

УДК 616.36-002.1:616.151

*Н.А. Рикало, І.В. Романенко**Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова*

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ  
ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ СИРОВАТКИ КРОВІ  
ПРИ ГОСТРОМУ АЛКОГОЛЬНОМУ ГЕПАТИТІ  
В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ**

Описані морфологічні зміни печінки при експериментальному гострому алкогольному гепатиті, який моделювався шляхом введення щурам 40%-вого розчину етанолу протягом семи днів. Виявлені множинні інтрацелюлярні відкладення нейтральних жирів у гепатоцитах. Наведені достовірні зміни біохімічних маркерів синдромів холестазу та цитолізу гепатоцитів, зафіксовані зміни білоксинтезуючої функції печінки та зміни у пігментному обміні при експериментальному гострому алкогольному гепатиті. Морфологічно та біохімічно встановлені дозозалежні ефекти 40%-вого розчину етанолу на організм лабораторних тварин, визначено його летальну й сублетальну дози для організму щурів.

**Ключові слова:** *гострий алкогольний гепатит, експериментальна модель, морфологічні зміни, щури.*

Алкогольний гепатит і зумовлені ним непрацездатність і смертність залишаються серйозною медичною проблемою в Україні та світі. Відомо, що через зловживання алкоголем щорічно у світі помирає 2,5 млн осіб; алкоголь є третім за значенням фактором ризику розвитку хвороб у всьому світі [1].

Проблема алкогольного гепатиту останнім часом набула особливого значення не лише внаслідок поширення алкоголізму в Україні, але й тому, що він нерідко поєднується з гепатотропною вірусною інфекцією, ускладнюючи її перебіг і наслідки [2].

Гострий алкогольний гепатит – це гостре токсичне ураження печінки, що розвивається внаслідок прийому надмірної дози алкоголю, яка перевищує метаболічні можливості гепатоцитів. Летальна доза етанолу становить 2,0–3,5 г/кг, його концентрація в крові – 3,1–5,6 ‰ [3].

Провідна патогенетична роль у розвитку гострого алкогольного гепатиту належить найбільш небезпечному метаболіту етанолу – ацетальдегіду. Розлади метаболізму, що супроводжують алкогольну інтоксикацію, та накопичення в гепатоцитах ацетальдегіду, стають причиною розвитку стеатозу. У його розвитку мають значення

посилене утворення триацилгліцеролів і порушене їх виведення з печінки у складі ліпопротеїнів. Активний синтез триацилгліцеролів пов'язаний зі збільшеним надходженням у печінку вільних жирних кислот із крові, оскільки при вживанні алкоголю посилюється гідроліз триацилгліцеролів у жировій тканині. Крім того, зменшується окиснення жирних кислот в мітохондріях через пригнічення реакцій циклу трикарбонових кислот в умовах підвищення співвідношення НАДН/НАД у мітохондріях. Посилюється біосинтез жирних кислот з ацетил-КоА. Причиною цього є збільшення концентрації ацетил-КоА через посилене його утворення з етанолу і недостатнє «спалювання» в циклі трикарбонових кислот. Підвищення концентрації жирних кислот у гепатоцитах, а також збільшене утворення гліцерил-3-фосфату, що його супроводжує, веде до зростання синтезу триацилгліцеролів. Причиною порушення виведення триацилгліцеролів з печінки є токсична дія ацетальдегіду: ацетилювання апопротеїнів порушує процес формування міцел ліпопротеїнів дуже низької щільності, а модифікація тубуліну та інших білків цитоскелету робить неповноцінними процеси їх секреції в кров [4].

© Н.А. Рикало, І.В. Романенко, 2016

Необхідність більш детального з'ясування механізмів розвитку алкогольного ураження печінки та пошук ефективних методів його корекції обумовлюють актуальність дослідження механізмів розвитку гострого ураження печінки етанолом в умовах експерименту.

Метою нашої роботи було визначення летальної (DCL) та сублетальної дози (LD50) 40%-вого етанолу для лабораторних щурів, а також підтвердження розвитку гострого алкогольного гепатиту комплексним дослідженням біохімічних показників сироватки крові та морфологічних змін у печінці.

