

О выборе модели лекарственного поражения печени для изучения новых гепатопротекторов в эксперименте

Г. Н. МОЖОКИНА¹, Н. А. ЕЛИСТРАТОВА¹, Л. П. МИХАЙЛОВА², О. В. МАКАРОВА²

¹ НИИ фтизиопульмонологии Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

² НИИ морфологии человека РАН, Москва

Experimental Simulation of the Liver Drug Injury for Investigation of New Hepatoprotectors

G. N. MOZHOKINA¹, N. A. ELISTRATOVA¹, L. P. MIKHAYLOVA², O. V. MAKAROVA²

¹ Research Institute of Phthiziopulmonology, I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, Moscow

² Research Institute of Human Morphology, The Russian Academy of Sciences, Moscow

Проведение эффективной химиотерапии больных туберкулёзом может осложниться развитием гепатотоксических реакций на противотуберкулёзные препараты. Частота и характер этих реакций зависит от используемых препаратов, генотипических и фенотипических особенностей их метаболизма в организме пациента, что необходимо учитывать при выборе гепатопротекторов. В эксперименте на крысах с разным фенотипом ацетилирования вызывали поражение печени противотуберкулёзными препаратами резервного ряда. Анализ клинико-биохимических и морфологических параметров показал различия в формировании модели повреждения печени: преобладание цитолитического механизма у медленных ацетилиаторов по сравнению с быстрыми ацетилиаторами.

Ключевые слова: гепатопротекторы, модели поражения печени, противотуберкулёзные препараты, фенотипы ацетилирования.

Efficient chemotherapy of tuberculosis patients could be complicated by hepatoprotective responses to antituberculosis drugs. The frequency and nature of the response depend on the drug and the genotypical and phenotypical characteristics of its metabolism in the patients, that should be considered while choosing the hepatoprotector. The liver injury was induced by the reserve antituberculosis drugs in experiments on rats with various acetylation phenotypes. Analysis of the clinicobiochemical and morphological indices revealed differences in the liver injury simulation: prevalence of the cytolytic mechanism in slow acetylators vs. the rapid ones.

Key words: hepatoprotectors, liver injury simulation, antituberculosis drugs, acetylation phenotypes.

Введение

Для изучения гепатопротекторного действия новых препаратов часто используется модель экспериментального гепатита, вызванного классическим гепатотропным ядом — четыреххлористым углеродом (CCl_4), которая считается эталоном поражения печени с проявлениями дисфункции органа [1]. Однако в клинической практике лекарственные поражения печени у пациентов возникают под действием различных препаратов и их комбинаций и имеют свои особенности (клинические, морфологические), обусловленные генетическими и фенотипическими факторами, влияющими на метаболизм лекарств.

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции:

E-mail: mojokina@mail.ru

В качестве примера рассмотрим варианты использования экспериментальных моделей поражения печени, вызванных противотуберкулёзными препаратами (ПТП). Для лечения больных туберкулёзом используют ряд лекарственных режимов, основанных на наличии чувствительности или резистентности возбудителя — *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) к ПТП и включающих от 3—4 до 5—7 препаратов. Однако нежелательные побочные реакции ограничивают проведение полноценной химиотерапии и являются одной из важнейших причин её недостаточной эффективности. Наиболее часто развиваются лекарственно-индуцированные поражения печени, частота их варьирует от 5,4 до 85,7% [2, 3]. В связи с этим фтизиатрам приходится не только менять режим лечения, но и отказываться от применения наиболее эффективных в отношении МБТ препаратов.

Риск развития гепатотоксических реакций связан как с генетическими, так и с приобретёнными факторами, такими как возраст, пол, рацион питания, злоупотребление алкоголем, наркотиками, беременность, сопутствующая патология печени. В связи с этим проблема профилактики и лечения лекарственных поражений печени является чрезвычайно важным компонентом терапии туберкулёза, а поиск наиболее эффективных гепатопротекторов остается весьма актуальным.

