

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

Система стандартизации и здравоохранения Российской Федерации
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от
повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной
помощи

**Оценка лечебной эффективности новых лекарственных средств
на экспериментальных моделях алкогольных гепатитов
различной степени тяжести**

Методические рекомендации
ФМБА России МР 12.11-13

Москва 2013

ПРЕДИСЛОВИЕ

1 Разработаны Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России).

Директор – д.м.н., профессор Е.Ю. Бонитенко.

2 Исполнители: д.м.н., профессор А.Н. Петров, д.м.н., профессор Е.Ю. Бонитенко, к.м.н., вед.н.сотр. М.К. Шевчук, д.м.н., ст.н.сотр. В.А. Башарин, д.м.н., профессор Т.Н. Саватеева-Любимова, н.сотр. Е.К. Георгианова, к.б.н., ст.н.сотр. К.В. Сивак, к.б.н., ст.н.сотр., К.И. Стосман, н.с. К.Л. Авагян.

3 В настоящем документе реализованы требования Законов Российской Федерации:

– от 22 июля 1993 г. № 5487-1 «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (с изменениями, внесёнными Указом Президента Российской Федерации от 24 декабря 1993 г. № 2288);

– от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

4 Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством «15» февраля 2013 г.

5 Введены впервые.

Содержание

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. Область применения.....	7
2. Нормативные ссылки.....	8
3. Обозначения и сокращения.....	9
4. Описание метода.....	10
5. Эффективность использования метода.....	18
ПРИЛОЖЕНИЕ А Методы проведения биохимических, иммунологических и гистологических исследований.....	24
Библиография.....	25

ВВЕДЕНИЕ

Острый алкогольный гепатит (ОАГ) – это острое прогрессирующее воспалительно-дистрофическое поражение печени, развивающееся на любом этапе алкогольной болезни печени (АБП) при длительном (от 3 дней до 12 недель), частом (возможно ежедневном) употреблении токсических (для данного пациента) доз этанола, как правило, на фоне патологического пристрастия к нему, и характеризующееся высокой частотой фатальных осложнений – прогрессирующей печеночно-клеточной недостаточностью (ПКН), печеночной энцефалопатией (ПЭ), гепаторенальным синдромом (ГРС) и др. Острый алкогольный гепатит отличается высокой степенью летальности, которая составляет от 10 до 30%.

Поиск гепатопротекторов для лечения ОАГ различной степени тяжести является актуальной проблемой современной медицины. Усовершенствование схемы лечения ОАГ на основе разработки его экспериментальных моделей будет иметь положительный социальный и экономический эффект, способствуя повышению качества жизни, снижению степени инвалидизации и уменьшению сроков утраты трудоспособности у больных с алкогольными поражениями печени, вызванными спиртосодержащими жидкостями различного назначения.

Важным аспектом экспериментального моделирования ОАГ является оценка эффективности лекарственных средств (новых и известных, используемых по новому назначению) как средств лечения гепатитов алкогольной этиологии. В соответствии с Федеральным законом Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. №61 «Об обращении лекарственных средств» обязательным этапом разработки лекарственного средства является доклиническое исследование препарата для медицинского применения, проводящееся с целью получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства. Доклиническое исследование лекарственного средства проводится на лабораторных животных в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP), содержащимися в Государственном стандарте РФ ГОСТ Р 53434-2009 и изложенными в Приказе Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н. В соответствии с этими нормативными документами в методических рекомендациях по проведению доклинического исследования лекарственного средства должны быть определены показатели, позволяющие оценить эффективность исследуемого препарата на соответствующих экспериментальных моделях.

Следует отметить, что разработка экспериментальных моделей алкогольного поражения печени является трудной задачей. В литературе практически отсутствуют сведения о возможности развития ОАГ при однократном или достаточно кратковременном воздействии этанола в эксперименте. Основной объект экспериментальных исследований – грызуны испытывают естественное отвращение к этанолу и достичь введения последнего в количествах, эквивалентных потреблению людьми – алкоголиками, достаточно проблематично. Учитывая, что продолжительность жизни крыс (2-3 года) значительно меньше, чем у человека, экспозиция алкоголя у этих животных не

сравнима с таковой у алкоголика. Другим фактором, затрудняющим моделирование алкогольного поражения печени на грызунах, является значительно более высокая скорость метаболизма этанола у крыс, чем у человека [1]. В связи с этим для формирования токсических эффектов животные должны получать этанол в высоких дозах – от 8 до 16 г/кг в день и в течение длительного времени – до 5 недель [1, 2]. Но даже и при соблюдении этих условий морфологическая картина поражения печени характеризовалась в лучшем случае гепатозом с фиброзом. Создание специальной жидкой диеты (Lieber-DeCarli formula) [3] с включением этанола позволила вводить животным с пищей значительно большие количества этанола и получить развитие жировой дистрофии печени.

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует о необходимости разработки наиболее оптимальной модели формирования на животных ОАГ. В процессе подготовки данных рекомендаций авторами были определены сроки принудительной алкоголизации и дозы вводимого этанола. При этом учитывались особенности реакции на алкоголь использованного вида животных – белых крыс. В частности, сопоставлялась продолжительность их жизни с продолжительностью жизни человека, учитывались скорость метаболизма и анатомо-физиологические особенности печени и желчно-выделительной системы у этого вида животных. Отработка и оценка схем введения токсических агентов осуществлялась по двум направлениям, позволяющим моделировать формирование ОАГ у человека: многократное длительное введение этанола в прогрессивно увеличивающихся дозах и введение этанола на фоне преморбидной патологии печени, вызванной четырёххлористым углеродом [4]. Использование схемы с длительным введением этанола в увеличивающихся дозах позволяет моделировать ОАГ различной степени тяжести и оценивать лечебную эффективность новых лекарственных средств с учётом выраженности поражения печени. Схема с использованием предварительного введения четырёххлористого углерода создаёт возможность для формирования в короткий срок (8 дней) экспериментального ОАГ смешанного типа для проведения скрининговой оценки лекарственных средств для лечения данной патологии.

В настоящих методических рекомендациях подробно изложен порядок доклинической оценки эффективности лекарственных средств для лечения одного из наиболее опасных проявлений алкогольной болезни печени – ОАГ с использованием комплекса биохимических, иммунологических и патоморфологических показателей и приоритетных биомаркёров.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя
Федерального медико-биологического
агентства


М.Ф. Киселев

2013 г.



Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

Оценка лечебной эффективности новых лекарственных средств на экспериментальных моделях острых алкогольных гепатитов различной степени тяжести

Методические рекомендации

МР ФМБА России МР 12.11-13

1. Область применения

Настоящие методические рекомендации распространяются на доклинические исследования новых лекарственных средств для лечения острого алкогольного гепатита различной степени тяжести.

Рекомендации устанавливают порядок эффективности лекарственных средств на экспериментальных моделях острых алкогольных гепатитов различной степени и тяжести и на фоне преморбидной патологии печени с использованием комплекса биохимических, иммунологических и гистологических показателей.

Методические рекомендации предназначены для сотрудников экспериментальных отделов (лабораторий) научно-исследовательских учреждений ФМБА России, кафедры токсикологии и клинической фармакологии ФГБОУ «Институт повышения квалификации» ФМБА России, сотрудников экспериментальных лабораторий и кафедр других учреждений, занимающихся разработкой и внедрением новых лекарственных средств

Настоящие методические рекомендации не могут быть полностью или частично воспроизведены без разрешения федерального медико-биологического агентства (ФМБА России).

2. Нормативные ссылки

В настоящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики»;
- ГОСТ Р 53434 – 2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;
- ГОСТ Р 51652 – 2000 «Спирт этиловый ректифицированный из пищевого сырья. Технические условия»;
- Р ФМБА России 15.45 – 2010. Разработка, изложение, представление на согласование и утверждение нормативных и методических документов ФМБА России.

3. Обозначения и сокращения

ОАГ	–	острый алкогольный гепатит
АБП	–	алкогольная болезнь печени
ПКН	–	печеночно-клеточная недостаточность
ПЭ	–	печеночная энцефалопатия
ГРС	–	гепаторенальный синдром
GLP	–	добротная лабораторная практика
ПЭГ	–	полиэтиленгликоль
ГГТФ	–	гамма-глутамилтрансфераза
ЩФ	–	щелочная фосфатаза
в/ж		внутрижелудочно
АлАТ	–	аланинаминотрансфераза
АсАТ	–	аспартатаминотрансфераза
ПТВ	–	протромбиновое время
ЦИК	–	циркулирующие иммунные комплексы
TNF- α	–	фактор некроза опухоли- α
IL-1 α	–	интерлейкин-1 α
IL-1 β	–	интерлейкин-1 β
IL-4	–	интерлейкин-4
IL-6	–	интерлейкин-6
АОРР	–	уровень продуктов окисления белков

4. Описание метода

4.1. Материально-техническое обеспечение

4.1.1. Химические реактивы

Орто-ксилол чда

Парафин нефтяной твердый высокой степени очистки гидроочищенный

Воск базистый

Эозин Н индикатор чда

Гематоксилин чда

Спирт изопропиловый химический чистый 96%

Формалин в/с

ПЭГ-6000

Борная кислота хч/чда

Na-тетраборнокислый хч/чда

Спирт этиловый ректификованный 96% ГОСТ Р 51652-2000

Гепарин (натриевая соль) 202 ед./мг

Нейтральный формалин, 9% раствор

Хлороформ чда

Карбол-ксилол

Йодида калия, 20% раствор

Ледяная уксусная кислота, хч

1,2 дихлорэтан, технический

Фосфатно-солевой буферный раствор,

0,1 М боратный буферный раствор (рН=8,4):

Наборы фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Санкт-Петербург, Россия) [5].

4.1.2. Материалы

Автоматические дозаторы переменного объема (50, 100 мкл)

Автоматический дозатор на 1000 мкл

Посуда мерная ГОСТ 1770-74

Набор ИФА TNF- α (Bender MS, Австрия)*

Набор ИФА IL-1 α (Bender MS, Австрия)*

Набор ИФА IL-1 β (Bender MS, Австрия)*

Набор ИФА IL-4 (Bender MS, Австрия)*

Набор ИФА IL-6 (Bender MS, Австрия)*

Предметные стекла Menzel AA 102 E (76 x 26 X 1,1мм)

Покровные стекла 24 x 32 мм

Планшеты для хранения гистологических препаратов

4.1.3. Приборы

Весы лабораторные 600 × 0,1г

Весы аналитические предел взвешивания 160-220 г.

Лабораторный инкубатор GL2 - 2 (Shellab, США)*

Спектрофотометр Synergy2 (Bio Tek, США)*

Автоматический промыватель EL_x 50 (BioTeK, США)*

Микротом санный МС-2, толщина срезов от 4 мкм

Микроскоп биологический «Биолам-70»,увеличение 56-1350 кратн. Диапазон фокусировки 40 мм

Тромбоэластограф «Тромбостат-2», Германия¹

4.1.4. Лекарственные препараты и растворы

Эссенциале Н

Адеметионин (гептрал)

Ректификованный этиловый спирт вводится в виде 40% раствора. Объем вводимого спирта (V) в соответствии с необходимой дозой (D) с учетом массы тела животного (M), объемной концентрацией спирта (C) и плотности абсолютного (100%) этилового спирта 0,789 г/см³) [6] определяется по формуле 1 [7]:

$$V \text{ мл} = D(\text{г/кг}) \times M(\text{г}) / C\% \times 10 \times 0.789. \quad (1)$$

4.1.5. Животные и их содержание

Эксперименты выполняются на белых беспородных крысах-самцах массой 160–180 г, возраст 13–14 недель. Партии корма: может использоваться любой лицензированный комбикорм для крыс любого аккредитованного на этот вид деятельности кормокомбината.

Работа с лабораторными животными организуется в соответствии с нормативными документами: Приказом от 23 августа 2010 г. № 708н Минздравсоцразвития России об утверждении «Правил лабораторной практики», соответствующими утверждёнными процедурами и положением по биоэтике организации, проводящей исследование.

Предварительно животных выдерживают в течении 14 дней в отдельном карантинном помещении. В этот период проводится ежедневный осмотр каждого животного (оценивается поведение и общее состояние), дважды в день животные наблюдаются в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования крысы, отвечающие критериям включения в исследование, распределяются на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям включения в исследование, исключаются из исследования в течение карантина.

