

Лебедева Е. И., Мяделец О. Д., Грушин В. Н., Кичигина Т. Н., Голубцов В. В.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕПАТОЦИТОВ БЕЛЫХ КРЫС И ЧЕЛОВЕКА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Республика Беларусь

В настоящее время имеет место неуклонный рост заболеваний печени. Методы терапии заболеваний печени остаются недостаточно эффективными, что приводит к высокой частоте развития фиброза/цирроза печени в исходе данных заболеваний [3]. Воспроизведение в эксперименте на животных моделях гепатита и цирроза печени, близких к клиническим условиям, является необходимым для более детального выяснения закономерности цирроза печени. Экспериментальные модели позволяют дать комплексную оценку и разработать методы адекватной коррекции печеночной недостаточности, что не всегда возможно в клинических условиях. Для большинства исследователей главным критерием оценки эффективности лекарственных препаратов при токсическом поражении печени остаются биохимические параметры сыворотки крови. Вместе с тем, морфологические изменения печени не всегда коррелируют с биохимическими показателями [1]. Современные представления о морфофункциональном состоянии печени крыс и человека в норме и в динамике развития токсического цирроза фрагментарны и противоречивы и обуславливают необходимость дальнейших исследований [2].

Цель исследования: изучить морфометрические особенности гепатоцитов белых крыс и человека при токсическом поражении печени.

Материал и методы. Работа выполнена на секционном материале и материале прижизненных пункционных биопсий печени пациентов с клинико-лабораторными и морфологическими признаками хронической гепатопатии, полученном в УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро» и УЗ «Витебская областная клиническая больница». На проведение данного исследования получено разрешение комитета по этике клинических испытаний при УО «ВГМУ» (протокол № 4 от 09.01.2013). Критериями отбора пациентов в группу с алкогольной болезнью печени (АБП) являлись указание в анамнезе на регулярное употребление ими спиртных напитков и данных клинических и биохимических исследований. Контролем служил материал печени относительно здоровых людей (биоптаты печени лиц, направленных военкоматами для исключения патологии и лиц, умерших от причин, не связанных с патологией печени). Был исследован материал от 24 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 65 лет. Биоптаты и секционный материал были разделены на 4 группы: 1-я — относительная норма (n = 12, 6 мужчин и 6 женщин); 2-я — пациенты с алкогольным стеатозом (n = 13, 7 мужчин и 6 женщин); 3-я — пациенты с острым алкогольным гепатитом (n = 13, 6 мужчин и 7 женщин); 4-я — пациенты с алкогольным циррозом (n = 15, 5 мужчин и 10 женщин).

Кроме того, был изучен материал печени от белых крыс в норме и на разных стадиях экспериментального токсического поражения печени. Содержание животных, выполнение различных процедур и вывод из опыта осуществлялись в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных

животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986, ETS № 123) и «Правилами лабораторной практики Республики Беларусь» (приложение к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 31 от 31.10.2006). Исследование на половозрелых беспородных белых крысах обоего пола весом 180–250 г проведено в осенне-зимний период. Животные были разделены на группы: 6 опытных ($n = 12$, 6 самцов и 6 самок) и контрольную ($n = 24$, 12 самцов и 12 самок). Токсический цирроз печени вызывали путем внутрижелудочной затравки 40%-ным масляным раствором четыреххлористого углерода в дозе 0,2 мл/100 г массы животного два раза в неделю в утренние часы, за 4 часа до кормления в течение 19 недель. Параллельно с этим вместо воды в качестве питья крысы получали 5%-ный раствор этанола из поилок в режиме свободного доступа на протяжении всего опыта. Животных выводили из эксперимента через 3, 6, 9, 12, 16 и 19 недель в утренние часы декапитацией с применением гильотины под местной анестезией шейной области. Крыс контрольной группы выводили из опыта по окончании эксперимента. Для морфологического исследования печени использовали окраску гематоксилином и эозином, метод Маллори и метод Ван-Гизон. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерные программы анализа изображений Image Scope Color и cellSens Standard (Россия). С этой целью производили микрофото съемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония). Микроскопическое исследование срезов печени производили при постоянном сравнении их с нормальными образцами. Определяли среднюю площадь гепатоцитов и их ядер в $\mu\text{м}^2$. Путем определения разности между площадью гепатоцитов и их ядер получали площадь цитоплазмы клеток, после чего вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Цитоморфометрию проводили при увеличении $\times 600$. При увеличении $\times 200$ осуществляли подсчет двуядерных гепатоцитов по описанной выше методике.

Статистическую обработку данных проводили с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 Advanced (русская версия). Так как размер групп не превышал 50 особей, анализ соответствия частотного распределения исследуемых признаков нормальному закону осуществляли по критерию Шапиро–Уилка. Определяли средние и их соответствующие доверительные интервалы, медианы и значения 15–85-го перцентилей. При обработке данных с помощью параметрической статистики о достоверности различий судили по t-критерию Стьюдента, а для непараметрической статистики использовали U-критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. Развитие экспериментального цирроза у белых крыс происходила, медленно и выявилось у всех животных лишь через 16 недель после начала эксперимента. У самцов цирроз выявился на 3 недели раньше, чем у самок. Патологоанатомические и гистологические признаки цирроза отмечались через 9 недель у 55 % самцов, а через 12 недель — у 100 % самцов и 30 % самок.

На всех этапах эксперимента у самцов и самок крыс выявлены полиморфизм гепатоцитов, мутное набухание цитоплазмы и нечеткие границы большинства клеток. Увеличение по сравнению с контролем средней площади гепатоцитов у самцов отмечалось до 9-й недели в 1,62 раза ($p = 0,000$), а у самок — до 12-й

недели эксперимента в 1,86 раза ($p = 0,000$). На стадии цирроза данный показатель увеличивался по сравнению с контролем у самцов в 1,5 ($p = 0,000$), у самок — в 1,75 раза ($p = 0,000$). У людей на стадии жирового стеатоза и цирроза межклеточные границы большинства гепатоцитов были выражены хорошо, и средняя площадь клеток не отличалась от показателя контрольной группы. Вместе с тем, на стадии гепатита у мужчин и женщин этот показатель снижался в 1,11 раза ($p = 0,000$) по сравнению с контролем.

Развитие цирроза у самцов и самок сопровождалась полиморфизмом ядер гепатоцитов и достоверным увеличением их средней площади с преобладанием эухроматина и увеличением количества ядрышек (2–4). На стадии цирроза показатель увеличивался по сравнению с контролем у самцов в 1,26 ($p = 0,000$), у самок — в 1,44 раза ($p = 0,000$). У людей на всех стадиях АБП в ядрах гепатоцитов преимущественно выявлялся гетерохроматин и 1–2 ядрышка. Средняя площадь ядер была ниже контрольного показателя у мужчин и у женщин в 1,06 раза ($p = 0,000$) только на стадии гепатита. На фоне гипертрофии гепатоцитов и их ядер ЯЦО было снижено по сравнению с контролем в 1,20 раза ($p = 0,000$): у самцов на всех этапах эксперимента, а у самок — с 6-й по 19-ю неделю эксперимента. У мужчин и у женщин показатель ЯЦО был выше контрольного уровня в 1,07 раза ($p = 0,026$) только на стадии цирроза.

Подсчет среднего количества двуядерных гепатоцитов показал, что данный показатель был достоверно ниже уровня контрольного на протяжении всего эксперимента. Через 19 недель количество двуядерных гепатоцитов в печени самцов и самок было ниже контрольного уровня в 2,40 раза ($p = 0,000$). У мужчин и у женщин на стадии жирового стеатоза и цирроза количество двуядерных гепатоцитов было выше контрольного показателя в 1,14 ($p = 0,000$) и 1,60 раза ($p = 0,000$) соответственно. На стадии гепатита данный показатель снижался в 1,20 раза ($p = 0,000$) как у мужчин, так и у женщин.

Выводы. Регенераторно-компенсаторные изменения в гепатоцитах при развитии токсического цирроза печени у крыс протекают за счет гипертрофии одноядерных гепатоцитов, тогда как у людей — за счет увеличения количества двуядерных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Моделирование* лекарственного токсического гепатита на крысах / А. О. Ревякин [и др.] // Биомедицина. 2014. Т. 1, № 1. С. 52–53.
2. *Современные представления* о фибротических поражениях печени / Е. А. Супруненко [и др.] // Сложные системы. 2012. № 3 (4). С. 51–58.
3. *Alcoholic disease : liver and beyond* / A. Rocco [et al.] // World J. Gastroenterol. 2014. Vol. 20, Iss. 40. P. 14652–14659.

Lebedeva E. I., Myadelets O. D., Grushin V. N., Kichigina T. N., Halubtsov V. V.

Morphometric features of hepatocytes of white rats and humans under toxic liver damage

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Belarus

Morphometric characteristics of hepatocytes of white rats and humans in various stages of liver toxicity were established. Regenerative-compensatory changes in

hepatocytes during toxic liver cirrhosis in rats occur due to hypertrophy of uninuclear hepatocytes, while in humans they occur by increasing the number of binuclear cells.

Key words: liver, white rats, human, morphometric parameters of hepatocytes.