

УДК: 616.36-008-091 : 599.323.4.

Холодкова О. Л., Перепелюк М. М., Горчаг Д. М., Ромак О. І.

**МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ В ДИНАМІЦІ
МОДЕЛЮВАННЯ ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ****Одеський національний медичний університет МОЗ України
(м. Одеса)**

sonshine22@ukr.net

Робота виконана в рамках НДР кафедри анатомії людини Одеського національного медичного університету МОЗ України «Розробити та обґрунтувати способи корекції фіброзних змін печінки при хронічному гепатиті та цирозі печінки» (№ державної реєстрації 0116U008927).

Вступ. Хронічний токсичний гепатит (ТГ) проявляється фіброзним перетворенням тканини печінки – патологічним станом, що характеризується виникненням надлишкової кількості колагену внаслідок формування нових фібрил, при чому клінічна симптоматика досить обмежена, а порушення функції гепатоцитів – мінімальне [5]. Фіброз може стати причиною портальної гіпертензії, супроводжуватись некрозами, виникненням «хибних» часточок [10]. Причини виникнення ТГ різноманітні, перебіг – тривалий, прогноз за відсутності лікування – песимістичний [6,9]. Незважаючи на певні етіологічні та клінічні відмінності, в більшості хронічних фіброзних розладів є постійний подразник, який підтримує продукцію факторів росту, протеолітичних ферментів, факторів ангиогенезу та фіброгенних цитокінів, що разом стимулюють відкладення елементів сполучної тканини з наступною перебудовою й знищенням нормальної архітектоники органу [6,8].

Переривання послідовності патогенетичних подій може призвести до часткового або навіть повного зцілення [7]. З'ясування особливостей морфо-функціонального стану печінки на етапах розвитку ТГ сприятиме вдосконаленню діагностики та лікування цієї соціально значущої патології.

Мета дослідження: з'ясувати морфо-функціональний стан печінки щурів в динаміці формування ТГ.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведено на 40 статевозрілих самцях щурів Вістар, вагою 220-240 г., що знаходилися у стандартних умовах біологічної клініки (віварію). Моделювання ТГ здійснювали шляхом внутрішньошлункового введення розчину CCl_4 , концентрацією 50%, протягом 8 тижнів. Тварин розподілили на 2 групи: I група – тварини з модельованим токсичним гепатитом; II група – інтактний контроль. Початком експерименту вважали перший день після припинення ведення чотирихлористого вуглецю. Проводили патоморфологічне дослідження печінки з забарвленням за стандартними методиками [1]; загальний аналіз крові: кількість еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, лімфоцитів вираховували за допомогою автоматичного лічильника, визначення вмісту гемоглобіну проводили за допомогою фотоелектроколориметра

уніфікованим гемоглобіно-ціанідним методом за допомогою наборів реактивів «Лахема», Чехія [2]; визначення активності АлАТ та АсАТ проводили фотометричним методом за допомогою стандартизованого набору реактивів (Human GMbH); вміст загального білка визначали біуретовим методом (Human GMbH); вміст загального білірубину виявляли колориметричним методом «Лабсистемс» з додаванням додецил-сульфату натрію для поліпшення розчинності загального білірубину; вимірювання вмісту цитокінів здійснювали шляхом імуноферментного аналізу (ІФА) з застосуванням стандартних наборів для кількісного виявлення інтерлейкіну-2 (ІЛ-2), інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) та інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) ELISA (виробник Bender MedSystems). Виведення тварин з експерименту відбувалося на 14-у, 28-у та 56-у добу після закінчення моделювання ХГ.

Підготування тварин до експерименту, всі інвазивні втручання, знеболювання та виведення з експерименту проводили згідно Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 27, ст. 230 від 2006 р., із змінами, внесеними відповідно Закону № 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009, ВВР, 2010, № 9, ст. 76.