¹ Могут быть использованы аналогичные наборы реактивов и приборы других фирм.

Клетки с крысами помещаются в отдельные комнаты. Световой режим: 12 часов – свет, 12 часов – темнота. Температура воздуха поддерживается в пределах 20-22° С, относительная влажность – 50-70%. Ежедневно регистрируются температура и влажность воздуха с оформлением записи в специальных тетрадах. Устанавливается режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO₂ не более 0,15 объемных %, аммиака – не более 0,001 мг/л.

Проводится ежедневный осмотр животного в течение исследования, включающий в себя оценку общего поведения и общего состояния крыс. В дни введения исследуемых растворов осмотр проводится примерно через 2 часа после введения. Результаты осмотра заносятся в лабораторные карты. Непосредственно после введения препаратов и в конце дня проводится повторный осмотр животных в клетках. Данные осмотра регистрируются в лабораторных журналах.

4.1.6. Регистрируемые показатели

Регистрируемыми показателями, характеризующими наличие ОАГ являются:

- повышение активности трансаминаз;
- увеличение активности ГГТФ и ЩФ;
- повышение уровня общего сывороточного билирубина и креатинина;
- увеличение содержания ЦИК;
- изменение уровня провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 α , IL-1 β .

При характеристике гистологических изменений в печени исходят из интенсивности ожирения, величины жировых капель, выраженности воспалительных и склеротических изменений в портальных трактах.

Жировую дистрофию, склеротические и воспалительные изменения в печени экспериментальных животных классифицируют по степеням в соответствии с их выраженностью [8].

Таким образом, сочетание наиболее значимых биохимических, иммунологических и гистологических показателей следует учитывать как важный фактор при экспериментальном обоснования алгоритма диагностики ОАГ.

Перечень рекомендуемых методов исследования в приложении А.

4.2. Порядок оценки эффективности лекарственных средств на экспериментальной модели алкогольного гепатита различной степени тяжести

Предварительным этапом оценки эффективности лекарственных препаратов является формирование у животного соответствующей патологии, в данном случае экспериментального алкогольного гепатита.

С этой целью осуществляется ежедневное в/ж введение 40% раствора этилового спирта в увеличивающихся дозах: 5 г/кг в течение 4-х недель (1-й этап алкоголизации), 7 г/кг – 3 недели (2-

й этап алкоголизации), 10 г/кг – 3 недели (3-й этап алкоголизации). В конце каждого срока введения у части животных проводится оценка изменения биохимических, иммунологических и гистологических показателей. При использовании данной схемы моделирования ОАГ на втором этапе алкоголизации формируется ОАГ лёгкой, а на третьем – средней степени тяжести. Продолжительность формирования ОАГ лёгкой степени составляет 7 недель, средней степени – 10 недель. Алгоритм введения ректификованного этилового спирта для формирования ОАГ представлен на рисунках 1 и 2.

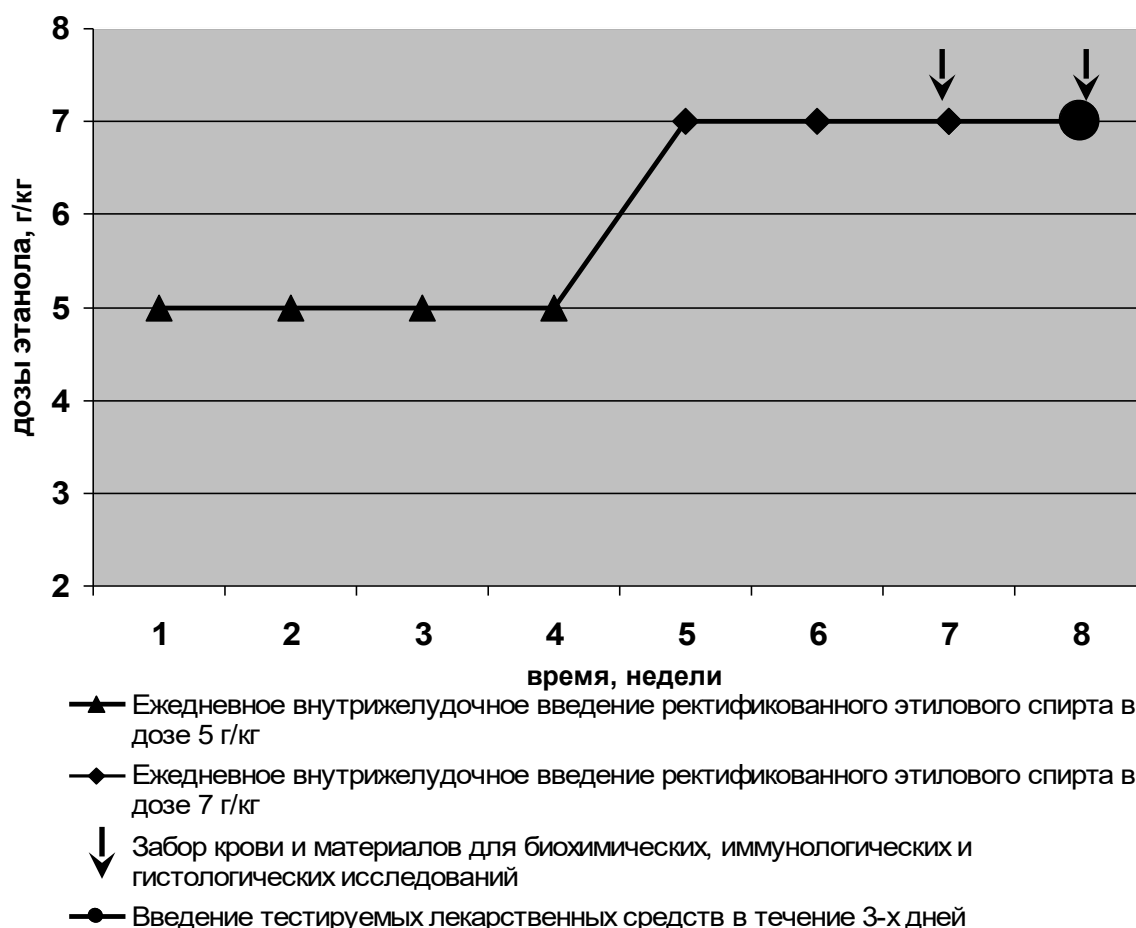


Рисунок 1 – Схема введения ректификованного этилового спирта при формировании острого алкогольного гепатита лёгкой степени тяжести у крыс и порядок введения тестируемых лекарственных средств