В доклинических исследованиях для оценки гепатопротективных свойств различных лекарственных средств используются разнообразные модели поражения печени, которые индуцировали введением одного или нескольких ПТП у разных видов животных. Так, на моделях поражения печени у кроликов, вызванных изониазидом и изониазидом в сочетании с рифампицином, оценивали гепатопротективные свойства азазида, бемитила, пирацетами и метионина [4]. Ряд авторов использовали модель, предложенную Ю. И. Сливкой [5], которую воспроизвели путём подкожного введения изониазида и энтерального назначения рифампицина и пиразинамида. При этом выбор животных, их видовые, возрастные и половые различия при моделировании специально не оговаривались. Так, эффективность галстены и Лив52 изучали на молодых крысах самках массой 220–250 г [6]; ремаксола, реамберина и S-аденозил-L-метионина (SAM) — на молодых крысах самцах [7].

Тем не менее известно, что пол и возраст крыс влияют на скорость ацетилирования изониазида, который метаболизирует, в основном, с участием цитозольного фермента N-ацетилтрансферазы 2-го типа (NAT2). Причём метаболизм изониазида у крыс происходит по тем же закономерностям, что и у человека [8]. Ген, который кодирует активность фермента NAT2, отличается выраженным полиморфизмом, что фенотипически проявляется наличием в популяции «быстрых» и «медленных» ацетилияторов. Половозрелые самки в возрасте от 1 года и старше являются быстрыми ацетилияторами; половозрелые самцы в возрасте 7–8 мес относятся к медленным ацетилияторам. Неполовозрелые животные обоего пола имеют промежуточные по отношению к взрослым самцам и самкам фенотипы. Установлены межличинные различия в характере ацетилирования на примере тестового препарата сульфадимезина: крысы линии August по фенотипу «медленнее» крыс других линий соответствующего пола [9].

В. П. Николаев [10] показал, что у беспородных старых самок крыс, которые являются быстрыми ацетилияторами изониазида, поражения печени обусловлены преимущественно действием метаболита изониазида — моноацетилгидразина и имеют морфологическую картину жирового ге-

патоза. У самцов крыс, которые являются медленными ацетилияторами, изониазид вызывает изменения в печени смешанного характера: белково-жировую дистрофию в сочетании с реакцией стромы и некрозом гепатоцитов. Такой подход к выбору модели поражения печени, с учётом особенностей метаболизма ПТП, был использован при изучении нового гепатопротектора полифитохола [11].

Для модели поражения печени ПТП резервного ряда, описанной Д. С. Сухановым и др. [12], использовали внутрижелудочное введение комплекса препаратов: протионамид+ циклосерин+ПАСК. Следует отметить, что ПАСК, как и изониазид и его производные, метаболизирует при участии фермента N-ацетилтрансферазы. Однако эффективность руничола и SAM оценивали на данной модели, воспроизведённой у самцов мышей, а ремаксола и SAM — на модели у самцов крыс [13]. Таким образом, не учитывались видовые, генетические и фенотипические особенности метаболизма ПТП.

Цель настоящего исследования — определить особенности поражения печени, вызванного комплексом ПТП, у крыс с быстрым и медленным фенотипом ацетилирования по клинико-лабораторным и морфологическим показаниям.

Материал и методы

Модель поражения печени у крыс воспроизводили по методу, описанному в [12] с использованием комплекса ПТП 2-го ряда, включавшего протионамид (140 мг/кг), циклосерин (140 мг/кг) и ПАСК (1400 мг/кг). Применяли препараты: протионамид (ОАО ХФК «Акрихин», Россия), циклосерин («Коксерин», Маклеодз фармасьютикалз ЛТД, Индия) и ПАСК (ЗАО «Фарма», Россия). Препараты вводили внутрижелудочно, ежедневно в течение 12 дней.

Для воспроизведения модели поражения печени у крыс с фенотипом быстрого ацетилирования использовали 10 старых самок в возрасте старше 12 месяцев и массой от 330 до 350 г. Для создания модели поражения печени у крыс — медленных ацетилияторов использовали 10 половозрелых самцов в возрасте 7–8 месяцев и массой от 250 до 270 г. Все крысы содержались на низкобелковой диете (хлеб, вода), что способствует более быстрому развитию дистрофического процесса [11].

Для каждой опытной группы животных при биохимических исследованиях крови имелось по контрольной группе, состоящей из 8 самцов или самок того же возраста, находящихся на той же диете.