Результати дослідження та їх обговорення. На початку формування патології спостерігається лейкоцитоз, лімфо- та еритроцитопенія (**табл. 1**), суттєве підвищення активності ферментів цитолізу та вмісту загального білірубину, зниження вмісту загального білка (**табл. 2**). Відмічається значне зростання вмісту прозапальних цитокінів ІЛ-2 та ІЛ-6 (84 та 67%, $p < 0,05$), та протизапального ІЛ-4 (51%, $p < 0,05$) відносно контролю, тоді як вміст ІЛ-10 достовірно не відрізняється від показника контролю. В тканині печінки виявляються ділянки некрозу, монолобулярні вузлики. Морфометричне дослідження показало, що відносна площа гепатоцитів була майже в 12 разів більшою, ніж площа сполучної тканини.

Враховуючи те, що ІЛ-4 продукуються Т2-хелперами, а синтез ІЛ-10 опосередковується як активованими Т-хелперами, так і моноцитами й макрофагами [3,4], можна припустити, що розвиток токсичного CCl_4 -індукованого гепатиту супроводжується порушенням балансу прозапальних/протизапальних цитокінів з інгібуванням симетрично-гомеокінетичної відповіді, тобто зростання ІЛ-4 та ІЛ-10, переважно на рівні моноцитарно-макрофагальної ланки, можливо, безпосередньо на клітині Іто.

Через 4 тижні після припинення токсичного впливу зберігаються явища лейкоцитозу, лімфо- та еритроцитопенії (табл. 1). Активність ферментів цитолізу також залишається суттєво підвищеною, при чому активність АлАТ незначно зростає, тоді як АсАТ – дещо зменшується; вміст загального білірубину та загального білку залишається на рівні попереднього терміну (табл. 2). Вміст ІЛ-2 та ІЛ-6 суттєво знижувався порівняно з попереднім терміном, але для ІЛ-2 цей показник залишався на 44,2% вищим за контрольні показники ($p < 0,05$), ІЛ-6 – майже не відрізнявся від контрольної групи тварин; вміст ІЛ-4 зростає на 74%, ІЛ-10 – також зростає майже на 20% відносно контролю ($p < 0,05$). Виявляється порушення балкової будови органу, набряк та повнокров'я строми, вогнищеві некрози гепатоцитів, виразна лімфогістіоцитарна інфільтрація (рис. 1). Співвідношення гепатоцити/сполучна тканина знижується до 5,4.

Значний ріст співвідношення протизапальні/прозапальні цитокіни відображає, насамперед, стабілізацію запально-цитолітичного процесу у печінковій паренхімі за рахунок проліферації строми.

Крім того, розглядати цитокінову регуляцію як лінійний процес, нераціонально. Про-, – і протизапальні цитокіни є не лише антагоністами на рівні ефекторних клітин, насамперед Т-, та В-лімфоцитів, виконуючи мультимодальні функції. Наприклад, прозапальний ІЛ-6 здатен інгібувати синтез інших прозапальних цитокінів (ІЛ-1 та фактор некрозу пухлин), може підтримувати гомеостаз глюкози [4], забезпечує зв'язок імунної, нервової та ендокринної систем [3].

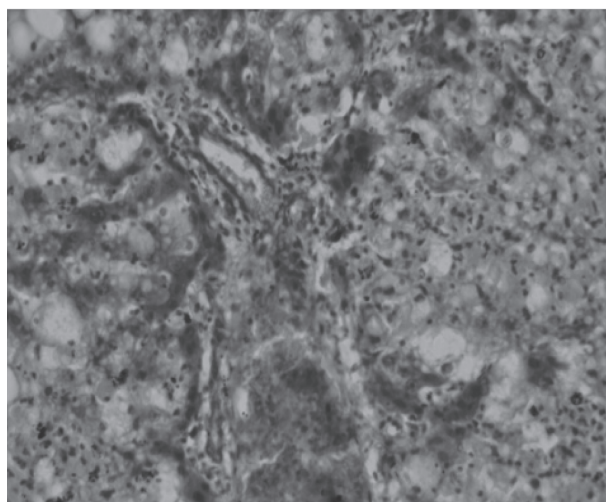


Рис. 1. Печінка щура з модельованим ТГ на 28-у добу експерименту: виразна лімфогістіоцитарна інфільтрація, зменшення гепатоцитів з наявністю «тіней» клітин, виразна жирова та білкова дистрофія, повнокров'я судин з явищами склерозу. Забарвлення: гематоксилін-еозин, зб.: x 100.

