



## Моделирование ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени в условиях алиментарной депривации протеина

Г.П. Копыльчук, О.Н. Волощук

*Черновицкий национальный университет, институт биологии, химии и биоресурсов, Черновцы, Украина*

*Контактная информация: Волощук Оксана Николаевна, oxbm@mail.ru*

В работе представлены данные экспериментального моделирования ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени на крысах, содержащихся в различных режимах белкового питания. Показано, что алиментарная депривация протеина является критическим фактором, усугубляющим течение ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени. Использованный метод введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении двух дней после четырехнедельного содержания крыс в условиях алиментарной депривации протеина позволяет получить модель дисфункции желчеобразования в печени.

**Ключевые слова:** моделирование, ацетаминофен, печень, желчеобразующая функция, алиментарная депривация протеина

### Введение

Оценка состояния основных функций печени при гепатопатологии является необходимой для понимания биохимических механизмов нарушения ее функционирования, разработки критериев ранней диагностики гепатопатологических состояний и поиска эффективных гепатопротекторных препаратов. В современной гепатологии активно развиваются представления о биохимических механизмах формирования лекарственной гепатотоксичности [6, 11, 15, 17]. Именно поэтому моделирование токсических повреждений печени является чрезвычайно важной задачей в диагностическом, терапевтическом и профилактическом аспекте. При гепатопатологических процессах одной из первых нарушается желчеобразующая функция печени, поэтому для диагностики деструктивных нарушений при токсических повреждениях печени актуальным является исследование состояния ее желчеобразующей функции. На сегодня также остается открытым вопрос последовательности биохимических процессов, определяющих развитие и реализацию на-

сических повреждений печени является чрезвычайно важной задачей в диагностическом, терапевтическом и профилактическом аспекте. При гепатопатологических процессах одной из первых нарушается желчеобразующая функция печени, поэтому для диагностики деструктивных нарушений при токсических повреждениях печени актуальным является исследование состояния ее желчеобразующей функции. На сегодня также остается открытым вопрос последовательности биохимических процессов, определяющих развитие и реализацию на-

рушений желчеобразующей функции печени в условиях ограниченного поступления белков в организм.

**Целью** работы стало моделирование ацетаминофен-индуцированного повреждения печени в условиях алиментарной депривации протеина и изучение состояния желчеобразующей функции печени, биохимическими маркерами которой является содержание желчных кислот, холестерина и билирубина в желчи [10].

### **Материалы и методы**

Исследования проводили на 36 белых нелинейных крысах-самцах массой 90-100 г в возрасте 2-2,5 мес. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Крыс содержали в виварии по одной в пластмассовых клетках с песчаной подстилкой, доступ к воде осуществлялся *ad libitum*. Нормирование суточного рациона проводили с учетом принципа парного питания.

Животные были разделены на группы: I – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе (Г); II – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина (НПР+Г); III – контроль (К). Животные I-й и III-й групп получали рацион, содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 76% углеводов, сбалансированный по всем нутриентам [2]. Животные II-й группы получали рацион, включающий 4,7% белка, 10% жиров и 85,3% углеводов.

После четырехнедельного содержания крыс на экспериментальной диете моделирование ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени осуществляли путем введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении 2 дней с помощью специального зонда. Цервикальную дислокацию крыс под легким эфирным наркозом осуществляли на 31-е сутки эксперимента.

Для получения желчи после вскрытия брюшной полости желчные протоки перевязывали шелковой нитью и отделяли желчный пузырь. После механического измельчения желчного пузыря желчь разбавляли 96% этанолом в 20 раз, центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин и супернатант отбирали в чистые пробирки [13].

Концентрацию желчных кислот и холестерина определяли фотоколориметрическим методом, в основе которого лежит способность охлажденного раствора хлорного железа в ледяной уксусной кислоте, предварительно смешанного с концентрированной серной кислотой в соотношении 1:1, образовывать окрашенные комплексы с желчными кислотами и холестерином, имеющие максимум поглощения при 385 нм и 480 нм соответственно [2]. Концентрацию общего билирубина определяли ферментативным методом, базирующемся на взаимодействии диазотированной сульфаниловой кислоты в присутствии кофеинового реактива с билирубином, образующем азобилирубин, концентрация которого прямо пропорциональна концентрации билирубина в пробе. Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Разнообразие функций печени является причиной нарушения ряда метаболических процессов, протекающих в организме в условиях гепатопатологии. Адекватной моделью, используемой с целью изучения биохимических механизмов нарушения функций печени, является модель фармакологических или токсических гепатитов [16]. Классическим индуктором токсического повреждения печени является ненаркотический анальгетик Ацетаминофен, метаболизирующейся в гепатоцитах [8]. Ацетаминофен проникает через мембрану гепатоцита путем диффузии из синусоидов, связывается со специфическими внутриклеточными белками, транспортирующими лекарственные препараты в эндоплазматический ретикулум, где происходят основные процессы его метаболизма, а также в желчные каналцы, транспортные белки которых задействованы в экскреции метаболитов ацетаминофена в желчь. Нами ранее было показано, что введение *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении 2 дней крысам, содержащимся в условиях полноценного сбалансированного питания, позволяет моделировать гепатоцеллюлярный или цитолитический тип повреждения печени. В то же время, у крыс, содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, развивался смешанный тип лекарственного повреждения печени, характеризующийся цитолизом гепатоцитов и холестазом [1]. Следует отметить, что комплексное исследование желчеобразующей функции печени в условиях ацетаминофен-индуцированного повреждения печени не проводилось.

Результаты наших исследований показали, что в желчи животных с моделированным токсическим гепатитом наблюдается повышение содержания холестерина в 5 раз по сравнению с показателями контроля (рис. 1), что свидетельствует о проявлениях застоя желчи. В то же время, у животных с токсическим гепатитом, содержащихся в условиях белковой недостаточности, содержание холестерина почти в 20 раз превышает показатели контроля. Накопление нерастворимого в воде холестерина будет сопровождаться его кристаллизацией с последующим литогенезом в желчных протоках и желчном пузыре [5]. В свою очередь, повышение литогенных свойств желчи сопровождается нарушением способности гепатоцитов к формированию желчной мицеллы. Кроме того, застой желчи рассматривается как триггер воспалительных изменений желчных протоков [4].

Из холестерина в печени синтезируются «первичные» желчные кислоты, включающиеся в гепатоэнтральную циркуляцию [3]. Результаты наших исследований показали, что в условиях ацетаминофен-моделированного гепатита наблюдается тенденция к снижению содержания желчных кислот в желчи (рис. 2). Вероятно, установленный нами факт можно объяснить либо нарушением секреции гепатоцитами желчных кислот, либо нарушением синтеза желчных кислот вследствие снижения активности микросомального фермента холестерол-7 $\alpha$ -гидроксилазы [7]. В то же время, в желчи крыс с моделированным гепатитом, содержащихся в условиях белковой недостаточности, наблюдается

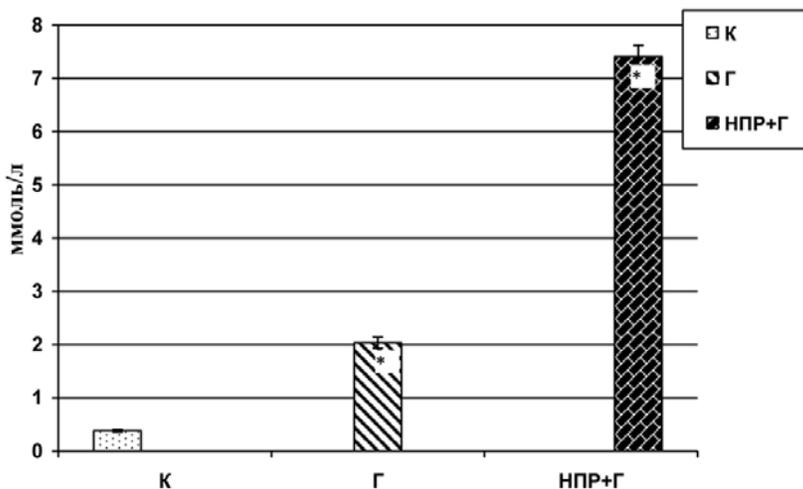


Рис. 1. Содержание холестерина в желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

Примечание (тут и далее):

К – контроль;

Г – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе;

НПР+Г – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина;

\* – достоверная разница по сравнению с контролем.

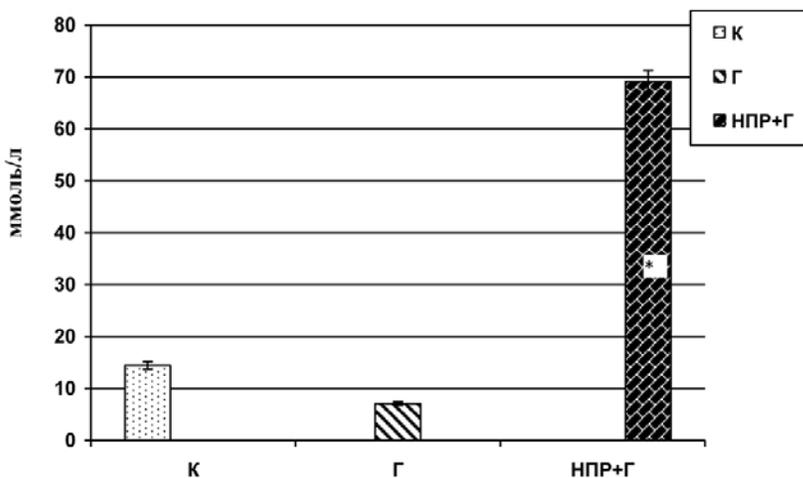


Рис. 2. Содержание желчных кислот в желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

резкое увеличение содержания желчных кислот в желчи, что свидетельствует о прогрессирующем нарушении оттока желчи из желчного пузыря в условиях алиментарной белковой недостаточности. Зарегистрированные изменения, вероятно, являются следствием воспалительного процесса с последующим нарушением коллоидно-осмотической стабильности желчи, концентрирующей и выделительной функции желчного пузыря. Нарушение оттока желчи может существенно нарушать процессы переваривания и всасывания, приводить к глубоким морфо-функциональным нарушениям пищеварительной системы [12]. Таким образом, белковая недостаточность является критическим фактором, усугубляющим течение ацетаминофен-индуцированного повреждения печени.

Следует отметить, что в обеих исследуемых группах наблюдается снижение холато-холестеринового

коэффициента, указывающего на соотношение в желчи между желчными кислотами и холестерином, достигая значений меньше 10-ти (рис. 3). В норме холато-холестериновый коэффициент больше 10-ти, а его снижение является индикатором склонности к образованию камней в желчевыводительной системе [14, 9]. Также следует отметить, что в обеих исследуемых группах животных наблюдается повышение общего билирубина в желчи (рис. 4), являющееся информативным тестом, указывающим на застой и сгущение желчи.

Итак, достоверное повышение по сравнению с контролем концентрации билирубина и холестерина на фоне снижения холато-холестеринового коэффициента свидетельствует о нарушении коллоидных свойств желчи и желчеобразующей функции печени в условиях моделирования ацетаминофен-индуцированного повреждения печени.

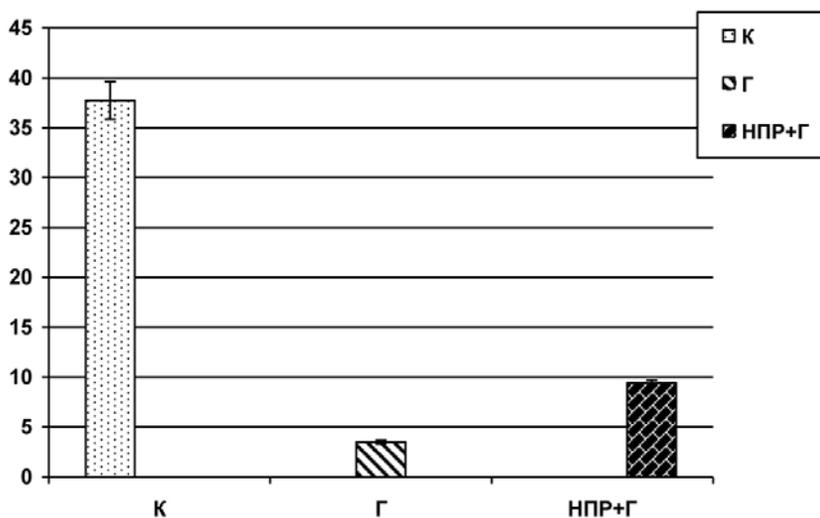


Рис. 3. Холато-холестериновый коэффициент желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

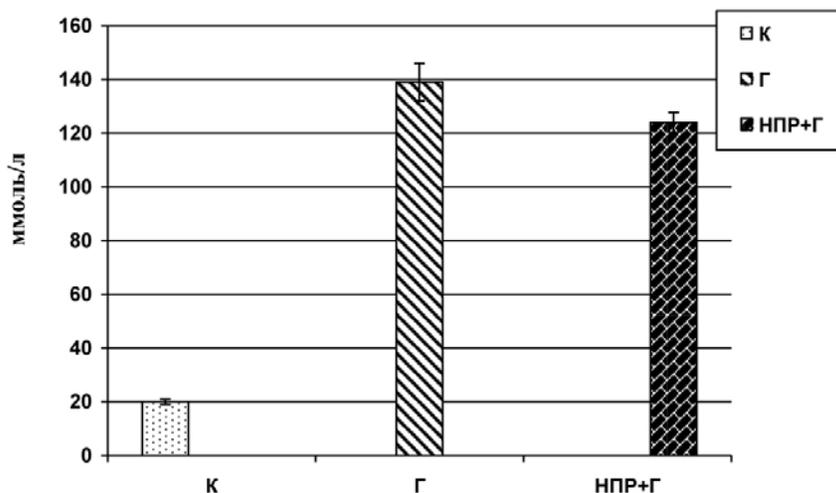


Рис. 4. Содержание общего билирубина в желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

### Выводы

Использованный метод введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении двух дней после четырехнедельного содержания крыс в условиях алиментарной депривации протеина позволяет получить модель дисфункции желчеобразования в печени. Предложенная модель может быть использована для разработки терапевтических подходов к устранению и коррекции последствий лекарственного повреждения печени.

### Список литературы

1. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П., Бучковская И.М. Активность маркерных ферментов печени при токсическом гепатите в условиях алиментарной депривации протеина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014. 108 (8). С. 96-100.
2. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П., Кадайская Т.Г. Состояние системы энергообеспечения митохондрий печени в условиях алиментарной депривации протеина // Вопр. питания. 2014. № 3. С. 12-16.
3. Громашевська Л.Л., Мишунін І.Ф., Вовк А.Д. Сульфатовані жовчні кислоти у сечі при гепатобілярній патології // Інфекційні хвороби. 2003. № 1. С. 52-55.
4. Єлосва З.В. Діагностичне значення реологічних властивостей жовчі при вірусних гепатитах у дітей // Педіатрія. 2001. № 3. С.79-81.
5. Єлосва З.В. Значення складу жовчі для діагностики холестатичних варіантів вірусного гепатиту А у дітей // Современная педиатрия. 2011. № 6(40). С. 132-134.
6. Еремина Е.Ю. Лекарственные поражения печени // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2012. № 1. С. 6-25.
7. Ильченко А.А. Желчные кислоты в норме и при патологии // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. 2010. № 4. С. 3-13.
8. Левина О.А., Гончарова И.А., Филатова Т.Г. и др. Влияние стимуляции и депрессии макрофагов на развитие острого токсического гепатита у крыс, вызванного парацетамолом // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2003. Т. 66. № 1. С. 57-59.
9. Маркидонова А.А., Белобородова Э.И., Бурковская В.А. Состояние желчевыводящей системы и литогенность желчи у больных воспалительными заболеваниями кишечника // Бюллетень сибирской медицины. 2013. Т. 12. № 6. С. 112-119.

10. *Неронов В.А.* Диагностика синдрома билиарной недостаточности у больных хроническими вирусными гепатитами // Человек и его здоровье. 2010. № 1. С. 86-90.
11. *Ревякин А.О., Капанадзе Г.Д., Касинская Н.В., Степанова О.И., Баранова О.В.* Моделирование лекарственного токсического гепатита на крысах // Биомедицина. 2014. № 1. С. 52-53.
12. *Соломенцова Т.А.* Билиарная недостаточность в клинической практике врача-терапевта // Здоров'я України. 2009. № 9. С. 48-50.
13. *Стефанов О.В.* Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). - К.: Авіцена. 2001. 528 с.
14. *Banzaraksheev V.G.* Experimental evaluation of influence of multicomponent phytotherapy on liver's morphofunctional condition // Fundamental research. 2012. № 4. P. 406-409.
15. *Borlak J., Chatterji B., Londhe K.B., Watkins P.B.* Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury // Genome Medicine. 2013. Vol. 5 (86). P. 2-14.
16. *Kuvandik G., Duru M., Nacar A.* Effects of erdosteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats // Toxicologic. pathology. 2008. Vol. 36. P. 714-719.
17. *Somanawat K., Thong-Ngam D., Klaikeaw N.* Curcumin attenuated paracetamol overdose induced hepatitis // World J. Gastroenterol. 2013. Vol. 19 (12). P. 1962-1967.

## Modeling of the acetaminophen-induced disturbances of the bile producing liver function under the conditions of alimentary deprivation of protein

G.P. Kopylchuk, O.N. Voloshchuk

Data of the experimental modeling of acetaminophen-induced disturbances of the bile producing liver function in rats, maintained under the different regimen of the protein nutrition are submitted. It is shown, that alimentary deprivation of protein is the critical factor, aggravating the course of the acetaminophen-induced disturbance of the bile producing liver function. The used method of per os administration of acetaminophen in a starch suspension at dose 1 g/kg of body weight during 2 days after the 4-weeks maintenance of rats under the conditions of alimentary deprivation of protein, allows to obtain the model of the disfunction of a bile production by liver.

**Key words:** modeling, acetaminophen, liver, bile producing liver function, alimentary deprivation of protein.