

Моделирование патологии печени рыб при помощи парацетамола

Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

Контактная информация: к.б.н. Артем Олегович Ревякин, scbmt@yandex.ru

Введение молоди карпа парацетамола *per os* в дозе 500 мг/особь в смеси с водой и с 50% спиртом вызывает патологию печени. У опытных рыб увеличиваются индексы желчного пузыря и почек, снижается индекс печени, нарушается морфологическая структура клеток периферической крови, происходят изменения в лейкоцитарной формуле.

Ключевые слова: моделирование патологии, парацетамол, рыбы, индексы внутренних органов лейкограмма, фагоцитарная активность нейтрофилов.

Введение

При исследованиях в области медицины нередко возникает необходимость вызывать патологию для нахождения оптимальных способов лечения различных болезней, углубленного изучения функций органов и систем. Одним из основных путей решения данной проблемы является использование комплексного моделирования на классических и альтернативных биологических объектах и экстраполяция на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных [2, 5, 6, 7].

В качестве альтернативных биомodelей целесообразно использовать пойкилотермных гидробионтов по ряду причин:

- по этическим соображениям, так как эти организмы находятся на более низкой ступени эволюционного древа;
- они являются более доступными объектами исследования;

- у них легче вызвать патологию, так как данные организмы являются обитателями водной среды и полностью зависят от температуры окружающей среды;
- холоднокровные гидробионты имеют специфические особенности, изучение которых позволит выявить фундаментальные физиологические механизмы, в т.ч. в эволюционном аспекте.

За последние десятилетия использование рыб как животных для исследований значительно увеличилось [16, 17, 21]. Относительно восприятия болевых импульсов у рыб ведутся дебаты, однако большинство авторов склонны считать, что у рыб понижен болевой порог чувствительности [14, 18, 22].

Рыбы представляют самый старый и самый разнообразный класс позвоночных животных, включая приблизительно 48%

известных существующих разновидностей подтипа *Vertebrata* (Позвоночные). Их эволюционное положение относительно тех или других позвоночных животных, вместе с их высокими адаптивными мощностями, делает их ценными объектами для исследования в различных отраслях биологии. Как следствие, рыбы используются в качестве экспериментальных моделей в исследованиях биомедицины, рака, экологии, экологической токсикологии, эндокринологии, геронтологии, генетики, молекулярного развития, нейробиологии, фармакологии и др. [11, 19].

Материалы и методы

В данной работе проведено моделирование патологии печени у рыб с помощью парацетамола. Препарат выбран из-за его доступности, относительно низкой стоимости и быстрого токсического эффекта, усиливающегося при добавлении спирта.

Парацетамол (международное название: paracetamol; ацетаминофен; парацетаминофен; N-(4-гидроксифенил)-ацетамид; 4-гидроксиацетанилид) применяется как жаропонижающее и анальгезирующее средство. Однако препарат обладает гепатотоксическим и нефротоксическим действием. Он блокирует обе формы фермента циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), ингибируя синтез простагландинов (P_g). В периферических тканях клеточные пероксидазы нейтра-

лизуют влияние парацетамола на ЦОГ. Метаболизация парацетамола в печени происходит, в основном, путём конъюгации с глюкуроновой и серной кислотой с образованием нетоксичных метаболитов глюкорангида и сульфата парацетамола. В меньшем количестве под влиянием цитохрома P450 образуются ещё два метаболита, которые обладают токсическим действием: парааминофенол и N-ацетилбензохинон. Под влиянием парааминофенола образуется метгемоглобин; в результате происходит кислородное голодание тканей. N-ацетилбензохинон обладает повреждающим действием по отношению к клеткам печени, вызывая их некроз. При применении парацетамола в терапевтических дозах N-ацетилбензохинон обезвреживается глутатионом и после конъюгации с цистеином и меркаптуровой кислотой выделяется почками. При приёме в высоких дозах (выше 150 мг/кг) возникает дефицит глутатиона и повышается уровень N-ацетилбензохинона, что может привести к некрозу ткани печени. Выводится парацетамол из организма с мочой, в основном, в виде метаболитов (в виде глюкуроновых конъюгатов (60–80%) и сульфоконъюгатов (20–30%) и незначительно (3-5%) в неизменном виде [13, 15]).

