидко метаболі-

зується в печінці, демонструючи виражений гепатотоксичний ефект при концентрації препарату не менше 50 мг/кг дослідної тварини.

Звідси, враховуючи потенціуючу дію гепатотропних отрут (чотирихлористого вуглецю та ацетамінофену) емпіричним шляхом розроблено спосіб моделювання цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії (патент України № 87633), що полягає в ентеральному введенні піддослідній тварині 40 % розчину чотирихлористого вуглецю двічі на тиждень з розрахунку 2 мл/кг тварини і додатковому щоденному ентеральному введенні ацетамінофену з розрахунку 50 мг/кг експериментальної тварини.

Про ефективність способу моделювання судили на основі серійних патогістологічних зрізів печінки, дослідження нітроксидпродукуючої здатності ендотелію за вмістом стабільних метаболітів оксиду азоту в плазмі крові методом П. П. Голікова (2004) [2], а також прямої портотонометрії як найбільш об'єктивного критерію синдрому портальної гіпертензії.

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA.

Результати досліджень та їх обговорення. За запропонованим способом проведено моделювання цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії у 18 піддослідних в'єтнамських свинок (табл. 1).

Таблиця 1. Ефективність запропонованої експериментальної моделі цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії

Результат експерименту	Кількість піддослідних тварин
Загальна кількість	18
Змодельований цироз печінки з синдромом портальної гіпертензії	14
Змодельований цироз печінки без синдрому портальної гіпертензії	2
Змоделювати цироз печінки не вдалось	1
Загибель тварини	1

У більшості тварин запропонованим способом вдалось змоделювати цироз печінки. При виконанні трепан-біопсії як контролю ефективності моделі цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії у 92,35 % гістологічного матеріалу встановлювали центролобулярний некроз печінки (рис. 1).

Виявлені множинні вогнища формування центролобулярного некрозу печінки. Власне гепатоцити по периферії детриту вогнищ некрозу дистрофічно змінені – за типом білкової зернистої дистрофії: набухання внутрішньоклітинних структур, цитоплазма мутна, цитоплазматичний білок зернистий (рис. 1).

Уже з 3-го тижня експерименту в біоптатах печінки відмічалась проліферативна трансформація печінки, особливо в зонах, де попередньо був центролобулярний некроз печінки. Виявлено зміну архітекто-

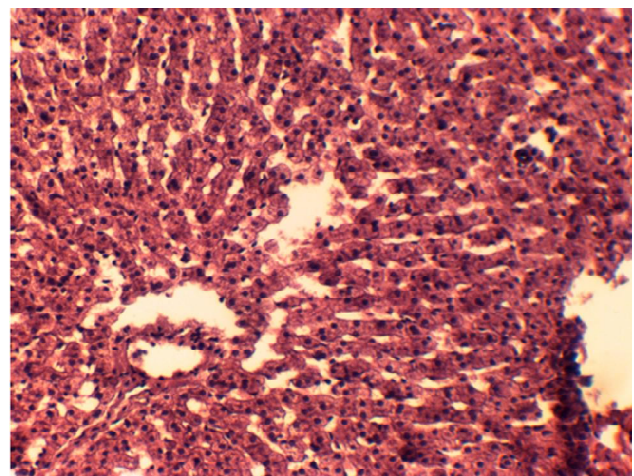


Рис. 1. Біоптат печінки експериментальної тварини. Центролобулярний некроз печінки. ×100.

ніки печінки, що можна розцінювати як ініціюючу ланку цирозу печінки. Синусоїди щілиноподібні, візуально діаметр синусоїдів порівняно з попередньою гістологічною картиною значно зменшений (рис. 2).

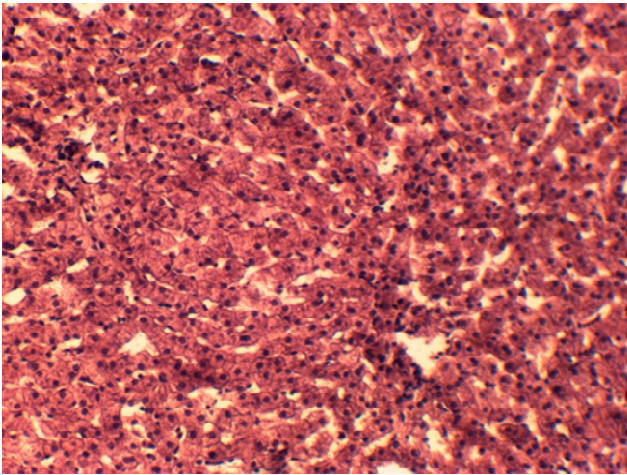


Рис. 2. Біоптат печінки експериментальної тварини. Проліферативна трансформація печінки. $\times 100$.