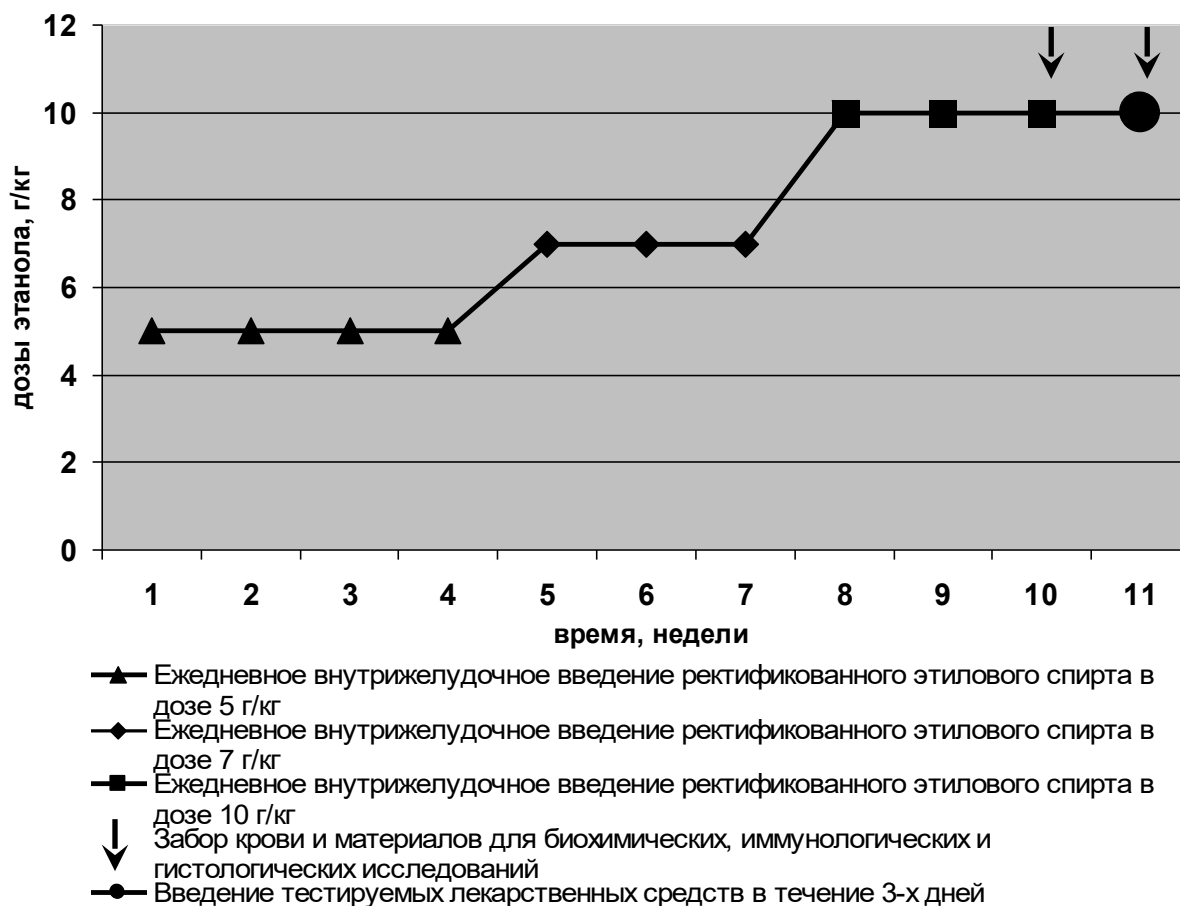


Рисунок 2 – Схема введения ректификованного этилового спирта при формировании острого алкогольного гепатита средней степени тяжести у крыс и порядок введения тестируемых лекарственных средств

Исследуемые гепатопротекторы вводят по завершении второго и третьего этапа алкоголизации. Это позволяет оценить эффективность препаратов при развитии ОАГ лёгкой и средней степени тяжести.

Таким образом, при проведении исследования формируются следующие группы животных:

1-я группа – интактные животные, не получавшие ректификованного этилового спирта в течение 7 недель;

2-я группа – контрольные животные, получавшие ректификованный этиловый спирт последовательно в дозе 5г/кг и 7г/кг в течение 4, 3 недель, соответственно;

3-я группа – опытные животные, получавшие ректификованный этиловый спирт последовательно в дозе 5г/кг и 7г/кг в течение 4 и 3 недель, соответственно, и леченые исследуемым лекарственным средством в течение 3-х суток;

4-я группа – интактные животные, не получавшие ректифицированного этилового спирта в течение 10 недель;

5-я группа – нелеченые животные, получавшие ректифицированный этиловый спирт последовательно в дозе 5 г/кг, 7 г/кг и 10 г/кг в течение 4, 3 и 3 недель, соответственно;

6-я группа – животные, получавшие ректифицированный этиловый спирт последовательно в дозе 5 г/кг, 7 г/кг и 10 г/кг в течение 4, 3 и 3 недель, соответственно и леченые исследуемым лекарственным средством в течение 3-х суток.

Животным с ОАГ вводятся исследуемые лекарственные средства. По окончании введения проводятся биохимические, иммунологические исследования сыворотки крови и гистологические исследования печени.

На основании сопоставления результатов оценки исследуемых показателей у животных, подвергнутых алкоголизации (группы 2 и 5) и животных, получивших лечение (группы 3 и 6), делается заключение об эффективности исследуемого препарата как гепатопротектора при алкогольном гепатите легкой и/или средней степени тяжести. Достоверные различия показателей, полученных у леченых животных, по сравнению с показателями, полученными у алкоголизированных нелеченых животных свидетельствуют об эффективности исследуемых лекарственных средств.

4.3. Порядок скрининговой оценки эффективности лекарственных средств на экспериментальной модели алкогольного гепатита с преморбидной патологией печени

В качестве скрининговой модели ОАГ смешанного типа предлагается введение ректифицированного этилового спирта крысам с поражением печени, вызванным предварительным введением четыреххлористого углерода (CCl_4), поскольку известно, что ОАГ может развиваться на фоне гепатопатии неалкогольной этиологии [9]. Преморбидный фон создается в/ж введением CCl_4 в виде 50% раствора в растительном масле из расчета 1мл/кг массы тела. Оставшимся в живых крысам на 3-и сутки вводят ректифицированный этиловый спирт в виде 40% раствора в дозах 7 г/кг – 3 дня, 10 г/кг – однократно, после чего через двое суток проводят эвтаназию животных и производят забор крови с последующей регистрацией биохимических, иммунологических и гистологических показателей. Продолжительность формирования ОАГ составляет 8 дней. Алгоритм введения ректифицированного этилового спирта для формирования ОАГ представлен на рисунке 3.

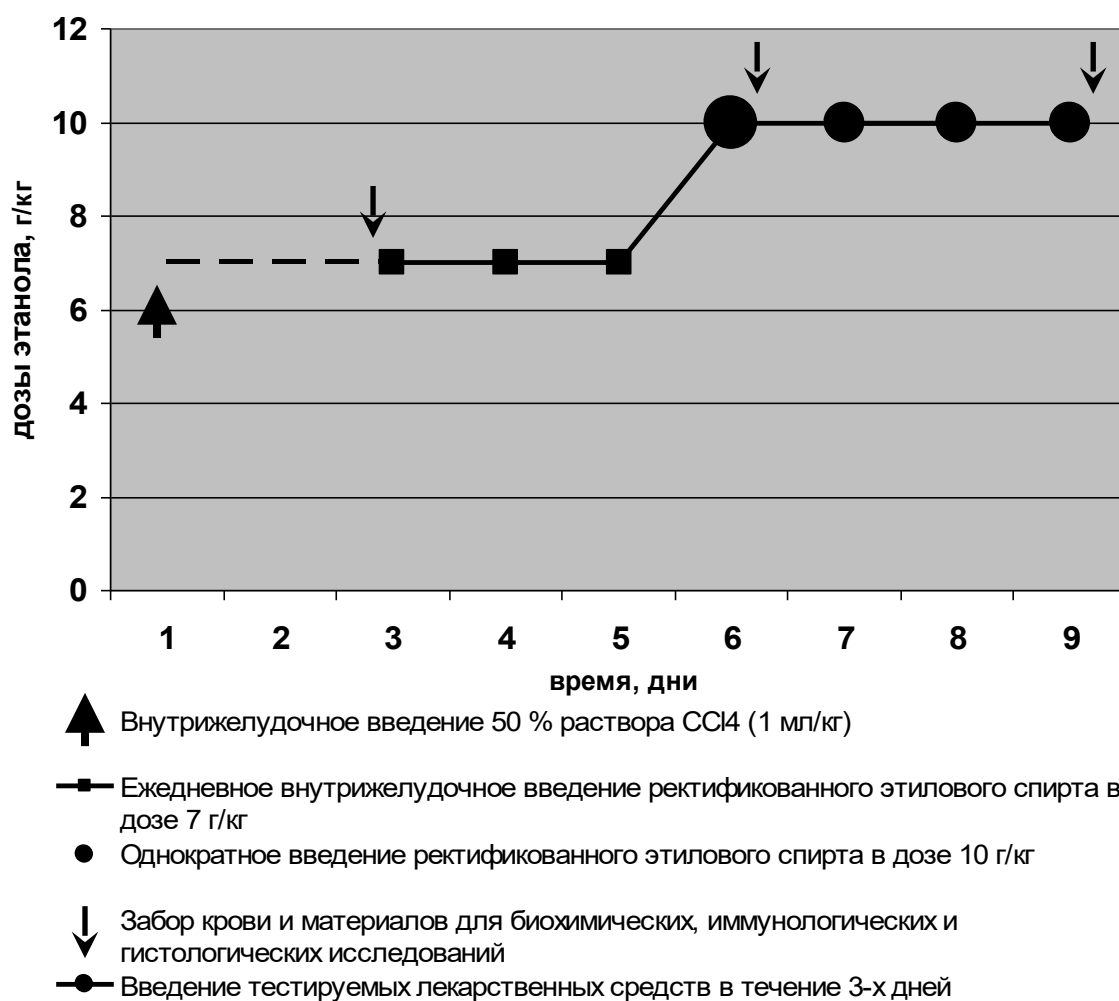


Рисунок 3 – Схема введения ректификованного этилового спирта при формировании острого алкогольного гепатита у крыс в условиях предварительного токсического поражения печени CCl₄ и порядок введения тестируемых лекарственных средств

При использовании этой модели формируются следующие группы животных:

1-я группа – контрольные интактные животные, не получавшие CCl₄ и ректификованного этилового спирта в течение 8 дней;

2-я группа – контрольные животные, получавшие CCl₄;

3-я группа – опытные нелеченые животные, получавшие ректификованный этиловый спирт последовательно в дозе 7 г/кг в течение 3 дней и 10г/кг однократно на фоне предварительного введения CCl₄;

4-я группа – опытные животные, получавшие этиловый спирт последовательно в дозе 7г/кг в течение 3 дней 10 г/кг однократно фоне предварительного введения CCl₄ и леченые введением исследуемым лекарственным средством в течение 3-х суток.

Крысам с ОАГ по окончании введения исследуемого лекарственного средства проводят биохимические, иммунологические исследования сыворотки крови и гистологические исследования печени на наличие жирового стеатоза, воспалительных и склеротических изменений. Перечень рекомендуемых методов соответствующих исследований приведен в приложении А.

На основании сопоставления результатов оценки исследуемых показателей у животных, подвергнутых алкоголизации (группы 2 и 5) и животных, получивших лечение (группы 3 и 4), делается заключение об эффективности исследуемого препарата как гепатопротектора при алкогольных гепатитах смешанного типа.

Достоверные различия показателей, полученных у леченых животных, по сравнению с показателями, полученными у алкоголизированных нелеченых животных свидетельствуют об эффективности исследуемых лекарственных средств.

5. Эффективность использования метода

Эффективность использования метода демонстрируется динамикой изменения биохимических, иммунологических и гистологических показателей у леченых животных в сравнении с нелечеными. Статистическая обработка полученных данных проводится по методу Стьюдента с использованием t-критерия.