**Матеріал і методи.** Експериментальні дослідження проводились у двох серіях експерименту на 48 лабораторних білих нелінійних статевозрілих щурах самцях масою 120–130 г (середня маса – 125 г). Тварин утримували у віварії ВНМУ ім. М. І. Пирогова відповідно загальноприйнятими правилами і стандартам. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей», а також згідно з науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [5]. На першому етапі експерименту 24 тварини були розділені на чотири групи (по шість щурів у кожній) та отримували наступні дози 40%-вого етанолу: 1-ша група – 10 мл/кг, 2-га група – 15 мл/кг, 3-тя група – 20 мл/кг, 4-та група – 25 мл/кг. Другий етап експерименту проводився для підтвердження сублетальної дози. Для його проведення використовувались 24 тварини, які також були розділені на чотири групи по шість тварин у кожній, які отримували наступні дози етанолу: 1-ша – інтактні тварини, 2-га – 10 мл/кг, 3-тя – 15 мл/кг, 4-та – 20 мл/кг. Введення 40%-вого етанолу відбувалося інтрагастральним шляхом протягом семи днів за допомогою металевого зонда з оливою.

Після виведення тварин з експерименту під тіопенталовим наркозом (з розрахунку 25 мг/кг) здійснювали забір тканини печінки для гістологічних досліджень. Для цього шматочки тканини печінки фіксували у 10%-вому розчині формаліну. Зразки різали на мікротомі, що заморожує, зрізи фарбували суданом-III для виявлення жирової інфільтрації печінки [7].

Окрім того, біохімічними методами визначали активність аланінамінотрансферази

(АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), гамаглутамілтрансферази (ГГТ), лужної фосфатази (ЛФ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), концентрації загального білірубіну і загального білка у сироватці крові. Дослідження сироватки крові проводили на біохімічному аналізаторі «Vital Microlab 300» з використанням реактивів фірми «Pointe Scientific Inc». Біохімічні і гістологічні дослідження проводили на тваринах 2-ї серії експерименту. Отримані цифрові величини статистично обробили, різницю між порівнюваними величинами визначали, використовуючи U-критерій Манна–Уїтні.

**Результати та їх обговорення.** Після проведення першого етапу експерименту усі тварини 4-ї групи загинули. Серед тварин 1-ї піддослідної групи загинуло 33,3 %, серед 2-ї – 50 %, серед 3-ї – 50 %. DCL – 40%-вий етанол в дозі 25 мл/кг. У ході проведення другої серії експерименту летальність серед тварин 4-ї групи становила 50 %, серед тварин 1-ї – 3-ї груп – 0 %. Тварини 4-ї групи вибували з експерименту на 2-гу, 3-тю, 4-ту добу. Отже, LD50 етанолу була підтверджена в другій серії експерименту та становила 20 мл/кг.

Біохімічним дослідженням сироватки крові щурів встановлено достовірне підвищення активності АлАТ, АсАТ та ЛДГ, що підтверджує порушення метаболізму і пошкодження гепатоцитів, яке супроводжувалось цитолізом клітин і виходом у кров ферментів. Зокрема встановлено, що після 7-денного вживання етанолу зросла активність АлАТ у щурів 1-ї (10 мл/кг), 2-ї (15 мл/кг) та 3-ї (20 мл/кг) груп відносно інтактної групи, а саме у 2,3; 2,92 та 4,54 рази відповідно. Активність АсАТ зростала в 1-й групі у 4,78 рази, у 2-й у 11,8 рази, в 3-й у 15 разів відповідно інтактної групи. Активність печінкових ізоформ ферменту ЛДГ зростала в 1-й групі у 1,8 рази, в 2-й у 3 рази, в 3-й у 4,5 рази відносно інтактної групи.

Для підтвердження синдрому холестази досліджувались показники ГГТ та ЛФ. Активність ГГТ збільшувалася у порівнянні з інтактними тваринами наступним чином: у щурів 1-ї групи в 6,6 рази, 2-ї – у 11,43 рази, 3-ї – у 14,3 рази. Активність ЛФ збільшувалась у щурів 1-ї групи у 6,7 рази, 2-ї – у 9,2 рази, 3-ї – у 11,2 рази відповідно, що обумовлено її вивільненням із ушкоджених гепатоцитів, а також індуктивним її синтезом у жовчних каналцях. Все це підтверджувало наявність холестази у печінці.

Алкогольне пошкодження печінки супроводжувалося пригніченням білоксинтетичної функції органу. Нами встановлено достовірне зниження рівня загального білка у щурів при гострому алкогольному гепатиті порівняно з інтактною групою: у 1-й групі – на 1,47 %, у 2-й – на 7,12 %, у 3-й – на 35,41 %.

Про розвиток порушень пігментного обміну та печінково-клітинної недостатності при гострому алкогольному гепатиті свідчить рівень загального білірубину, концентрація якого достовірно збільшилась відносно групи інтактних тварин наступним чином: у 1-й групі в 1,41 раз, у 2-й – в 2,4 раз, у 3-й – в 2,83 раз (таблиця).

*Результати біохімічних досліджень при моделюванні гострого алкогольного гепатиту*

Група	АлАТ, Од/л	АсАТ, Од/л	ГГТ, Од/л	ЛФ, Од/л	ЛДГ, Од/л	Загальний білок, г/л	Загальний білірубін, мкмоль/л
Інтактні тварини	28,05±2,130	29,25±2,850	4,750±0,260	47,50±2,050	723,5±49,40	70,71±1,260	4,70±0,210
1-ша	64,67±1,270	85,33±1,70	31,50±0,580	317,8±5,450	1284±25,66	69,67±1,270	6,670±0,120
2-га	82,17±1,550	175,1±3,210	54,33±1,080	438,0±7,420	2213±43,70	65,67±1,270	11,28±0,220
3-тя	127,3±7,990	222,6±16,54	68,0±4,97	531,6±38,60	3316±215,9	45,67±2,860	13,30±0,890

*Примітка.*  $p < 0,05$  у порівнянні з інтактними тваринами.

Як показали результати світлової мікроскопії, стан печінкової паренхіми інтактних щурів був типовим для цього виду тварин. У експериментальних тварин другої серії груп (2-га – 4-та) виявлені ознаки жирової дистрофії печінки. Зокрема, виявлені гепатоцити, що містять значну кількість нейтральних жирів у вигляді множинних дрібних крапель, які знаходяться в лізосомальних вакуолях (рис. 1).

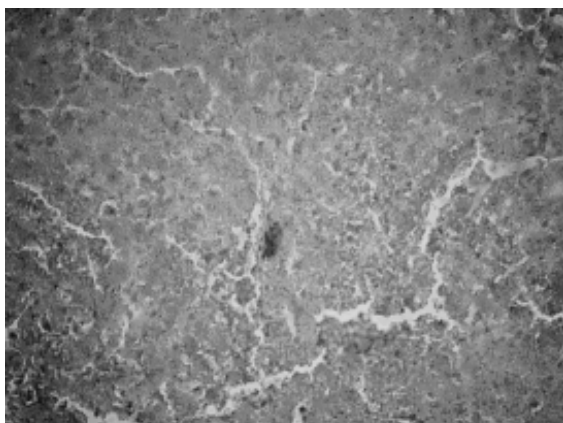


Рис. 1. Печінка щура після введення 40%-вого етанолу в дозі 10 мл/кг протягом 7 днів. Нейтральні жири у вигляді множинних дрібних крапель, які знаходяться в лізосомальних вакуолях гепатоцитів. Судан, заморожений зріз, збільшення ок. 10, об. 40

У зразках печінки щурів, що отримували етанол в дозі 15 мл/кг, наявні дрібнокраплинні інтрацелюлярні відкладення нейтральних жирів, що розташовуються інтравакуолярно, в гепатоцитах, які розміщуються ближче до периферії часточок (рис. 2). В деяких зрізах відмічаються пилоподібні інтрацелюлярні включення нейтральних жирів та окремі округлі краплини, що вільно розташовуються в цитоплазмі гепатоцитів, які розташовані на периферії печінкових часточок (рис. 3).