Про ефективність способу моделювання синдрому портальної гіпертензії у дослідних тварин судили за безпосереднім вимірюванням тиску в системі портальної вени та опосередковано – за нітроксидпродукуючою функцією як головним предиктором у формуванні гіпердинамічного циркуляторного статусу синдрому портальної гіпертензії.

Дослідження ефективності розпочинали з найменш інвазивного – з дослідження нітроксидпродукуючої функції шляхом визначення в плазмі крові основних метаболітів оксиду азоту – концентрації нітратів і нітритів відносно контрольної групи інтактних тварин. Дослідження проведено на 14 тваринах, у яких моделювали цироз печінки з синдромом портальної гіпертензії в хронологічному порядку, починаючи з 2 тижня експерименту (рис. 3).

При визначенні рівня нітрит-, нітрат-аніонів у плазмі крові як основних метаболітів молекули оксиду азоту встановлено, що зростання нітроксидпродукуючого ендотелію відбувається з 21–25-ї доби експерименту. Саме зростання метаболітів

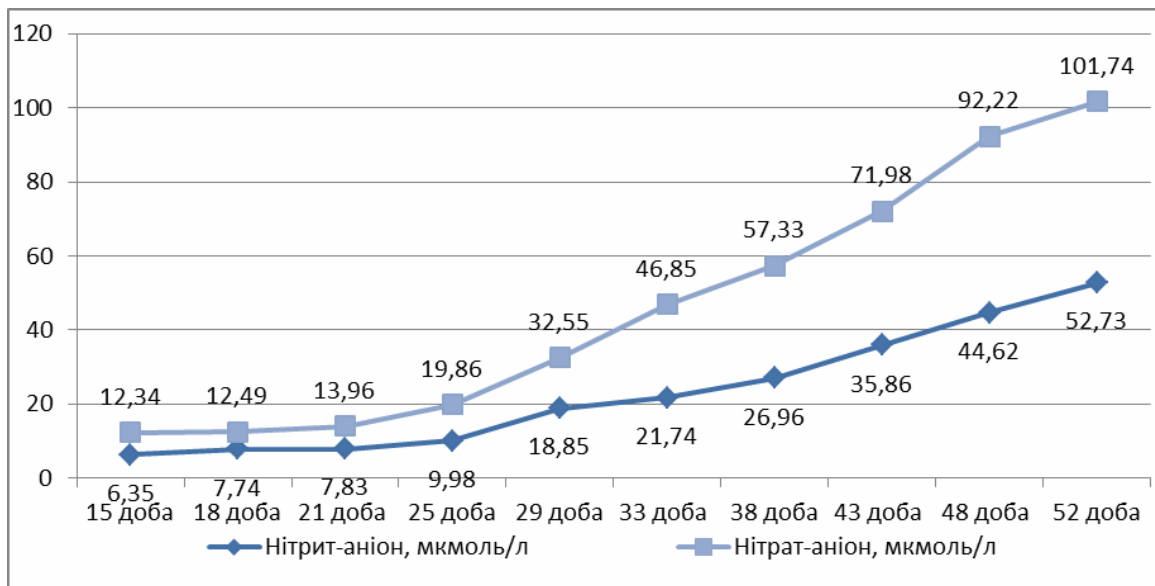


Рис. 3. Діаграма. Динаміка формування гіпердинамічного циркуляторного статусу в експериментальних тварин у умовах моделювання цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії.

нітроксиду у плазмі крові свідчить про модельований у дослідних тварин гідродинамічний циркуляторний статус.

Додатково виконали портотометрію, що є найбільш точно щодо верифікації проведеного моделювання синдрому портальної гіпертензії. Портотометрію здійснювали шляхом канюлювання однієї з брижових вен під загальним знеболюванням дослідної тварини. Канюльовану вену катетеризували, а катетер виводили на шкіру передньої черевної стінки, що дозволяло динамічно вимірю-

вати зміну портального тиску в хронологічному порядку (рис. 4).