Методы исследования

- *Патофизиологический* метод включал оценку физиологического состояния животных — внешний вид, поведение, поедание корма, изменение массы тела.
- *Биохимический* метод включал определение в сыворотке крови активности трансаминаз — АлАТ, АсАТ (Ед/л), содержания общего и прямого билирубина (мкмоль/л), щелочной фосфатазы (ЩФ, Ед/л). Кровь для исследований забирали из подъязычной вены крыс всех групп после окончания эксперимента на 15-й день. Определение биохимических показателей проводили на биохимическом анализаторе Sapfir-400 с использованием реагентов фирмы Diasys.

- *Патоморфологический* метод включал макроскопическую оценку печени (внешний вид, масса, весовой индекс) и гистологические исследования образцов печени (морфоме-

Таблица 1. Биохимические показатели крови самцов крыс контрольной и опытной групп

Показатели, единицы измерения	Контрольная группа (n=8)	Опытная группа (n=10)
Билирубин общий, мкмоль/л	4,79±0,37	9,50±0,53**
Билирубин прямой, мкмоль/л	2,59±0,13	4,00±0,29**
АсАТ, Ед/л	92,30±3,04	208,23±16,99**
АлАТ, Ед/л	7,73±0,7	15,70±2,40*
Щелочная фосфатаза, Ед/л	499,19±35,04	549,65±17,3

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – достоверно по сравнению с контролем ($p<0,05$); ** – достоверно по сравнению с контролем ($p<0,01$).

Таблица 2. Биохимические показатели крови самок крыс контрольной и опытной групп

Показатели, единицы измерения	Контрольная группа (n=8)	Опытная группа (n=10)
Билирубин общий, мкмоль/л	3,53±0,27	8,80±0,54**
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,94±0,05	3,31±0,07**
АсАТ, Ед/л	95,74±10,3	269,26±12,21**
АлАТ, Ед/л	19,34±1,31	19,81±2,03
Щелочная фосфатаза, Ед/л	306,11±24,35	374,10±4,03

трия). При вскрытии отмечали плотность, цвет, эластичность печени, состояние переднего края. Печень взвешивали, определяли весовой индекс, который рассчитывали по отношению массы печени к массе тела животного. Морфометрическое исследование печени проводили в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином — суданом III на нейтральные липиды. Распространённость дистрофических изменений гепатоцитов оценивали методом точечного счёта с помощью сетки Г. Г. Автандилова [14] под световым микроскопом Leica-DM2500 (Германия) при увеличении 100: оценивали объёмную долю гепатоцитов в состоянии дистрофии. Выраженность дистрофических изменений гепатоцитов оценивали в баллах: 4 балла — крупные и мелкие вакуоли, занимающие более 70% цитоплазмы; 3 балла — вакуоли, занимающие от 70 до 50% цитоплазмы; 2 балла — от 50 до 25%; 1 балл — от 25 и менее %.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов вариационной статистики. Достоверность различий между средними величинами определяли по *t*-критерию Стьюдента, *F*-критерию Фишера [15].

Результаты исследований

К концу эксперимента отмечалось некоторое угнетение активности крыс, самцов и самок в опытных группах. Животные были вялыми, неопрятными, шерсть приобретала грязный оттенок. Различий в массе тела между контрольными и опытными группами крыс, как у самцов, так и у самок, не выявлено.

При проведении биохимических исследований крови самцов опытной группы выявлено статистически значимое повышение содержания билирубина (общего и прямого) и активности трансаминаз по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Активность щелочной фосфатазы увеличилась незначительно.

При макроскопическом исследовании у 2 из 10 самцов отмечен выраженный желтоватый оттенок печени. Средний весовой индекс печени составил 4,22±0,35.

При гистологическом исследовании отмечалось сохранение балочного и долькового строения печени. Большая часть гепатоцитов в центре

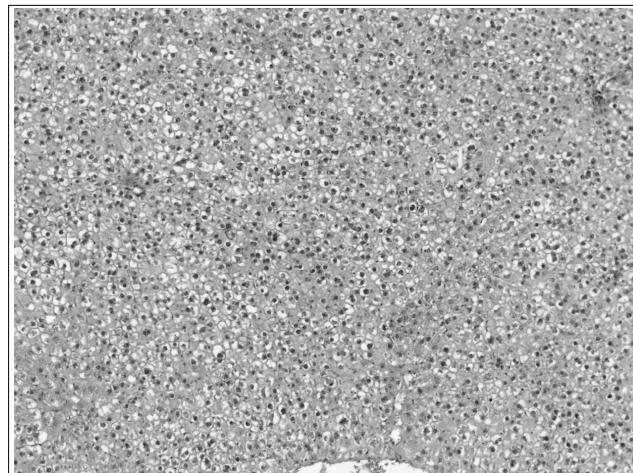


Рис. 1. Морфологические изменения печени самцов крыс опытной группы.