Більш виразні зміни відкладання жирових включень спостерігались в біоптатах печінки тварин, які отримували сублетальну дозу етанолу (20 мл/кг). Скупчення нейтральних

жирів розташовані внутрішньоклітинно у вакуолях, переважно в перилобулярній зоні печінкової часточки, місцями займаючи до 75 % об'єму гепатоцитів без зміщення ядра (рис. 4).

В окремих гепатоцитах, що розташовуються центрилобулярно, спостерігаються лізосомальні інтрацелюлярні включення нейтральних жирів, у тому числі із зміщенням ядра (рис. 5).



Рис. 2. Печінка щура після введення 40%-вого етанолу в дозі 10 мл/кг протягом 7 днів. Дрібнокраплинні інтрацелюлярні відкладення нейтральних жирів, що розташовуються інтравакуолярно в гепатоцитах, які розміщуються ближче до периферії часточок. Судан, заморожений зріз, збільшення ок. 10, об. 10

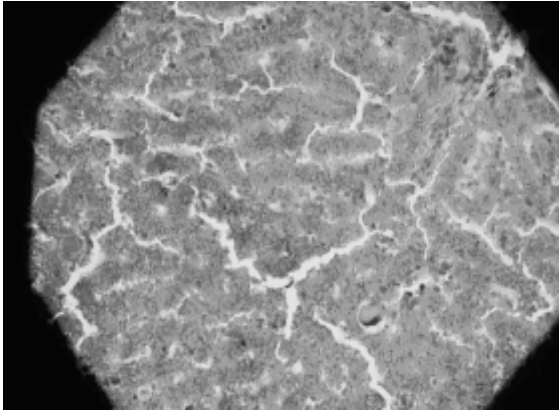


Рис. 3. Печінка щура після введення 40%-вого етанолу в дозі 10 мл/кг протягом 7 днів. Пилоподібні інтрацелюлярні вclusions нейтральних жирів та окремі округлі краплини, що вільно розташовуються в цитоплазмі гепатоцитів. Судан, заморожений зріз, збільшення ок. 10, об. 40

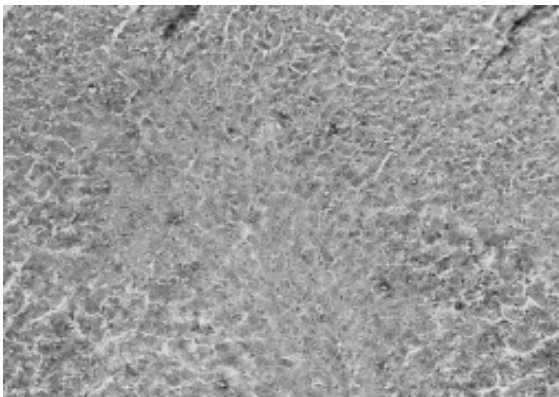


Рис. 4. Печінка щура після введення 40%-вого етанолу у дозі 10 мл/кг протягом 7 днів. Скупчення нейтральних жирів розташовані внутрішньоклітинно у вакуолях, переважно в перилобулярній зоні печінкової часточки, місцями займаючи до 75 % об'єму гепатоцитів без зміщення ядра. Судан, заморожений зріз, збільшення ок. 10, об. 20

Таким чином, при введенні щурам 40%-вого розчину етанолу протягом семи днів виявлені достовірні зміни біохімічних маркерів синдромів холестазу та цитолізу гепа-

### Література

1. *Бабак О.Я.* Алкогольная болезнь печени: научные достижения и клинические перспективы / О.Я. Бабак // Сучасна гастроентерологія. – 2006. – № 6 (32). – С. 4–8.
2. *Андрейчин С.М.* Особливості біохімічних змін в організмі експериментальних тварин при гострому алкогольному отруєнні / С.М. Андрейчин, З.С. Скірак // Вісник наукових досліджень. – 2008. – № 3 (52). – С. 67–69.
3. *Kuntz E.* Hepatology. Principles and Practice. Heidelberg / E. Kuntz, H.-D. Kuntz. – Springer Medizin Verlag, 2006 – 906 p.
4. Патологія: в 2 т. – Вінниця: Нова Книга, 2016. – Т. 2: Патологія органів і систем. – 2016. – 291 с.

