

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА

Новгородская Я.И.

Гродненский государственный медицинский университет,
научно-исследовательская лаборатория, г. Гродно

Ключевые слова: печень, метотрексат, крысы.

Резюме: введение метотрексата (MTX) в дозе 0,1 мг/кг через день в течение 7 и 21 сут инициирует ряд обратимых однонаправленных морфологических изменений в печени крыс. В обоих случаях он вызывал умеренную внутридольковую инфильтрацию паренхимы печени клетками воспалительного ряда, с минимальной степенью лимфогистиоцитарной инфильтрации портальных трактов, стимулировал белоксинтетическую активность в гепатоцитах и активность макрофагальной системы.

Resume: the introduction of methotrexate (MTX) at adose 0,1 mg/kg every other day for 7 and 21 days daily initiates a number of reversible unidirectional morphological changes in the rat liver. In both cases, MTX caused moderate intralobular infiltration of the liver parenchyma with inflammatory cells, with a minimal degree of lymphohistiocytic infiltration of the portal tracts, stimulated protein synthesis activity in hepatocytes and the activity of the macrophage system.

Актуальность. Метотрексат (MTX) – антиметаболит фолиевой кислоты, активно используется для лечения злокачественных заболеваний, псориаза, ревматоидного артрита и различных воспалительных заболеваний. Однако длительное его использование оказывает цитотоксический эффект. Избыточное образование реактивных форм кислорода и азота, истощение глутатиона, увеличение уровня малонового диальдегида и активности миелопероксидазы, аспартат- и аланинаминотрансферазы способствуют развитию гепатотоксичности [1, 2].

Цель: изучить структуру печени крыс после ингибирования фолатного цикла метотрексатом.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на 24 крысах-самцах массой 220-240 г в соответствии с нормами и правилами биоэтического обращения с подопытными животными (приказ Минздрава РБ № 274 от 17.04.2006 г). На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол №1 от 30.01.2018). Животные получены из вивария Гродненского государственного медицинского университета и содержались в стандартных условиях.

Ингибирование фолатного цикла моделировали путем внутрибрюшинного введения MTX в дозе 0,1 мг/кг [3] через день в течение 7 и 21 сут. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество 0,9% раствора хлорида натрия. Для гистологического исследования кусочки печени фиксировали в 10% забуференном растворе формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином по Маллори. Для электронно-микроскопического исследования образцы печени от 3 опытных и 3 контрольных животных фиксировали 1% раствором тетрагидроксиосмия на 0,1 М буфере Миллонига, рН

7,4, при + 4⁰С в течение 2 часов и заливали в аралдитную смолу. Из полученных блоков получали ультратонкие срезы, которые контрастировали 2% раствором уранилацетата в 50% метаноле и цитратом свинца по E.S. Reynolds [4].

Результаты и их обсуждение. Гистоархитектоника печени, при введении МТХ через день в течение 7 сут, в целом имела строение, аналогичное печени контрольных животных. Отмечалась умеренно выраженная диссеминированная внутريدольковая инфильтрация лейкоцитарно-макрофагальными элементами (рис. 1Б). У 60% животных отмечен цитостатический эффект. МТХ стимулировал активность макрофагальной системы. На ультраструктурном уровне печень опытных животных отличалась морфологическими признаками, свидетельствующими о высоком уровне ее биосинтетического и энергетического потенциала. Так, в гепатоцитах регистрировалась хорошо развитая гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), которая местами характеризовалась концентрическим расположением цистерн в виде замкнутых колец (рис. 2А). Подобное явление наблюдалось и при гипергомоцистеинемии [5]. Предполагают, что наблюдаемое структурное преобразование ГрЭС является одним из морфологических проявлений стресса эндоплазматической сети, что было показано путем определения его биохимических маркеров при гипергомоцистеинемии [6]. Известно, что наиболее чувствительны к такому виду стресса белок-продуцирующие клетки, к которым относят и гепатоциты [7]. При нарушениях клеточного гомеостаза белки накапливаются в эндоплазматическом ретикулуме [8].

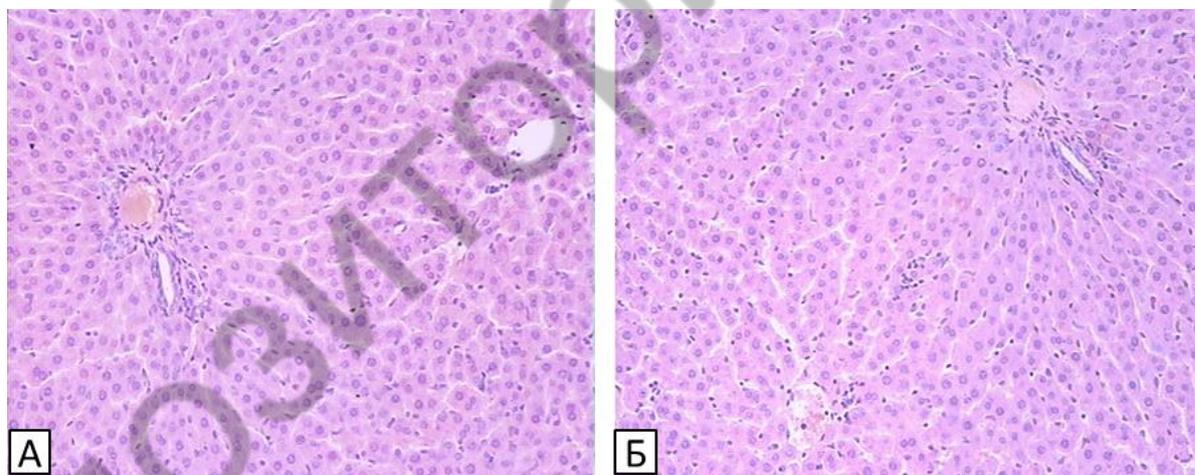


Рис. 1 – Морфологические особенности печени при введении МТХ через день в течение 7 сут
А – контроль. Слева – портальный тракт, справа – центральная вена. ×100; Б – опыт (МТХ через день в течение 7 сут). Справа сверху – портальный тракт с минимальным содержанием лимфогистиоцитарных элементов. Умеренно выраженная диссеминированная внутريدольковая инфильтрация клетками воспалительного ряда. ×100

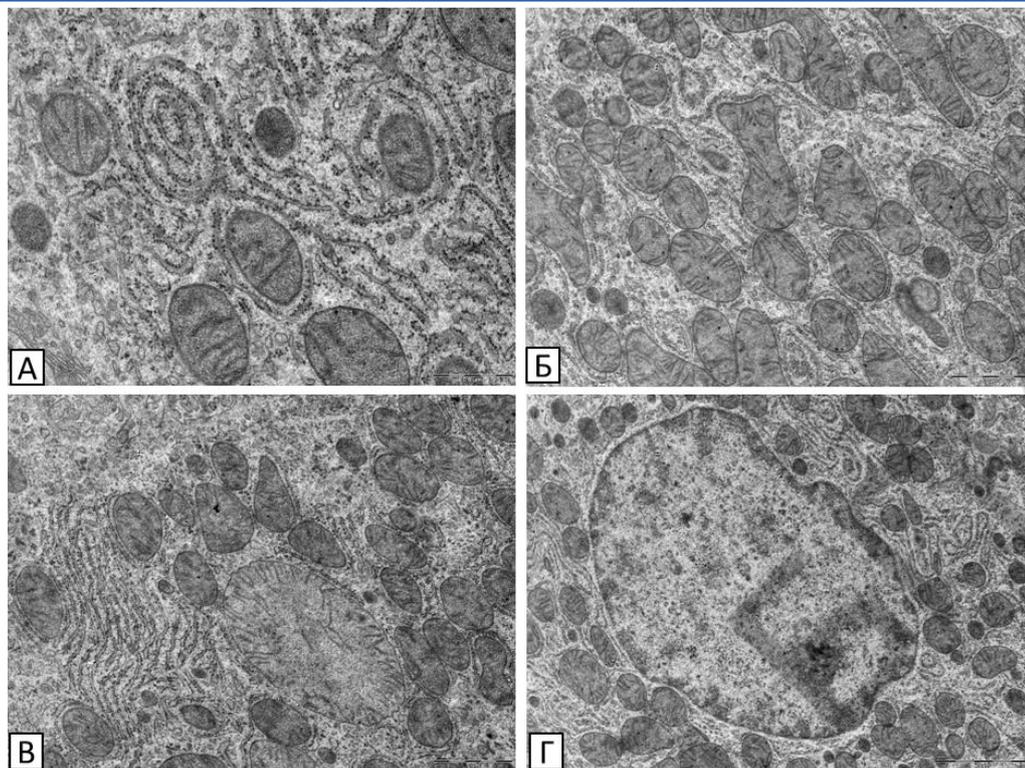


Рис. 2 – Ультраструктурные особенности ГрЭС, митохондрий и ядра в гепатоцитах при введении МТХ через день в течение 7 сут

А – Концентрическое расположение цистерн ГрЭС в виде замкнутых колец. $\times 40\ 000$; Б – Многочисленные полиморфные митохондрии, характеризующиеся матриксом умеренной электронной плотности и множеством крист. $\times 20\ 000$; В – Мегамитохондрия, содержащая матриксом пониженной электронной плотности и многочисленные кристы. $\times 20\ 000$; Г – Ядро гепатоцита с неглубокими инвагинациями кариолеммы, содержащее преимущественно деконденсированный хроматин и компактное ядрышко. $\times 12\ 000$

Многочисленные митохондрии отличались полиморфизмом, умеренно электронно-плотным матриксом и множеством крист, что характеризует их как высокоэнергетические органеллы (рис. 2Б). Местами обнаруживались единичные измененные органеллы с электронно-светлым матриксом (рис. 2В). Ядра гепатоцитов содержали преимущественно деконденсированный хроматин (рис. 2Г).

Со стороны микрососудистой и желчевыводящей систем существенные изменения не отмечены. Достаточно часто обнаруживались макрофаги с высокой степенью активности, содержащие крупные фагосомы, что согласовывалось с микроскопическими наблюдениями. Какие-либо существенные фиброзные процессы в печени не выявлены.

При введении МТХ через день в течение 21 сут в печени животных наблюдалось незначительное возрастание лимфогистиоцитарной инфильтрации портальных трактов (рис. 3А). Отмечалась более выраженная по сравнению с недельным воздействием препарата инфильтрация клетками воспалительного ряда в области центральных вен с сочетанием диссеминированной внутريدольковой лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрацией (рис. 3Б) и формированием очагов воспаления различного калибра (рис. 3В). В области некоторых центральных вен обнаруживались гепатоциты, окруженные клетками воспалительного ряда, с признаками кариорексиса: гиперхромными, фрагментированными ядрами, нередко

принимающими полулунную форму (рис. 3Г), что является результатом гиперконденсации и маргинации хроматина. Это клетки, гибнущие по апоптозному типу. У 30% животных констатировался цитостатический эффект.