Порівняно з контролем ($92,9 \pm 11,6$ мм вод. ст.) гіпертензію в системі портальної вени реєстрували, починаючи з 25-ї доби експерименту. При цьому тиск у системі портальної вени при подальшій реєстрації тільки зростав.

Так, на 45-ту добу експерименту визначали середнє значення портального тиску, що становило ($181,7 \pm 21,6$) мм вод. ст. У контрольній групі дослідних тварин середнє значення становило ($92,3 \pm 18,9$) мм вод. ст.

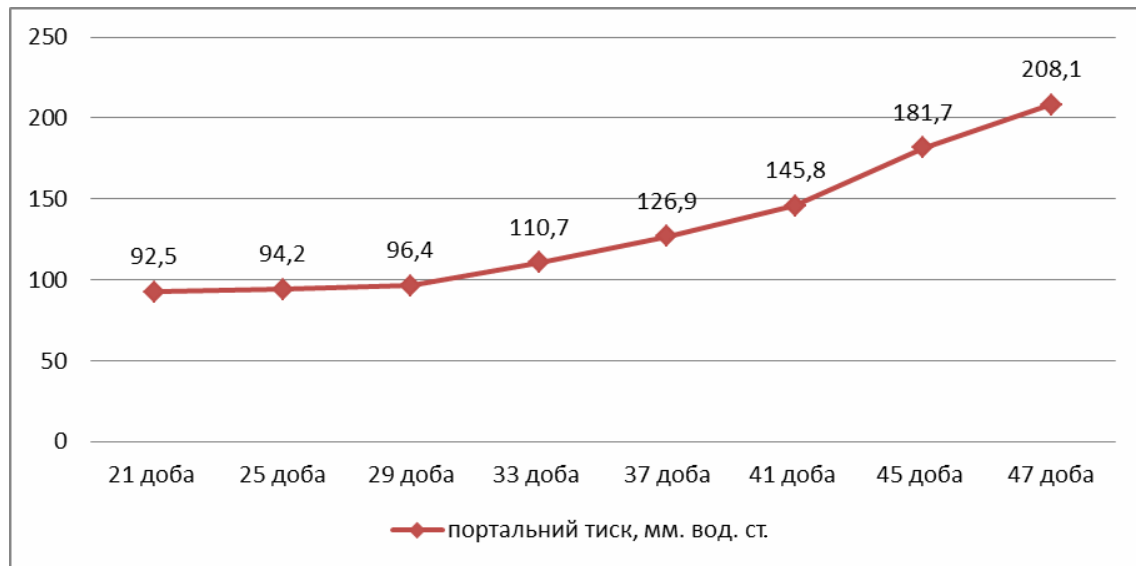


Рис. 4. Діаграма. Хронологія росту тиску в системі портальної вени у групах дослідних тварин.

Таким чином, значне зростання показників портального тиску на 45-ту добу експерименту дозволяло підтвердити синдром портальної гіпертензії у дослідних тварин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гарбузенко Д. В. Экспериментальные методы изучения портальной гипертензии / Д. В. Гарбузенко // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – № 2. – С. 4–12.
2. Голиков П. П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний / П. П. Голиков. – М.: Медпрактика, 2004. – 180 с.
3. Дрель В. Ф. Спосіб моделювання цирозу печінки / В. Ф. Дрель // Вісник ЛНУ імені Тараса Шевченка. – 2012. – Т. 243, № 8. – С. 45.
4. Aller M. A. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat / M. A. Aller, M. Duran, I. Ortega // Microsurgery. – 2004. – Vol. 24. – P. 442–447.
5. Effects of blood volume restitution following a portal hypertensive-related bleeding in anesthetized cirrhotic rats / R. Castaneda, J. Morales, R. Lionetti [et al.] // Hepatology. – 2001. – Vol. 33, № 4. – P. 821–825.
6. Cho J. J. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis / J. J. Cho, B. Hofer, H. Herbst // Gastroenterology. – 2000. – Vol. 118, № 6. – P. 1169–1178.
7. De Leve L. D. Embolization by sinusoidal lining cells obstructs the microcirculation in rat sinusoidal obstruction syndrome / L. D. De Leve, Y. Ito, N. W. Bethea // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2003. – Vol. 284, № 6. – P. 1045–1052.
8. De Leve L. D. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease) / L. D. De Leve, H. M. Shulman, G. B. McDonald // Semin. Liver Dis. – 2002. – Vol. 22, № 1. – P. 27–41.
9. Diguez B. Chronic portal hypertension in the rat by triple-portal stenosing ligation / B. Diguez, M. A. Aller, M. P. Nava // J. Invest. Surg. – 2002. – Vol. 15, № 6. – P. 329–336.
10. Ito Y. Hepatic microcirculatory dysfunction during cholestatic