Окраска гематоксилином-эозином; ув. ×200. Большая часть гепатоцитов в центре и по периферии — дольки с явлениями выраженной белковой дистрофии.

и по периферии долек была с явлениями выраженной белковой и жировой дистрофии: в цитоплазме определялись вакуоли различных размеров — от мелких до крупных. При окраске суданом III на нейтральные липиды реакция положительная: в цитоплазме гепатоцитов выявлялись включения желто-оранжевого цвета. Встречались единичные двуядерные гепатоциты. При морфометрическом исследовании объёмная доля гепатоцитов с явлениями дистрофии составила 84,5±1,9%; выраженность дистрофии составила 3,4±0,8 балла (рис. 1).

При проведении биохимических исследований крови самок опытной группы выявлены статистически значимые повышения содержания билирубина (общего и прямого) и активности АсАТ по сравнению с контрольной группой

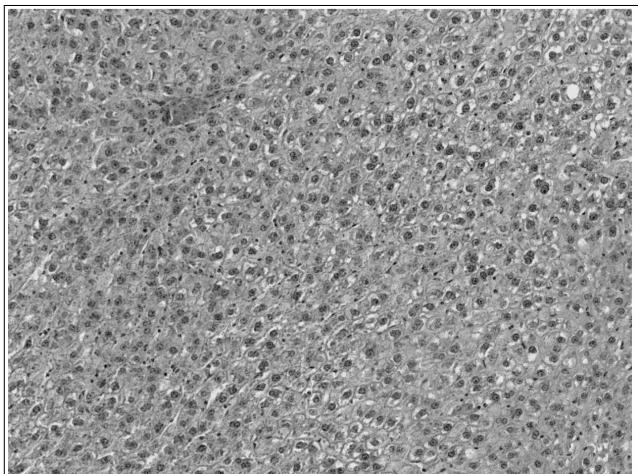


Рис. 2. Морфологические изменения печени самок крыс.

Окраска гематоксилином-эозином; ув. $\times 200$. Большая часть гепатоцитов в центре и по периферии долек с явлениями выраженной белковой дистрофии.

(табл. 2). Активность АлАТ практически не изменилась, а щелочной фосфатазы увеличилась незначительно.

На вскрытии видимых изменений печени (цвет, консистенция, состояние края) не обнаружено. Весовой индекс печени составил $4,13 \pm 0,06$.

При гистологическом исследовании печени самок отмечалось сохранение архитектоники органа. Большая часть гепатоцитов в центре и по периферии долек была с явлениями выраженной белковой и жировой дистрофии в виде разнокалиберных вакуолей и липидных включений желто-оранжевого цвета. Встречались единичные двуядерные гепатоциты (рис. 2). При морфометрическом исследовании объёмная доля гепатоцитов с явлениями дистрофии составила $77,4 \pm 1,7\%$, выраженность дистрофии составила $3,1 \pm 0,07$ балла.

Несмотря на единообразный характер типовых дистрофических изменений в структуре печени самцов и самок, объёмная доля гепатоцитов с явлениями дистрофии у самцов была статистически большей, чем у самок ($84,5 \pm 1,9\%$ и $77,4 \pm 1,7\%$ соответственно, $p < 0,01$). Для того чтобы сравнить биохимические показатели между самцами и самками, определяли коэффициент (K) отклонения каждого показателя у животных опытной группы от такового в контрольной, рассчитывая по формуле и выражая в процентах:

$$K = \frac{(\text{опыт} - \text{контроль}) \times 100 (\%)}{\text{контроль}}$$

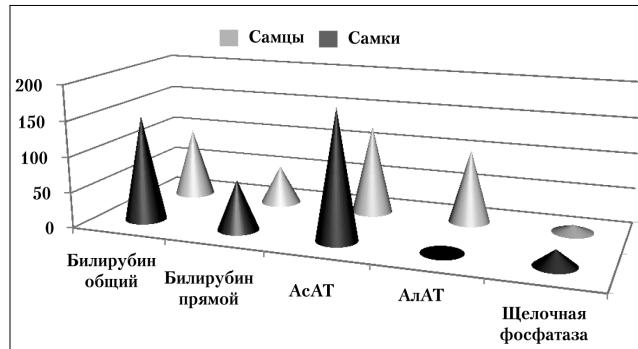


Рис. 3. Коэффициенты отклонения биохимических показателей между опытными и контрольными животными в группах самцов и самок.