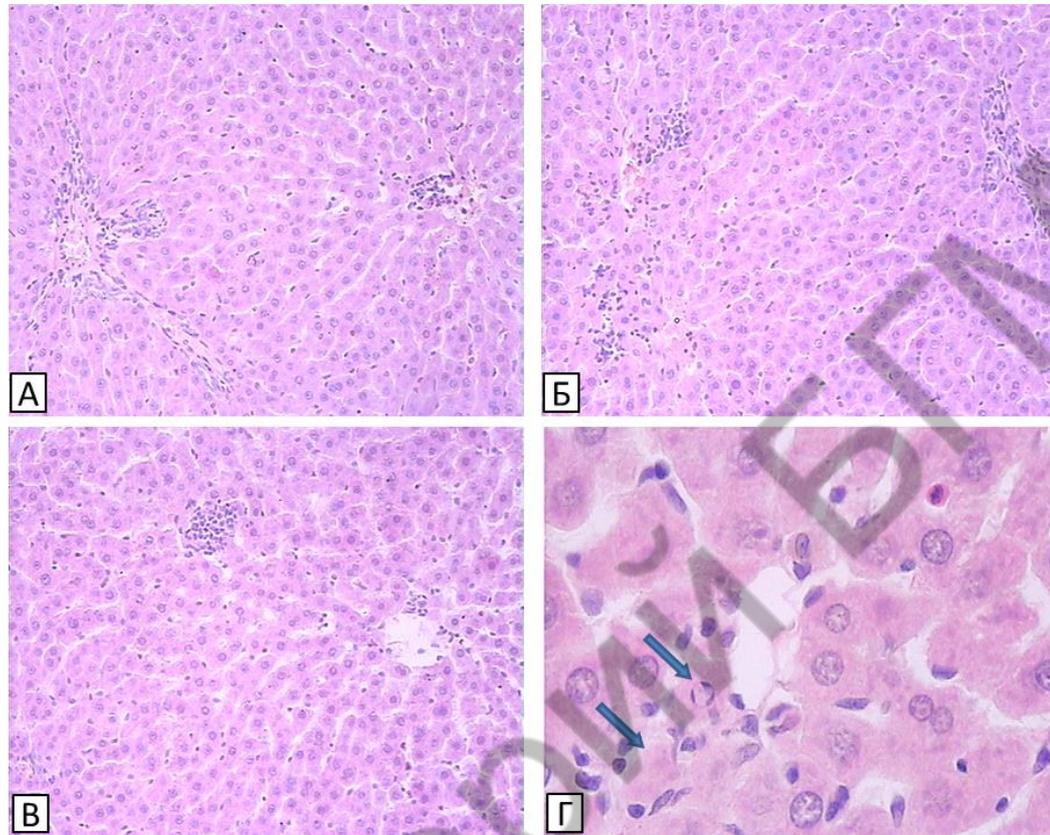


Рис.3 – Морфологические особенности печени при введении МТХ через день в течение 21 сут
А – Умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация портального тракта (слева) и центральной вены (справа). $\times 100$; Б – Выраженная инфильтрация лимфоцитарно-макрофагальными элементами в области центральной вены (на рисунке слева) с сочетанием диссеминированной внутридольковой инфильтрацией. $\times 100$; В – Средний очаг воспалительной реакции в интермедиальной области дольки. $\times 100$; Г – Центральная вена. Гепатоциты, окруженные клетками воспалительного ряда, с признаками кариорексиса (гибнущие по апоптозному типу) (стрелки). $\times 200$

Выводы: введение метотрексата в дозе 0,1 мг/кг через день в течение 7 и 21 сут инициирует ряд обратимых однонаправленных морфологических изменений в печени крыс. В обоих случаях он вызывал умеренную внутридольковую инфильтрацию паренхимы печени клетками воспалительного ряда, с минимальной степенью лимфогистиоцитарной инфильтрации портальных трактов, стимулировал белоксинтетическую активность в гепатоцитах и активность макрофагальной системы. Цитостатический эффект констатировался у 60% животных при введении метотрексата через день в течение 7 сут, а у 30% – в течение 21 сутки. Трехнедельное воздействие метотрексата вызывало гибель отдельных гепатоцитов по апоптозному типу в области центральных вен. Регистрировались локальные фиброзные изменения в дольке печени, однако существенного усиления фиброгенеза не отмечалось.

Литература

1. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats / N. Jahovic [et al.] // *Journal of Pineal Research*. – 2003. – Vol. 34, № 4. – P. 282-287.
2. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats / H. M. Hafez [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2015. – P. 302222-30223.
3. Фолатзависимые механизмы гепатотоксичности этанола при хронической алкогольной интоксикации / П. С. Пронько [и др.] // *Фундаментальные науки – медицине: материалы Междунар. науч. конф. (Минск, 17 мая 2013 г.) В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т физиологии; редкол.: И.В. Залуцкий [и др.]* – Минск: Беларус. навука. – 2013. – С. 166–170.
4. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *Journal of Cell Biology*. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
5. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats / N. Jahovic [et al.] // *Journal of Pineal Research*. – 2003. – Vol. 34, № 4. – P. 282-287.
6. Новгородская, Я.И. Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии / Я. И. Новгородская, Р. И. Кравчук, О. Б. Островская, М. Н. Курбат // *Гепатология и гастроэнтерология*. – 2019. – Т. 3, № 1. – С. 93–98.
7. Homocysteine induces hepatic steatosis involving ER stress response in high methionine diet-fed mice / Y. Ai [et al.] // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9, № 4. – pii: E346.
8. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases / R.P. Boot-Handford [et al.] // *Cell.Tissue Res*. – 2010. – Vol. 339, № 1. – P. 197–211.
9. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress / T. Gotoh [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26, № 7. – P. 1439–1446.