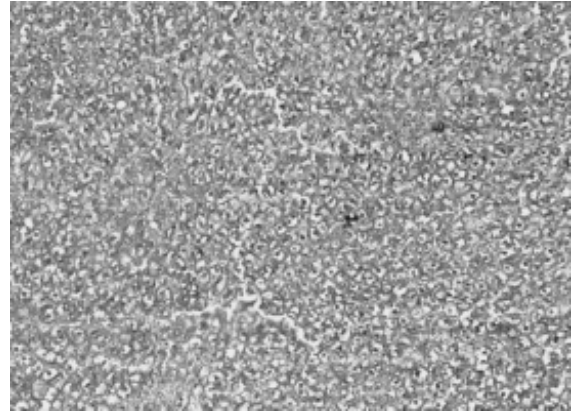


Рис. 5. Печінка щура після введення 40%-вого етанолу в дозі 10 мл/кг протягом 7 днів. Лізосомальні інтрацелюлярні вclusions нейтральних жирів, у тому числі із зміщенням ядра. Судан, заморожений зріз, збільшення ок. 10, об. 20

тоцитів, зафіксовані зміни білоксинтезуючої функції печінки та зміни у пігментному обміні.

### Висновки

Морфологічні зміни печінки при експериментальному моделюванні гострого алкогольного гепатиту у щурів вказують на наявність жирової дистрофії печінки, про що свідчать множинні інтрацелюлярні відкладення нейтральних жирів.

Біохімічними та морфологічними дослідженнями встановлені дозозалежні ефекти 40%-вого етанолу.

Визначені летальна (25 мл/кг) і сублетальна (20 мл/кг) дози 40%-вого етанолу на організм лабораторних щурів.

### Перспективи подальших розробок.

Встановлена сублетальна доза 40%-вого етанолу на організм лабораторних щурів може мати практичне застосування для моделювання гострого алкогольного гепатиту і використовуватись у доклінічному етапі досліджень ефективності і механізмів дії фармакологічних препаратів.

5. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г.А. Сайфетдінова. – К.: Авіценна, 2002. – 156 с.

6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 56 p.

7. Меркулов Г.А. Курс патолого-гистологической техники / Г.А. Меркулов. – М.: Медицина, Ленингр. отд., 1969. – 424 с.

**Н.А. Рыкало, И.В. Романенко**

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ АЛКОГОЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

Описаны морфологические изменения печени при экспериментальном остром алкогольном гепатите, который моделировался путем введения крысам 40%-ного раствора этанола в течение семи дней. Обнаружены множественные внутриклеточные отложения нейтральных жиров в гепатоцитах. Приведены достоверные изменения биохимических маркеров синдромов холестаза и цитолиза гепатоцитов, зафиксированы изменения белоксинтетической функции печени и изменения в пигментном обмене при экспериментальном остром алкогольном гепатите. Морфологически и биохимически выявлены дозозависимые эффекты 40%-ного раствора этанола на организм лабораторных животных, определены его летальная и сублетальная дозы для организма крысы.

**Ключевые слова:** острый алкогольный гепатит, экспериментальная модель, морфологические изменения, крысы.

**N.A. Rykalo, I.V. Romanenko**

**PATOMORFOLOGICAL CHANGES OF LIVER AND BIOCHEMICAL CHANGES OF WHEY OF BLOOD ARE AT ACUTE ALCOHOLIC HEPATITIS IN THE CONDITIONS OF EXPERIMENT**

The article describes the morphological changes of the liver in experimental acute alcoholic hepatitis, which was simulated by injecting rats of a 40% solution of ethanol for seven days, found multiple intracellular the deposition of neutral fats in hepatocytes. Given significant changes of the biochemical markers of the syndrome of cholestasis and cytolysis of hepatocytes, committed changes protein synthetical function of liver and changes in liver metabolism during experimental acute alcoholic hepatitis. Morphologically and biochemically identified dose-dependent effects of a 40% solution of ethanol on the organism of laboratory animals, set it and sublethal lethal dose for the rat organism.

**Key words:** acute alcoholic hepatitis, experimental model, morphological changes, rats.

*Поступила 15.04.16*