В настоящей работе парацетамол вводили двухлеткам карпа, выращенным в аквариальных условиях при невысокой температуре (13-16 градусов

Таблица 1

Схема введения препаратов молоди карпа

Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
	<i>per os</i> через день 7 раз		
Контроль без введения препаратов	Парацетамол 500 мг/рыбу + 1 мл 50% спирта	1 мл 50% спирта	Парацетамол 500 мг/рыбу + 1 мл дистиллированной воды

Цельсия) *per os* в дозе 500мг/на рыбу через день 7 раз, масса рыб составляла: 16-45 г. Рыбы группы 2 получали препарат в смеси с 1 мл 50% спирта; группе 4 давали парацетамол в водной суспензии (с 1 мл воды). Группы 1 и 3 – контрольные (табл. 1).

Результаты и их обсуждение

Показатели эритропоза и дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови осуществлялся микроскопически на цифровом микроскопе Optika DM 15. Уровень гемопоэза оценивался по доле незрелых форм эритроцитов.

Биохимические показатели определяли на анализаторе Chem Well Awareness Technology.

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась цитохимическим методом по М.Г. Шубичу [10] в модификации для гидробионтов Г.И. Прониной [8]. Определялся средний цитохимический коэффициент (СЦК) содержания высокоцитотоксичного не-

ферментного катионного белка в нейтрофилах крови.

Результаты исследований показали, что через 1 мес. эксперимента (через две недели после окончания медикаментозного курса) в опытных группах с парацетамолом (№2 и 4) отмечаются изменения: снижение индекса печени и небольшое увеличение индекса почек (рис. 1). Что закономерно, так как происходила детоксикация препарата в печени и выведение его почками. При этом у рыб данных групп наблюдалась дряблость печени и некротизированные участки в ней. А также отложения и инкапсуляция парацетамола размером с просыное зерно в печени, а у рыб 2-й группы и в почках. Почки рыб 4-й группы дряблой консистенции.

В группе №3 изменения менее значительны, органы без очагов некроза. Печень дряблая с зелеными включениями.

В группе №4, и в меньшей степени, в группе №2 у рыб отмечено увеличение желчного пузыря и скопление в нем желчи (рис. 2-4). Соответственно, индекс желчного пузыря с содержимым в этих группах был высоким (рис. 5).

Индексы печени и почек

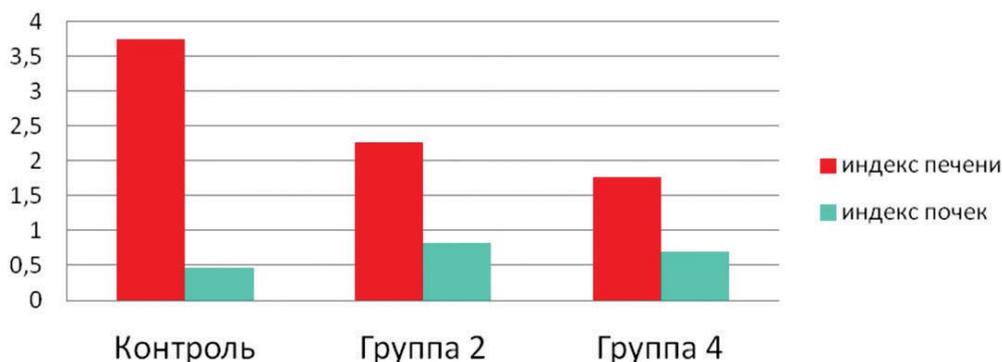


Рис. 1. Индексы печени и почек через месяц эксперимента



Рис. 2. Печень с увеличенным желчным пузырем.

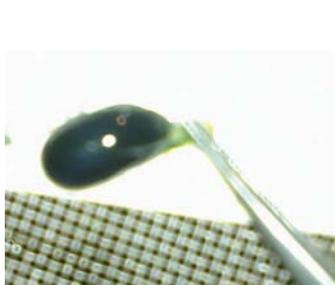


Рис. 3. Извлеченный желчный пузырь.



Рис. 4. Сравнение желчного пузыря опытной рыбы с контролем.

Закономерность динамики глюкозы на протяжении опыта не прослеживалась. Гомеостаз глюкозы часто нарушается при циррозе печени, так как печень участвует в поддержании нормального уровня глюкозы в сыворотке крови путем гликогеногенеза, гликогенолиза и глюконеогенеза. Следовательно, в нашем эксперименте у опытных рыб цирроз печени не происходило.

Гематологическая картина показала нарушения морфологии клеток периферической крови у опытных рыб (группы

2 и 4). Обнаружены следующие изменения: эритробласты с деформированным ядром, цитолиз лимфоцитов, глыбки хроматина в ядрах нормобластов и зрелых эритроцитов, эритроциты с псевдоподиями (рис. 6-8).