Таблиця 1.
Динаміка загальних та біохімічних показників крові щурів за умов індукованого токсичного гепатиту ($M \pm m, p < 0,05$)

| Показник/№ тварини | Контроль | 14-а доба | 28-а доба | 56-а доба |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Лейкоцити $\times 10^9 / л$ | 8,0 \pm 0,4 | 28,2 \pm 1,6* | 32,0 \pm 1,2* | 31,0 \pm 1,1* |
| Лімфоцити $\times 10^9 / л$ | 4,7 \pm 0,1 | 2,3 \pm 0,2* | 2,7 \pm 0,08* | 2,5 \pm 0,7* |
| Еритроцити $\times 10^{12} / л$ | 6,6 \pm 0,4 | 5,3 \pm 0,7* | 5,2 \pm 0,7* | 4,7 \pm 0,4* |
| Гемоглобін г/л | 117 \pm 6,9 | 108 \pm 8,1 | 102 \pm 6,2 | 89 \pm 4,3 |
| Тромбоцити $\times 10^9 / л$ | 201,3 \pm 7,6 | 206 \pm 3,9 | 196,2 \pm 4,9 | 173 \pm 3,1* |

Примітка: * – різниця є достовірною відносно контролю.

Таблиця 2.
Динаміка біохімічного складу крові щурів після моделювання ТГ ($M \pm m, p < 0,05$)

| Показник/термін | Контроль | 14-а доба | 28-а доба | 56-а доба |
|--------------------------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|
| АлАТ (Од/л) | 62 \pm 1,4 | 107 \pm 2,7* | 117,6 \pm 4,7* | 105,7 \pm 5,1* |
| АсАТ (Од/л) | 204 \pm 5,6 | 520 \pm 10,6* | 487 \pm 12,7* | 410 \pm 4,4* |
| Загальний білірубін (мкмоль/л) | 1,4 \pm 0,01 | 5,1 \pm 0,3* | 5,2 \pm 0,3* | 4,7 \pm 0,2* |
| Загальний білок (г/л) | 98 \pm 2,8 | 29,6 \pm 3,3* | 28,3 \pm 2,6* | 37,8 \pm 2,1* |

Примітка: * – різниця є достовірною відносно контролю.

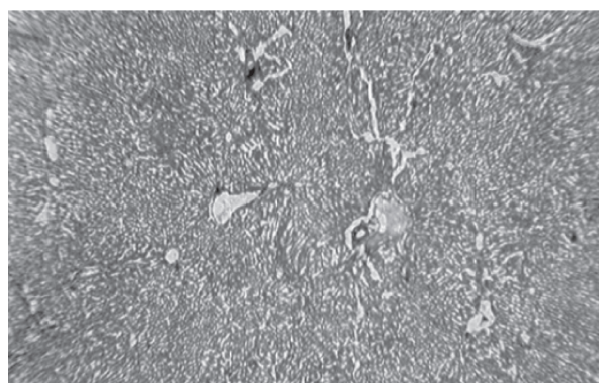


Рис. 2. Печінка тварин на 56-у добу після закінчення введення чотирихлористого вуглецю – активне розростання сполучної тканини, склероз судин. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення x 100.

Тому оцінка балансу про-, – і протизапальних цитокінів, які оцінювались у нашому дослідженні, хоч і є дещо умовною з точки зору цілісного організму та імунної системи, однак здатна відображати стадійність процесу гепатит \rightarrow фіброз.