В таблицах 1-3 представлены данные, демонстрирующие эффективность двух гепатопротекторов эссенциале Н и гептрала (ММН: адеметионин) на рекомендуемой экспериментальной модели ОАГ легкой степени тяжести. Показано, что в/в введение эссенциале Н в дозе 150 мг/кг и гептрала в дозе 300 мг/кг животным с лёгкой степенью ОАГ приводит к нормализации нарушенных биохимических и иммунологических показателей, а также уменьшению выраженности стеатоза, склеротических и воспалительных проявлений.

Таблица 1 – Влияние эссенциале Н и гептрала на биохимические показатели ОАГ легкой степени тяжести

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы			
	Интактные животные (n=6)	Нелеченые животные (n=6)	Леченые эссенциале (n=6)	Леченые гептралом (n=6)
АлАТ, МЕ/л	28,19±3,14	51,53±6,76*	40,65±4,02*	29,39±4,21**
АсАТ, МЕ/л	59,82±4,88	114,25±13,17*	85,44±8,29*	88,07±5,87*
ГТФ, МЕ/л	7,74±2,10	17,90±2,22*	17,86±3,53*	14,42±2,33*
ЩФ, Ед/л	254,1±35,5	293,5±22,6	228,8±27,1	299,1±42,6
Билирубин, мкмоль/л	8,14±1,14	10,39±1,63	10,21±2,44	8,56±0,67
ПТВ, сек	29,60±1,36	33,34±2,80	32,16±2,37	33,56±3,95
Креатинин, мкмоль/л	37,00±6,32	49,34±3,76	39,00±5,91	36,01±9,54
Мочевина, ммоль/л	4,69±0,44	4,82±0,34	4,25±0,41	4,03±0,20
АОРР, мкмоль/л	115,08±8,23	188,04±29,73*	131,16±12,14**	109,31±6,88**
Примечания				
1 * – Отличия существенны по сравнению с интактными крысами при p<0,05				
2 ** – Отличия существенны по сравнению с нелечеными крысами при p<0,05				

Таблица 2 – Влияние эссенциале Н и гептрала на иммунологические показатели ОАГ легкой степени тяжести

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы			
	Интактные животные (n=6)	Нелеченные животные (n=6)	Леченные эссенциале (n=6)	Леченные гептралом (n=6)
ЦИК высокомолекулярные, у.ед.	14,0±2,5	23,6±8,8	8,4±2,0	14,4±6,6
ЦИК среднемолекулярные, у.ед.	35,6±6,2	65,4±17,9	25,2±4,6	45,2±9,0
ЦИК низкомолекулярные, у.ед.	72,0±6,2	114,8±16,9*	81,0±8,5	91,6±13,1
TNF- α , пг/мл	9,5±2,2	24,4±3,3*	14,3±0,3	19,2±7,4
IL-1 α , пг/мл	15,5±6,4	36,9±7,5*	20,2±2,2	10,5±3,5
IL-4, пг/мл	0	0	0	0
IL-6, пг/мл	0	0	0	0
Примечание –* – Отличия существенны по сравнению с интактными крысами при p<0,05				

Таблица 3 – Влияние эссенциале Н и гептрала на гистологические показатели ОАГ легкой степени тяжести

Экспериментальные группы	Жировая дистрофия	Склеротические изменения	Воспалительные изменения
Интактные крысы	0	0	0
Спирт этил. рект. 5 г/кг + 7 г/кг (всего 7 недель)	III	I-II	II
Спирт этил. рект. 5 г/кг + 7 г/кг + эссенциале Н	II	I	I
Спирт этил. рект. 5 г/кг + 7 г/кг + гептрал	II	I	I

Данные таблиц 4-6 демонстрируют положительный эффект исследуемых гепатопротекторов на симптомы ОАГ средней степени тяжести. В контроле достоверно возрастает активность всех печеночных ферментов, билирубина и креатинина, АОРР, увеличивается протромбиновое время, что свидетельствует о развитии печеночной недостаточности со снижением белковосинтетической и детоксикационной функции печени. Эссенциале благотворно влияет на активность только АлАТ, что выражает снижение синдрома цитолиза. Гептрал по сравнению с нелечеными животными в большей мере, чем эссенциале Н нормализует показатели: уменьшает цитолиз гепа-

тоцитов и холестаза, уменьшает степень накопления окисленных белков АОРР в крови крыс, т.е. проявляет антиоксидантное действие.

Таблица 4 – Влияние эссенциале Н и гептрала на биохимические показатели ОАГ средней степени тяжести

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы			
	Интактные животные (n=6)	Нелеченые животные (n=6)	Леченые эссенциале Н (n=6)	Леченые гептралом (n=6)
АлАТ, МЕ/л	23,63±3,20	61,00±9,65*	44,64±2,99*/**	39,58±4,58*/**
АсАТ, МЕ/л	66,36±6,90	269,81±14,69*	137,39±13,87*	101,28±12,44*/**
ГТФ, МЕ/л	6,89±2,24	18,71±1,23*	15,82±1,48*	15,04±2,36*
ЩФ, Ед/л	290,4±14,4	463,9±77,7*	429,8±67,7*	342,0±33,4
Билирубин, мк-моль/л	8,12±0,82	17,56±1,33*	17,28±1,67*	16,25±0,81*
ПТВ, сек	28,20±1,16	43,34±6,57*	31,96±2,78	32,40±3,91
Креатинин, мк-моль/л	27,16±7,17	50,92±9,43*	45,86±2,82*	42,48±6,16*
Мочевина, ммоль/л	4,67±0,32	4,98±0,30	4,62±0,52	4,68±0,44
АОРР, мкмоль/л	111,89±9,89	191,92±24,15*	175,09±18,65*	153,71±13,19*/**
Примечания				
1 * – отличия существенны по сравнению с интактными крысами при $p < 0,05$				
2 ** – отличия существенны по сравнению с нелечеными крысами при $p \leq 0,05$				

Таблица 5 – Влияние эссенциале Н и гептрала на иммунологические показатели ОАГ средней степени тяжести

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы			
	Интактные животные (n=6)	Нелеченые животные (n=6)	Леченые эссенциале Н (n=6)	Леченые гептралом (n=6)
1	2	3	4	5
ЦИК высокомолекулярные, у.ед.	13,2±3,4	24,6±9,7	8,2±3,3	16,3±5,2
ЦИК среднемолекулярные, у.ед.	36,2±13,1	64,2±15,0	26,8±12,0	25,8±5,6
ЦИК низкомолекулярные, у.ед.	67,2±8,0	142,8±26,8*	61,4±12,0	121,8±28,3
TNF- α , пг/мл	9,5±2,2	20,4±4,0*	6,8±3,9	12,4±5,4
IL-1 α , пг/мл	15,5±6,4	5,2±2,4*	20,9±9,5	32,7±7,8

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5
IL-1 β , пг/мл	6,0 \pm 1,2	0,9 \pm 0,4*	8,2 \pm 5,6	13,4 \pm 4,0
IL-4, пг/мл	0	0	0	0
IL-6, пг/мл	0	0	0	0

Примечания –* – Отличия существенны по сравнению с интактными крысами при $p < 0,05$

Таблица 6 – Влияние эссенциале Н и гептрала на гистологические показатели ОАГ средней степени тяжести

Экспериментальные группы	Жировая дистрофия	Склеротические изменения	Воспалительные изменения
Интактные крысы	0	0	0
Спирт этил. рект.	II	I-II	I
Спирт этил. рект. 5+7+10 г/кг (без лечения)	II	III	III
Спирт этил. рект. 5+7+10 г/кг + эссенциале Н	I	II-III	II
Спирт этил. рект. 5+7+10 г/кг + гептрал	I	II-III	II

Эффективность лекарственных средств на экспериментальной модели алкогольного гепатита с преморбидной патологией печени.

Представленные в таблицах 7-9 данные показывают, что исследуемые гепатопротекторы оказывают позитивное действие в отношении симптомов ОАГ, развившегося на фоне предварительно вызванной патологии печени неалкогольной этиологии. На основании полученных данных можно сделать вывод не только об эффективности гепатопротекторов при ОАГ, но и о предполагаемом механизме их действия, возможности использования их для купирования разных форм ОАГ и вероятности развития побочных эффектов. Например, CCl_4 обладает не только гепато- но и нефротоксическим действием, что приводит к снижению скорости клубочковой фильтрации и нарастанию уровня креатинина и мочевины. При этом введение эссенциале Н способствовало снижению выраженности нарушения функции почек, предотвратило переход фазы печеночной недостаточности в синдром полиорганной недостаточности. Напротив, введение гептрала вызывало увеличение концентрации мочевины в крови, что может свидетельствовать об ухудшении функции почек (таблица 7). Это может быть обусловлено образованием связи метаболитов этанола и CCl_4 с гептралом и усилением в связи с этим нефротоксичности.

Таблица 7 – Влияние эссенциале Н и гептрала на биохимические показатели ОАГ смешанного типа

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы					
	Интактные животные (n=6)	CCl ₄ (n=6)	CCl ₄ + спирт (до лечения) (n=6)	CCl ₄ + спирт (на начала лечения) (n=6)	Леченые эссенциале Н (n=6)	Леченые гептралом (n=6)
АлАТ, МЕ/л	31,73 ±2,97	19,62 ±7,64	27,72 ±5,33	17,6 ±2,22	32,34 ±7,47	21,94 ±1,04
АсАТ, МЕ/л	96,97 ±14,32	187,43 ±10,66*	138,05 ±9,46*	164,15 ±13,35*	117,8 ±20,16	122,12 ±15,8
ГТФ, МЕ/л	10,56 ±2,94	18,64 ±1,5*	17,19 ±1,32*	25,36 ±2,04*	13,6 ±1,93**	15,32 ±1,03**
ЩФ, Ед/л	219,8 ±25,1	303,8 ±39,2*	288,9 ±50,0	312,5 ±28,9*	344,1 ±38,6*	236,4 ±20,2**
Билирубин, мкмоль/л	8,24 ±1,11	26,82 ±4,13*	50,86 ±19,62*	25,71 ±4,12*	8,37 ±0,52**	8,57 ±0,21**
ПТВ, сек	31,20 ±1,28	40,00 ±2,44*	45,40 ±3,31*	40,80 ±2,60*	33,80 ±3,33**	35,40 ±4,40**
Креатинин, мкмоль/л	56,2 ±6,09	137,4 ±16,3*	139,2 ±16,1*	236,8 ±45,4*	101,6 ±12,7*/**	214,6 ±35,2*
Мочевина, ммоль/л	6,35 ±1,31	10,31 ±1,34*	7,16 ±1,34	9,9 ±1,07*	7,31 ±1,06	22,44 ±6,89*/**
АОРР, мкмоль/л	91,92 ±18,00	298,53 ±44,71*	553,11 ±135,27*	187,75 ±41,63*	58,47 ±11,73**	61,62 ±6,90**
Примечания						
1 * – Отличия существенны по сравнению с интактными крысами при p<0,05						
2 ** – Отличия существенны по сравнению с нелечеными крысами при p<0,05						

Таблица 8 – Влияние эссенциале Н и гептрала на иммунологические показатели ОАГ смешанного типа

Регистрируемые показатели	Экспериментальные группы					
	Интактные животные (n=6)	CCl ₄ (n=6)	CCl ₄ +спирт до лечения (n=6)	CCl ₄ + спирт (на начало лечения) (n=6)	Леченые эссенциале Н (n=6)	Леченые гептралом (n=6)
ЦИК высокомолекулярные, у.ед.	25,1 ±7,8	17,6 ±2,3	19,6 ±7,0	11,6 ±3,4	11,0 ±4,2	16,3 ±5,2
ЦИК среднемолекулярные, у.ед.	55,1 ±10,9	67,8 ±24,1	45,6 ±17,0	41,0 ±3,1	38,0 ±12,6	40,4 ±7,5
ЦИК низкомолекулярные, у.ед.	109,8 ±16,7	224,6 ±38,7*	191,6 ±26,0*	192,4 ±25,3*	136,0 ±19,2	121,8 ±28,3
TNF-α, пг/мл	9,5 ±2,2	4,5 ±2,2	7,5 ±3,0	5,4 ±2,5	11,3 ±3,3	25,3 ±11,3
IL-1α, пг/мл	15,5 ±6,4	28,1 ±8,2	19,7 ±5,2	18,5 ±5,4	52,1 ±26,3	82,3 ±25,4
IL-1β, пг/мл	6,0 ±1,2	12,6 ±6,1	8,3 ±7,3	14,6 ±9,9	20,0 ±12,3	51,3 ±21,2
IL-4, пг/мл	0	0	0	0	0	0
IL-6, пг/мл	0	0	0	0	0	0