Результаты представлены на рис. 3.

Как следует из рис. 3, у самцов ведущим биохимическим критерием поражения печени является значительное повышение активности АлАТ. По другим показателям резкого расхождения коэффициентов отклонения между самцами и самками не выявлено.

Таким образом, у самцов в большей степени, чем у самок, выражен цитолитический механизм поражения печени.

Заключение

На основании данных, полученных при анализе клинико-биохимических и морфологических показателей повреждения печени, вызванных ПТП резервного ряда, у крыс с разным фенотипом ацетилирования выявлено преобладание цитолитического механизма их действия у самцов (медленных ацетилятров) по сравнению с самками (быстрые ацетиляторы). Соответственно, для оценки гепатотокситетивных свойств новых и существующих препаратов, которые затем могут быть использованы для коррекции и профилактики гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом, необходимо проводить доклинические исследования с учётом особенностей метаболизма ПТП.

Большинство ПТП метаболизирует с участием фермента N-ацетилтрансферазы. Установлено, что степень риска лекарственных поражений печени у больных туберкулёзом зависит от генотипа NAT2 и фенотипа N-ацетилирования. В связи с этим при воспроизведении существующих моделей поражения печени ПТП необходимо предусматривать несколько групп животных, которые будут генотипически и фенотипически различаться между собой. Такой подход позволит провести индивидуализированную коррекцию гепатотоксических реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств. Ведом фармакол комитета. 1999; 1: 9–12. / Vengerovskij A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. Doklinicheskoe izuchenie hepatozashhitnyh sredstv. Vedom farmakol komiteta. 1999; 1: 9–12. [in Russian]
2. Возненко А.А. Лекарственно-индуцированные поражения печени у больных туберкулезом органов дыхания и пути их преодоления. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М.: 2012; 24. / Voznenko A.A. Lekarstvenno-inducirovannye porazheniya pecheni u bol'nyh tuberkulezom organov dyhanija i puti ih preodolenija. Avtoref. diss. kand. med. nauk. M.: 2012; 24. [in Russian]
3. Меркулов С.А. Лекарственно-индуцированные поражения печени у больных туберкулезом лёгких: оптимизация лечения и профилактика. Дисс. канд. мед. наук 14.03.06. Волгоград, 2014; 195. / Merkulov S.A. Lekarstvenno-inducirovannye porazheniya pecheni u bol'nyh tuberkulezom legkih: optimizacija lechenija i profilaktiki Diss. kand. med. nauk 14.03.06. Volgograd, 2014; 195. [in Russian]
4. Литвинов А.В. Лекарственная коррекция гепатотоксичности изониазида и сочетания его с рифампицином. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ленинград, 1984; 23. / Litvinov A.V. Lekarstvennaja korrekcija hepatotoksichnosti izoniazida i sochetanija ego s rifampicinom. Avtoref. diss. kand. med. nauk. Leningrad, 1984; 23. [in Russian]
5. Сливка Ю.И. Сравнительная характеристика гепатотоксичности изониазида, рифампицина и пиразинамида. Фармакол токсикол 1989; 4: 82–85. / Slivka Ju.I. Sravnitel'naja harakteristika hepatotoksichnosti izoniazida, rifampicina i pirazinamida. Farmakol toksikol 1989; 4: 82–85. [in Russian]
6. Катикова О.Ю., Костин Я.В. Эффективность галстены при повреждении печени противотуберкулёзными препаратами. Экспер клин фармакол 2002; 32: 64–66. / Katikova O.Ju., Kostin Ja.V. Jeffektivnost' galsteny pri povrezhdenii pecheni protivotuberkuleznymi preparatami. Jekspert klin farmakol 2002; 32: 64–66. [in Russian]
7. Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Коваленко А.Л и dr. Сравнительное изучение гепатопротективного действия ремаксола, реамберина и адеметионина при повреждении печени противотуберкулёзными препаратами (экспериментальное исследование). Антибиотики и химиотер 2011; 56: 1–2; 12–16. / Suhanov D.S., Vinogradova T.I., Zabolotny N.V., Kovalenko A.L i dr. Sravnitel'noe izuchenie hepatoprotaktivnogo dejstvija remaksola, reamberina i ademetionina pri povrezhdenii pecheni protivotuberkuleznymi preparatami (eksperimental'noe issledovanie). Antibiotiki i himioter 2011; 56: 1–2; 12–16. [in Russian]
8. Гребенник Л.И. Сравнительное изучение обмена гидразида изоникотиновой кислоты и гидразина в организме некоторых животных. Вопр мед хим 1967; 4: 359–363. / Grebennik L.I. Sravnitel'noe izuchenie obmena gidrazida izonikotinovoj kisloty i hidrazina v organizme nekotoryh zhivotnyh. Vopr med him 1967; 4: 359–363. [in Russian]
9. Ванюков М.М. Исследование изменчивости ацетилаторных фенотипов крыс. Автореф. дисс. канд.биол. наук. М.: 1984; 21. / Vanjukov M.M. Issledovanie izmenchivosti acetiljatornyh fenotipov krys. Avtoref. diss. kand.biol. nauk. M.: 1984; 21. [in Russian]
10. Николаев В.П. Поражение печени, обусловленное изониазидом, и его профилактика (клинико-экспериментальное исследование). Автореф. дисс. канд. мед. наук. М.: 1987; 19. / Nikolaev V.P. Porazhenie pecheni, obuslovlennoe izoniazidom, i ego profilaktika (kliniko-eksperimental'noe issledovanie). Avtoref. diss. kand. med. nauk. M.: 1987; 19. [in Russian]
11. Аюшева Л.Б. Полифитохол — новый гепатопротектор в клинике туберкулёза. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М.: 1998; 21. / Ajusheeva L.B. Polifitohol — novyj hepatoprotektor v klinike tuberkuleza. Avtoref. diss. kand. med. nauk. M.: 1998; 21. [in Russian]
12. Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В. и dr. Сравнительное влияние рунихола и экзогенного S-аденозил-L-метионина (SAM) на морфологическую картину печени при гепатотоксическом воздействии противотуберкулёзных препаратов резервного ряда. Архив патол 2012; 74: 5: 51–56. / Suhanov D.S., Vinogradova T.I., Zabolotny N.V. i dr. Sravnitel'noe vlijanie runihola i jekzogennoj S-adeno-L-metionina (SAM) na morfologicheskiju kartinu pecheni pri hepatotoksicheskom vozdejstvii protivotuberkuleznymi preparatami rezervnogo rjada. Arhiv patol 2012; 74: 5: 51–56. [in Russian]
13. Суханов Д.С., Артюшкова Е.Б., Дудка В.Т., Оковитый С.В. Эффективность ремаксола и S-аденозил-L-метионина при сочетанном экспериментальном поражении печени противотуберкулёзными препаратами резервного ряда и алкоголем. Тубер бол лёгких 2014; 4: 59–62. / Suhanov D.S., Artushkova E.B., Dudka V.T., Okovityj S.V. Jeffektivnost' remaksola i S-adeno-L-metionina pri sochetannom jekspertial'nom porazhenii pecheni protivotuberkuleznymi preparatami rezervnogo rjada i alkogolem. Tuber bol legikh 2014; 4: 59–62. [in Russian]
14. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина, 1980; 216. / Avtandilov G.G. Vvedenie v kolichestvennuju patologicheskiju morfologiju. M.: Medicina, 1980; 216. [in Russian]
15. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1989; 343. / Lakin G.F. Biometrija. M.: Vysshaja shkola. 1989; 343. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Можокина Галина Николаевна — д.м.н., зав. отделом лабораторно-диагностических методов исследования во фтизиатрии НИИ фтизиопульмонологии, Москва

Елистратова Наталья Александровна — старший научный сотрудник НИИ фтизиопульмонологии, Москва

Михайлова Лилия Петровна — зав. лаб. пульмонологии ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Макарова Ольга Васильевна — зав. лаб иммуноморфологии воспаления ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва