

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМІНИ ОБ'ЄМУ ДВОЯДЕРНИХ ГЕПАТОЦИТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРА ПІД ВПЛИВОМ ОПОЇДІВ В ДИНАМІЦІ ТРИТИЖНЕВОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ

С.О. Вовк, М.В. Логаши, Ю.Я. Кривко

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Кафедра нормальної анатомії (зав. - проф. Ю.Я. Кривко)

Реферат

Препарати опійного походження посідають пріоритетне місце на наркосцені України. Одним із чинників неадекватних обсягів продажу лікарських засобів, що містять ці сполуки, є можливість їх використання для немедицинного застосування. Тривале приймання опіатів призводить до погіршення стану всіх систем організму. Дані щодо ураження печінки при супровідному наркоспоживанні неповні і часто суперечливі, що викликає інтерес для додаткових досліджень.

Мета. Проведення аналізу морфологічних змін у печінці, зокрема, виявлення змін об'єму двоядерних гепатоцитів у динаміці тритижневого експерименту.

Матеріал і методи. Експеримент здійснено на самцях білих щурів, вагою 190-230 г. До початку експерименту було сформовано дві рандомізовані групи тварин: I - контрольна група щурів, II - тварини, яким вводили внутрішньом'язово наростаючі дози опіоїду "Налбуфін" із щотижневим підвищенням дози. Визначали об'єм гепатоцитів за методом "нуклеатор".

Результати й обговорення. Встановлено, що об'єм гепатоцитів змінюється на різних тижнях експерименту. Показники медіани свідчать про зменшення об'єму гепатоцитів на третьому тижні (1697 мкм³), на першому та на другому тижні об'єм клітини збільшується (3157 мкм³ та 3479 мкм³). Величина стандартного відхилення на першому тижні дорівнює 2672 і максимально наближена до показника контрольної групи - 2898, максимальна на другому тижні - 3833, а мінімальна на третьому 2221. Аналізуючи середнє значення об'єму ми спостерігаємо, що максимальне значення цього показника також припадає на другий тиждень експерименту (4539 мкм³), а на третьому тижні відбувається його зменшення (2338 мкм³).

Висновок. Ми спостерігали динаміку зміни об'єму двоядерних гепатоцитів на всіх термінах, при цьому найбільшого розміру гепатоцити набувають на другому тижні експерименту, а найменшого - на третьому тижні.

Ключові слова: опіоїди, двоядерні гепатоцити, нуклеатор, печінка

Abstract

ANALYSIS OF THE RATS' LIVER BINUCLEATE HEPATOCYTES VOLUME CHANGE UNDER THE INFLUENCE OF OPIOIDS DURING THE THREE WEEKS EXPERIMENT

S.O. VOVK, M.V. LOGASH, Yu. Ya. KRYVKO

The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

Opioids and opiates hold the priority place on the drug addiction scene of Ukraine. The off-label use and abuse of potentially addictive medications are among causes of their high sales. Long-term use of opiates leads to the aggravation of all systemic conditions of the organism. Information about the hepatic pathology as a result of drug abuse often is incomplete and contradictory. It provokes a particular interest in further studies.

Aim. To analyze the morphological changes of the rat liver, particularly the changes of the volume of binucleate hepatocytes during the experiment.

Materials and Methods. White male rats, 190-230 gr. of weight, were selected for the study; two randomized groups of animals were formed: I - the control group of rats, II - the experimental group (receiving intramuscular injections of opioid "Nalbufin"). The dose of the opioid was increased every week. "Nucleator" method was applied to determine the volume of hepatocytes.

Results and Discussion. It was determined that the hepatocytes volume varies in different weeks of the experiment. The median indices testify that the hepatocytes volume decreases in the 3rd week (1697 μm^3), while in the 1st and 2nd weeks the cell volume increases to 3157 μm^3 and 3479 μm^3 respectively. The value of standard deviation in the 1st week was close to the control - 2672, the maximal on the 2nd week - 3833, while the minimal on the 3rd week - 2221, respectively. The maximal mean of the volume of the cells was revealed in the 2nd week (4539 μm^3) of experiment, while the decrease of the mean of the cell volume occurred in the 3rd week - 2338 μm^3 .

Conclusion. Thus, according to the data, the results of our investigation show the dynamics of the volume of the binucleate hepatocytes during all time periods of the experiment. The volume of the cells reaches its maximum in 2nd week, and its minimum - in 3rd week.

Key words: opioids, binucleate hepatocytes, nucleator, liver

Вступ

Невпинне зростання в Україні кількості осіб, що зловживають психотропними та наркотичними речовинами, набуло характеру епідемії, що зумовило низку нових соціальних, економічних, медичних та юридичних проблем. [1, 2]. Сучасна наука більше починає вивчати соціальне, біологічне, медичне, психологічне коріння такого явища, як наркоманія [3, 4]. Дуже небезпечним є те, що в умовах сьогодення наркоманія значно помолодшала. Дані офіційної статистики МОЗ України свідчать, що у середньому перша спроба

неін'єкційних наркотиків відбувається у віці 17,6 років, а середній вік початку вживання ін'єкційних наркотиків становить 20,6 років. У порівнянні із даними досліджень 2008/2009 років, середній вік ініціації вживання наркотичних речовин практично не змінився (22,2 роки у 2008/2009, проти 22,7 у 2011 році). Середній стаж уживання наркотичних речовин ін'єкційним шляхом становить 12,5 років. Частка серед ін'єкційних наркоманів, які вживали лише опіати, становить 62,3%, тому споживання опіатів досі посідає пріоритетне місце на наркосцені України [5]. Залежність від психоактивних речовин і, зокрема, від опіатів залишається актуальною проблемою сучасного українського суспільства.

Дослідники із року у рік проводять комплексні дослідження із метою з'ясування впливу опіатів та опіодів на функціональні системи організму. Результати досліджень свідчать, що якщо виключити порушення з боку вегетативної нервової системи, які є практично у всіх хворих на наркоманію то супровідні хвороби спостерігаються у обстежених: терапевтичного профілю - у 26%, неврологічного профілю - у 6%, хірургічного профілю - у 7%, шкірні хвороби - в 1%, інші хвороби - у 5%. Серед хвороб терапевтичного профілю переважали хвороби органів травлення, серед них хронічні холецистити, токсичні гепатити тощо [6].

Наркоспоживання та його наслідки - хронічна наркотична інтоксикація та гостре отруєння наркотичними препаратами, все частіше трапляється у практиці не тільки судово-медичних експертів і наркологів, але й інфекціоністів, гастроентерологів та терапевтів [7, 8].

Більша кількість авторів стверджує, що найхарактернішими для отруєнь наркотичними речовинами слід визнати патологічні процеси у нейроендокринній системі та печінці. Джерела літератури щодо характеру і розповсюдженості та перебігу уражень печінки при супровідному наркоспоживанні неповні і часто суперечливі [9]. У зв'язку із цим стає актуальним дослідження зміни морфологічного стану гепатоцитів, адже досягнення клінічної медицини неможливі без фундаментальних досліджень морфології органів.

Саме тому метою роботи було проведення аналізу морфологічних змін у печінці, зокрема, зміни об'єму двоядерних гепатоцитів за допомо-

гою методу "нуклеатор" [10] у динаміці тритижневого експерименту.

Матеріал і методи

Експеримент здійснено на самцях білих щурів, вагою 190-230 г. Перед початком експерименту було сформовано дві рандомізовані групи тварин: I - контрольна група щурів, яким вводили внутрішньом'язево фізрозчин, II - тварини, яким вводили внутрішньом'язево наростаючі дози опіюду "Налбуфін" із щотижневим підвищенням дози за схемою 8 мг/кг/доба, 15 мг/кг/доба, 20 мг/кг/доба. Кожні 7 днів проводили забір матеріалу після введення летальної дози тіопенталу натрію. Вибір зразків печінки проводили методом рівномірно-випадкової вибірки. Зразки фіксували у 10% формаліні та після проведення за спиртами наростаючої концентрації від 60% до абсолютного із кроком у 10%, заливали у парафін із проміжним проведенням за сумішами ксилол-спирт та ксилол-парафін, із подальшим виготовленням та фарбуванням зрізів гематоксиліном Ерліха та еозином БА. Фотографували на мікроскопі Meiji із імерсійним об'єктивом x 100, камера Canon EOS 550D, адаптер x 1.5, калібрування проводили за допомогою слайду Meiji MA285. Критерієм для обрахунку було наявність у фокусі двоядерного гепатоцита із ядрерцем.

Цитоморфометрію здійснювали за методом "нуклеатор", при цьому методі як неупереджену точку для виміру використовували ядрерце, кількість замірів із кожної клітини - 4, напрямок першого виміру визначався випадковим чином, наступні три під кутом 90° [10]. Заміри проводили із використанням програми ImageJ. Таким чином отримували значення радіусу клітини R_1 .

Для розрахунків використовували комп'ютерну програму Excel, зокрема для обчислення об'єму гепатоцитів та їх аналізу. Для чисельного відображення об'єму клітин використали формулу $V_{\text{hep}}^3 = 4/3\pi R_1^3$, де V_{hep}^3 - об'єм гепатоцита, R_1 - значення радіусу, отримане методикою "нуклеатор" [10]. Загальна кількість замірів контролювалась на основі коефіцієнта помилки методики (CE), що визначається за формулою $CE = SE/\mu$, де SE - помилка середнього, μ - середнє значення параметра [10]. Статистичну опрацювання одержаних даних здійснювали методами варіаційної статистики. При проведенні статичної об-

Таблиця 1

Основні статистики змін об'єму гепатоцитів (V - середнє значення об'єму в $\mu\text{км}^3$, SE - помилка середнього)

	Контроль	7 день	14 день	21 день
$V \pm SE$	3391 \pm 265	3671 \pm 163	4539 \pm 242	2338 \pm 150
Медіана (50%)	2483	3157	3479	1697
Стандартне відхилення	2898	2672	3833	2221
Перший квартиль (25%)	1484	1839	1912	1098
Третій квартиль (75%)	3973	4849	5846	2758
Об'єм вибірки	120	269	250	218
Вірогідність різниці між контрольною та експериментальною групами		$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

робки обчислювали: середню арифметичну величину, стандартне відхилення і медіану. Вірогідність різниці між контрольними і експериментальними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента, різниця вважалась вірогідною при $p < 0,05$.

Результати й обговорення

Аналіз досліджень засвідчив, що у динаміці трижневого експерименту відбуваються характерні зміни у морфології двоядерних гепатоцитів. Результати подано у табл. 1 та рис. 1. При цьому слід відмітити, що наявність поодиноких стрибків значення у вибірках за рахунок незначної кількості гігантських гепатоцитів призводить до сумнівної інформаційності середнього значення [11, 12]. Стандартне відхилення також не відображає реальну картину змін клітин і може використовуватися лише як допоміжний показник, оскільки передбачає використання всіх значень вибірки, причому всі вони впливають на значення цієї міри. Медіана є найприйнятнішою характеристи-

кою, й у разі, якщо у ряді розподілу є значно більші та значно менші розміри клітин, вони впливають на середню величину, а в той час, як медіана залишається незмінною. Медіана, окрім того, володіє властивістю лінійного мінімуму і сума абсолютних значень відхилень величини ознаки у всіх одиниць сукупності від медіани, найменша. Додатково, для повного відображення динаміки фракцій розміру ми використали перший і третій квартилі. Характеризуючи медіану ми спостерігали на першому та на другому тижні збільшення об'єму клітин (3157 $\mu\text{км}^3$ та 3479 $\mu\text{км}^3$) у порівнянні із контрольною групою (2483 $\mu\text{км}^3$), оскільки після пошкодження гепатоцитів токсичними речовинами клітини мають здатність регулювати ріст і масу а також підтримувати постійність структури. При пошкодженні запускається механізм проліферації та диференціації клітин, а також реструктуризація строми, яка активується при регенерації пошкоджених тканин. У подальшому ми спостерігали зменшення об'єму гепатоцитів на третьому тижні до 1697 $\mu\text{км}^3$, очевидно, по-

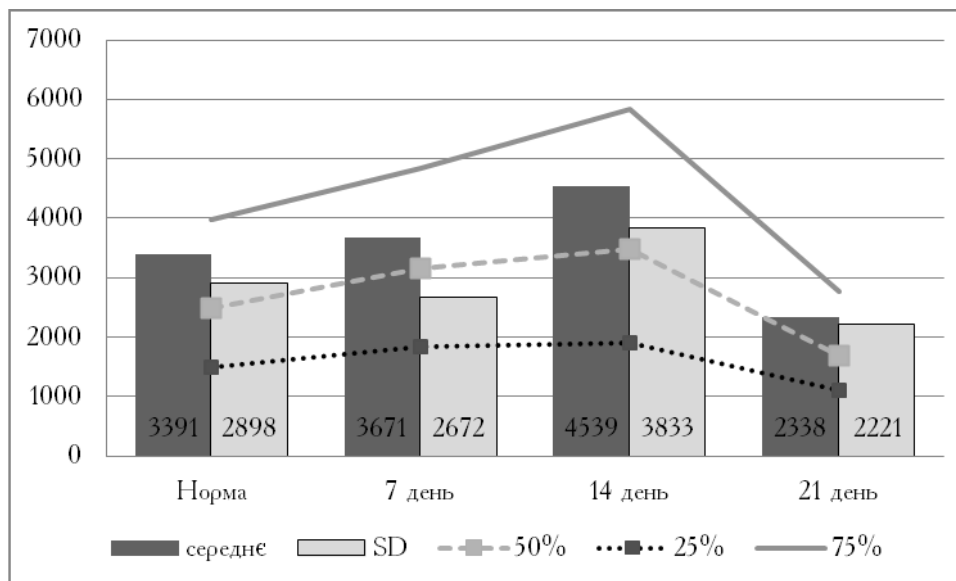


Рис. 1

Динаміка основних статистик об'єму двоядерних гепатоцитів (SD - стандартне відхилення, 50% - медіана, 25% - перший квартиль, 75% - третій квартиль)

в'язане із явищами декомпенсації. Величина стандартного відхилення на першому тижні дорівнювала 2672 і була максимально наближена до показника контрольної групи - 2898, максимальна на другому тижні - 3833 та мінімальна на третьому 2221. Аналізуючи середнє значення об'єму ми спостерігали, що максимальне значення цього показника також припадає на другий тиждень експерименту (4539 мкм³), а на третьому тижні відбувається його зменшення (2338 мкм³). При цьому на усіх термінах середнє суттєво більше за медіану, а на другому тижні ця різниця була максимальна і становила 1060, що свідчить про найбільшу кількість великих форм двоядерних гепатоцитів. Про це свідчить і динаміка кватилей - третій кватиль максимальний на другому тижні і становив 5846, при показнику контрольної групи 3973 і мінімальний на третьому тижні - 2758.

Висновок

Виявлено динаміку зміни об'єму двоядерних гепатоцитів на всіх термінах експерименту, при цьому найбільшого розміру гепатоцити набувають на другому тижні експерименту, а найменшого - на третьому тижні. Зіставляючи дані морфометрії із візуальним аналізом гістологічних препаратів, можна зробити висновки, що на ранніх термінах ці зміни проходять за рахунок процесів регенерації, а на третьому тижні зміни показників об'єму, а саме, зменшення середнього і стандартного відхилення, проходить за рахунок дистрофічних процесів та моноцелюлярних некрозів переважно великих форм гепатоцитів. Отримані дані будуть використані в подальшому для комплексних висновків після проведення дослідження кількості двоядерних гепатоцитів та дослідження одноядерних гепатоцитів.

Література

1. United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2014 (United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7) http://www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf
2. Sushik O.G., Vasyluk S.M. To the questions about the drug addiction on the Ukraine. Ped. Poshuk 2010; 2: 41-44. Ukrainian (Сушик О. Г. До питання про наркоманію в Україні / О. Г. Сушик, С. М. Василюк // Пед. пошук. - 2010. - № 2. - с. 41-44).
3. Wang, X., Cochran, T. A., Hutchinson, M. R., Yin, H., & Watkins, L. R.: Drug Addiction. In: Microglia in Health and Disease. Eds.: Marie-Eve, Sierra Amanda, Springer, New York, 2014, 299-317.
4. Sjoerds, Z., Luigjes, J., Van Den Brink, W., Denys, D., & Yucel, M.: The role of habits and motivation in human drug addiction: a reflection. Frontiers in psychiatry 2014; 5(8): 1-5.
5. Vyevskiy A.M., Jdanov M.P., Sydyak S.V. et al. National report about situation with drug addiction in Ukraine (data from 2010). Kiev; 2011: 96 p. Ukrainian: (Вієвський А.М. Національний звіт щодо наркотичної ситуації (дані 2010 року) / А.М. Вієвський, М.П. Жданова, С.В. Сидяк [та ін.] // - Київ, - 2011. 96 с.).
6. Kozlov A.V. Comorbidities in patients with opioid addiction. Journal practichnogo licarya 2006; 2: 36-37. Ukrainian: (Козлов А.В. Супутня патологія у хворих на опійну наркоманію / А.В. Козлов // Журнал Практичного лікаря. - 2006. - №2. - с.36-37).
7. Kielland K. B., Delaveris G. J. M., Rogde S., Eide T. J., Amundsen E. J., Dalgard O.: Liver fibrosis progression at autopsy in injecting drug users infected by hepatitis C: A longitudinal long-term cohort study. Journal of hepatology 2014, 60(2), 260-266.
8. Pigolkin Y.I. Morphological diagnostic of the drug addiction intoxications in the forensic medicine / Eds. Y.I. Pigolkin. - Moscow.:Medicina, 2004. - 276p. Russian: (Пиголкин Ю.И. Морфологическая диагностика наркотических интоксикаций в судебной медицине / Под ред. Ю.И. Пиголкина. - М.: Медицина, 2004. - 276 с.).
9. Byla G.S., Sumerenko M.S., Gaydar Y.A. et al. Pathohistological pattern of the liver in the patients with viral hepatitis and opioid addiction. Infectiyny hvoroby 2008; 1: 55-58. Ukrainian: (Г.С. Біла, М.С. Сумеренко, Ю.А. Гайдар та ін. Патогістологічна картина печінки при вірусних гепатитах у наркоспоживачів. Інфекційні хвороби 2008; 1:55-58).
10. Howard CV, Reed MG: Unbiased stereology. QTP Publications, Coleraine 2010, 2-d ed., 145-149.
11. Glantz S.A. Primer of Biostatistics / S.A. Glantz. - Moscow.: Practica, 1998. - 459p. Russian: (Гланц С. Медико-біологічеськая статистика. Пер. З англ. - М.: Практика, 1998. - 459с.).
12. Platonov A.E. Statistical analysis in medicine and biology: objectives, terminology, logic and computer methods / A.E. Platonov. - Moscow.: RAMN, 2000. - 52p. Russian: (Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. - М.: РАМН, 2000. - 52с.).