Примечание –* – Различия существенны по сравнению с интактными животными, p<0,05

Таблица 9 – Влияние эссенциале Н и гептрала гистологические показатели ОАГ смешанного типа

Экспериментальные группы	Жировая дистрофия	Склеротические изменения	Воспалительные изменения
Интактные животные	0	0	0
CCl ₄ +спирт этил. рект. 7г/кг	II-III	I	I
Контроль CCl ₄ +спирт этил. рект. 7г/кг + 10 г/кг (без лечения)	II	I	I
CCl ₄ +спирт этил. рект. 7г/кг + 10 г/кг + эссенциале Н	I	I	I
CCl ₄ +спирт этил. рект. 7г/кг + 10 г/кг + гептрал	0	0	I

Приложение А

(обязательное)

Методы проведения биохимических,**иммунологических и гистологических исследований**

А 1 Количественное определение TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6 в исследуемых образцах сыворотки крови крыс проводят методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора фирмы Bender MS (Австрия).

А 2 Определение биохимических показателей проводят с помощью унифицированного метода лабораторной диагностики и наборов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Санкт-Петербург, Россия) [5]:

– активность аланин-, аспаратаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы и щелочной фосфатазы определяют оптимизированными кинетическими методами;

– уровень креатинина определяют по псевдокинетической реакции Яффе;

– уровень мочевины – уреазным фенол-гипохлоритным методом, концентрацию билирубина – методом Уолтерса-Джерарда в сыворотке крови. Для проведения измерения рекомендуется мультифункциональный фотометр «Synergy-2» фирмы BioTek Instr. Inc. (США);

– протромбиновое время в цитратной плазме определяют с помощью набора Техпластин (Россия) по остановке вращения якоря в кювете тромбоэластографа «Тромбостат-2» (Германия) [10];

– уровень продуктов окисления белков (АОРР) определяют спектрофотометрически [11].

А 3 Гистологические препараты готовят по стандартной методике [12].

Таким образом, использование предлагаемых экспериментальных моделей ОАГ, адекватность которых показана на примере широко используемых в клинической практике гепатопротекторов гептрала и эссенциале, позволит проводить доклиническую оценку специфической активности новых препаратов. Использование первой модели, основанной на длительном введении увеличивающихся доз ректифицированного 40% спирта, предпочтительно применять для оценки эффективности препаратов для лечения ОАГ разной степени тяжести. Модель, основанная на введении этанола на фоне токсического поражения CCl_4 печени является скрининговой, позволяющей в короткий срок дать оценку эффективности исследуемого препарата для лечения ОАГ.

Библиография

- [1] Augustyniak A., Waszkiewicz E., Skrzydlewska E. Preventive action of green tea from changes in the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol // *Nutricion.* – 2005. – № 21. – P. 925 - 932.
- [2] Ashmead H. De Wayne, Graff Darrel J. Decreasing Ethanol Consumption in Ethanol-Dependent Rats through Supplementation of Zinc and Copper Amino Acid Chelates: A Preliminary Study // *The J. of App. Res.* – 2006. – Vol. 6. – № 1.
- [3] Lieber C.S., DeCarli L.M. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptive properties in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1970. – Vol. 245 – P. 250512.
- [4] Обоснование методов диагностики и лечения алкогольных поражений печени в зависимости от стадии и тяжести патологического процесса (клинико-экспериментальное исследование). Отчёт НИР: шифр «Стандарт»,/НИИ ИТ.; рук. Е.Ю. Бонитенко; отв.исполн. В.А.Баринов - СПб., – 2011. – Инв. № 420.
- [5] Медицинские лабораторные технологии: справочник / под ред. проф. А.И. Карпищенко.- СПб.: Интермедика, 2002. – 600 с.
- [6] Рабинович В.А., Хавин З.Я. Краткий химический справочник.- 2-е изд., испр. и доп.- Л.: Химия. – 1978. – С. 280.
- [7] Комплексная токсикологическая оценка безопасности рецептур алкогольных напитков // Методические рекомендации. 11-5/220-09 от 26.09.2002.- СПб. – 2002.
- [8] Подымова С.Д. Болезни печени: руководство для врачей. 3-е изд. М.Медицина – 1998. – 703 с.
- [9] Пронько П.С. Хомич Т.И., Бардина Л.Р., Сатановская В.И., Лис Р.Е. Влияние природных биологически активных соединений на поражение печени, вызванное этанолом и четыреххлористым углеродом // Материалы международной научной конференции, посвященной 80-летию Национальной Академии наук Беларуси «Молекулярная и биохимическая фармакология» г. Гродно, 23–26 сентября 2008: - ГрГУ им. Я. Купалы. – 2008. – С. 72 – 73.
- [10] Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная аналитика. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. М: Лабинформ-РАМЛД. – 1999. –Том 2 - 352 с.
- [11] Witko-Sarsat V., Friedlander M., Khoa T.N. et al. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte activation in chronic Renal Failure // *J. of Immun.* – 1998. – Vol. 161. – P. 2524 - 2532.
- [12] Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники 3-е изд. исправлено и доп. М.: Медгиз, 1996.-263с.

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное медико-биологическое агентство

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

(ФГБУН ИТ ФМБА России)

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

Оценка лечебной эффективности новых лекарственных средств на экспериментальных моделях алкогольного гепатита различной степени тяжести

Методические рекомендации

ФМБА России МР.12. -2011

Директор Института, д.м.н.

Е.Ю. Бонитенко

Заведующий лабораторией №7, д.м.н., профессор

А.Н. Петров

Ученый секретарь

И.А. Шабунова

Главный метролог

И.В. Александрова

Исполнители:

Научный руководитель – заведующий лабораторией, д.м.н, профессор

А.Н. Петров

Ответственный исполнитель – ведущий научный сотрудник, к.м.н., ведущий научный сотрудник

М.К. Шевчук