Достоверных различий интенсивности эритропоэза в экспериментальных группах не отмечено (табл. 2). Уровень лейкопоэза, судя по относительному количеству бластных форм лейкоцитов (миелобластов, промиелоцитов), наименее интенсивен в группе №2. Вероят-

Индекс желчного пузыря, %

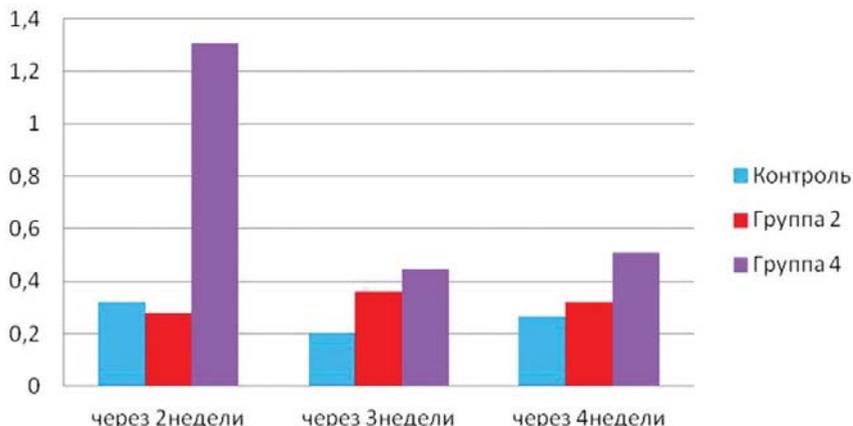


Рис. 5. Индекс желчного пузыря с содержимым в эксперименте.

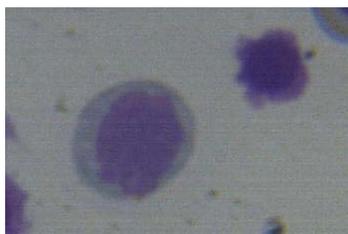


Рис. 6. Эритробласт со смещенным ядром, начало кариолиза; цитолиз лимфоцита.



Рис. 7. Уплотнение хроматина в ядре нормобласта.



Рис. 8. Эритроциты с псевдоподиями, в ядрах глыбки хроматина.

но, введение парацетамола со спиртом несколько затормозило процесс. В лейкограмме экспериментальных карпов велика доля эозинофилов. Вероятно, причина в активации системы комплемента при детоксикации. В литературе

имеются сведения и о том, что высокий уровень эозинофилов крови может быть связан с дефицитом ионов магния в организме [1, 3, 9].

Следует отметить, что в группе рыб №3, получавших 50% спирт без пара-

Таблица 2

Гематологические и цитохимические показатели молоди карпа

Показатели	Группы рыб			
	№1	№2	№3	№4
Эритропоэз, %				
Гемоцитобласты, эритробласты	0,6±0,2	1,4±0,5	0,3±0,3	0,9±0,3
Нормобласты	3,3±0,4	3,8±0,4	4,5±1,2	3,4±0,8
Базофильные эритроциты	12,5±1,2	12,6±1,5	15,8±4,5	12,1±1,7
Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов	83,6±1,4	82,2±1,4	79,5±5,6	83,6±2,1
Лейкоцитарная формула, %				
Миелобласты	-	-	0,3±0,3	0,3±0,2
Промиелоциты	0,4±0,2	-	0,3±0,3	0,1±0,1
Миелоциты	0,4±0,2	0,2±0,2	0,5±0,3	0,9±0,5
Метамиелоциты	1,2±0,4	0,8±0,5	0,8±0,5	0,9±0,3
Палочкоядерные нейтрофилы	1,3±0,4	0,6±0,4	1,8±0,9	2,4±1,2
Сегментоядерные	2,0±0,3	1,4±0,6	0,7±0,4*	2,9±0,7
Всего нейтрофилов	3,3±0,6	2,0±0,7	2,5±0,9	5,3±1,7
Эозинофилы	0,3±0,1	1,0±0,2*	0,3±0,3	1,0±0,3*
Базофилы	0,2±0,1	0,2±0,2	0,5±0,3	0,7±0,2
Моноциты	2,5±0,5	2,0±0,3	1,8±0,9	3,7±0,8
Лимфоциты	92,3±1,2	93,6±0,9	93,3±1,7	87,1±1,9
Фагоцитарная активность				
СЦК	1,94±0,04	1,92±0,11	1,93±0,22	1,97±0,07

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с 1 группой (контролем).

цетамола снижена, доля зрелых сегментоядерных нейтрофилов. В литературе имеются сведения об активации апоптоза и, следовательно, разрушения нейтрофилов у людей при злоупотреблении алкоголя [4].

Таким образом, при введении парацетамола *per os* по 500 мг/особь через день 7 раз у молодежи карпа отмечались нарушения как на органном, так и на клеточном уровне. Действие препарата усиливается смешиванием с 50% спиртом.

Список литературы

1. **Абрамьчев А.Н., Иванов В.Г., Гриншпун Л.Д.** Эозинофилии различной природы // *Терапевт. арх.* 1985. № 7. С. 88-91.
2. **Адо А.Д.** (Ред.) Патологическая физиология. М.: Триада-Х. 2000. 574 с.
3. **Волкова Е.С.** Экспериментальное моделирование патологии печени и механизмы ее коррекции // *Дисс. канд. биол. наук.* Уфа. 2003. 297 с.
4. **Жернова Е.В., Вялова Н.М., Иванова С.А., Бохан Н.А.** Показатели запрограммированной гибели лимфоцитов и нейтрофилов у лиц с алкогольной интоксикацией в динамике терапии препаратом с антиоксидантными свойствами // *Вестник Томского государственного педагогического университета.* Томск. 2009. Вып. 3 (81). С. 59-61.
5. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК. 2005. 608 с.
6. **Корягина Н.Ю., Пронина Г.И., Ревякин А.О.** Сравнительная характеристика альтернативных биомоделей по гематологическим и биохимическим показателям // *Биомедицина.* 2010. № 2. С. 68-70.
7. **Крыжановский Г.Н.** Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // *Вест. Рос. АМН.* 1997. № 5. С. 60-62.
8. **Пронина Г.И.** Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья // *Известия ОГАУ.* №4 (20). Оренбург. 2008. С. 160-163.
9. **Сорока Н.Ф., Савченко М.А.** Современные представления о роли эозинофилов в организме и гиперэозинофильных синдромах // *Медицинские новости.* 1995. № 3. С. 17-29.
10. **Шубич М.Г.** Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // *Ж. Цитология.* 1974. № 10. С. 1321-1322.
11. **Bolis C., Piccolella M., Dalla Valle A.Z., Rankin J.C.** Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research* 44. 2001. P. 265-280.
12. **Borski R.J., Hodson, R.G.** Fish research and the Institutional Animal Care and Use Committee. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 44. 2003. P. 286-294.
13. **Brodie B.B., Axelrod J.** The fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material // *J Pharmacol Exp Ther.* 1949. 94 (1). P. 58-67.
14. **Cameron, A.A., Plenderleith, M.R. & Snow, P.J.** Organization of the spinal cord in four species of elasmobranch

- fish: Cytoarchitecture and distribution of serotonin and selected neuropeptides. *Journal of Comparative Neurology* 297. 1990. P. 210-218.
15. **Chandrasekharan N.V., Dai Hu, Roos K.L.T., Evanson N.K., Tomsik J., Eilton T.S., Simmons D.L.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression // *Proc Natl Acad Sci. – USA.* 2002. T. 99. № 21. P.13926-13931.
16. **Evans D.H., Claiborne J.B.** *The Physiology of Fishes.* 3th edn. 2005. 616 p.
17. **Johansen R., Needham J.R., Colquhoun D.J., Poppe T.T., Smith A.J.** Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* 40. 2006. 323-340.
18. **Leonard R.B.** Primary afferent receptive field properties and neurotransmitter candidates in a vertebrate lacking unmyelinated fibres. *Progress in Clinical Biological Resources* 176. 1985. P. 135-145.
19. **Ostrander G.** *The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals).* 678pp. Waltham. MA. USA: Academic Press Inc. 2000.
20. **Posner L.P.** Pain and distress in fish: A review of the evidence. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 50. 2009. P. 327-328.
21. **Powers D.A.** Fish as model systems. *Science.* New York 246. 1989. P. 352-358.
22. **Snow P.J., Plenderplait M.B., Wright L.L.** Quantitative study of primary sensory neurone populations of three species of elasmobranch fish. *Journal of Comparative Neurology.* 1993. 334 p.

Modelling of the fishes liver pathology by paracetamol

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin

Introduction of *per os* paracetamol in a dose of 500 mg / an individual in mix with water and from 50% alcohol to carp thresh is cause of liver pathology. Indexes of a gall bladder and kidneys of experimental fishes increase, the liver index decreases, the morphological structure of cells of peripheral blood is broken, there are changes in a leukocytic formula.

Key words: pathology modeling, paracetamol, fishes, indexes of an internal leukogram, phagocyte activity of neutrophils.