Висновок. Запропоновано спосіб моделювання цирозу печінки з синдромом портальної гіпертензії. На основі морфологічного, біохімічного та портотометричного способів доведено ефективність корисної моделі в експериментальних умовах.

- liver injury in rats / Y. Ito, N. W. Bethea, G. L. Baker // Microcirculation. – 2003. – Vol. 10, № 5. – P. 421–432.
11. Acute haemodynamic effects of losartan in anaesthetized cirrhotic rats / J. Heller, T. Shiozawa, J. Trebicka // Eur. J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 33, № 11. – P. 1006–1012.
12. Changes in the gene expression associated with carbon tetrachloride induced liver fibrosis persist after cessation of dosing in mice / Y. Jiang, J. Liu, M. Waalkes, Y. J. Kang // Toxicol. Sci. – 2004. – Vol. 79, № 2. – P. 404–410.
13. Jeong H. G. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury / H. G. Jeong // Toxicol. Lett. – 1999. – Vol. 105, № 3. – P. 215–222.
14. Jensen L. S. Chronic portal venous hypertension. The effect on liver blood flow and liver function and the development of esophageal varices / L. S. Jensen, N. Krarup, A. Larsen // Scand. J. Gastroenterol. – 1987. – Vol. 22, № 4. – P. 463–470.
15. Evaluation of different models of experimentally induced liver cirrhosis for MRI research with correlation to histopathologic findings / B. Kreft, F. Dombrowski, W. Block [et al.] // Invest. Radiol. – 1999. – Vol. 34, № 5. – P. 360–366.
16. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited / W. Laleman, I. van der Elst, M. Zeegers [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. – 2006. – Vol. 36, № 4. – P. 242–249.
17. Li X. N. A new rat model of portal hypertension induced by intraportal injection of microspheres / X. N. Li, I. S. Benjamin, B. Alexander // World J. Gastroenterol. – 1998. – Vol. 4, № 1. – P. 66–69.
18. Li X. N. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality / X. N. Li, I. S. Benjamin, B. Alexander // J. Hepatol. – 2002. – Vol. 36, № 4. – P. 488–493.

19. Natsume M. Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice / M. Natsume, H. Tsuji, A. Harada // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66, № 4. – P. 601–608.
20. Esophageal varices in rat models of liver cirrhosis / R. Nishida, R. Inoue, Y. Takimoto, T. Kita // *Dig. Dis. Sci.* – 1998. – Vol. 43, № 6. – P. 1296–1301.
21. Orfila C. Expression of TNF-alpha and immunohistochemical distribution of hepatic macrophage surface markers in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats / C. Orfila, J. C. Lepert, L. Alric // *Histochem. J.* – 1999. – Vol. 31, № 10. – P. 677–685.
22. Hyperdynamic circulation in chronic murine schistosomiasis model of portal hypertension / S. K. Sarin, P. Mosca, C. Sabba, R. J. Groszmann // *Hepatology.* – 1991. – Vol. 13, № 3. – P. 581–584.
23. Sikuler E. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model / E. Sikuler, D. Kravetz, R. J. Groszmann // *Am. J. Physiol.* – 1985. – Vol. 248, № 6, Pt. 1. – P. 618–625.
24. Vorobioff J. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats / J. Vorobioff, J. E. Bredfeldt, R. J. Groszmann // *Gastroenterology.* – 1984. – Vol. 87, № 4. – P. 1120–1126.
25. Vorobioff J. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: A primary factor for maintenance of chronic portal hypertension / J. Vorobioff, J. E. Bredfeldt, R. J. Groszmann // *Am. J. Physiol.* – 1983. – Vol. 244, № 1. – P. 52–57.

Отримано 25.02.14