Через 8 тижнів експерименту в крові щурів зберігаються явища лейкоцитозу, лімфо- та еритропенія, повільно знижується вміст тромбоцитів (табл. 1), тоді як активність ферментів цитолізу дещо пригнічується, але залишається значно вищою контрольних показників: для АлАТ – на 72%, для АсАТ – вдвічі;

вміст загального білірубину знижується, але все ще майже втричі перевищує показник контролю (табл. 2). Виявляється зменшення об'єму гепатоцитів, центролобулярні некрози та атрофія трабекул, гідропічна дистрофія гепатоцитів, поміж широких сполучнотканинних ділянок утворюються монолобулярні вузлики (рис. 2). Співвідношення гепатоцити/сполучна тканина становить 2,8.

Висновки. За умов моделювання ТГ в динаміці експериментального ураження спостерігається поступове руйнування тканини печінки, зростання об'єму сполучної тканини. Гостре запалення печінки на початку формування патології поступово сягає піку в середині терміну спостереження і тримається на стабільному рівні до 8-го тижня. Вміст прозапальних цитокінів коливається від значного підвищення на початку процесу, без адекватно-стримуючого

зростання протизапальних цитокінів, до поступового зниження, хоча й не до рівня контрольних показників. Відсутність балансу про/протизапальні цитокіни на початковій стадії патологічного процесу, модельованого у нашому експерименті, свідчить про відсутність регуляції за типом "негативного зворотного зв'язку", тобто про односпрямованість патологічного процесу без можливої саморегуляції та гальмування пошкодженої паренхіми печінки. Після припинення патологічного впливу ССІ4 на печінку регуляторно-гомеокінетичні процеси організму щурів переводять запальний процес у хронічний перебіг з гальмуванням імунної відповіді.

Перспективи подальших досліджень. Доцільним буде продовження терміну спостереження до 5-6 місяців після припинення впливу негативного чинника.

Література

1. Artishevskiy A.A. Gistologiya s tekhnikoy gistologicheskikh issledovaniy / A.A. Artishevskiy, A.S. Leontiuk, B.A. Sluka. – Minsk.: Visheyshaya shkola, 1999. – 236 s.
2. Brandis T. Unifikovaniy metod viznachennya hemoglobin / T. Brandis // Novosti mediciny I farmatsii. – 2007. – № 19. – S. 26-28.
3. Immunologiya I allergologiya (tsvetnoi atlas): uchebnoye posobiye dlya studentov medicinskih vuzov / pod red. O.O. Vorobieva, O.C. Bikova, O.V. Karaulova. – M.: Prakticheskaya medicina, 2006. – S. 52-53.
4. Tsaregorodceva T.M. Tsitokiny v gastroenterologii / T.M. Tsaregorodceva, T.I. Serova. – M.: Anaharsis, 2013. – S. 28-35.
5. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver / M.R. Teli, C.P. Day, A.D. Burt, M.K. Bennett, O.F. James // Lancet. – 1995. – Oct 14; 346 (8981). – P. 987-990.
6. Friedman S.L. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications / S.L. Friedman // Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol. – 2004. – № 1. – P. 98-105.
7. Hepatocyte growth factor promotes remodeling of murine liver fibrosis, accelerating recruitment of bone marrow-derived cells into the liver / Y. Asano, Y. Iimuro, G. Son, T. Hirano, J. Fujimoto // Hepatol Res. – 2007. – № 37. – P. 1080-1094.
8. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling / J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2002. – № 3. – P. 349-363.
9. Rosen H.R. Chronic hepatitis C infection / H.R. Rosen // The New England Journal of medicine. – 2011. – № 364 (25). – P. 2429-2438.
10. Underwood J.C.E. General and systematic pathology / J.C.E. Underwood, S.S. Cross. – Elsevier Limited, 2009. – 857 p.

УДК 616.36-008-091 : 599.323.4.

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ В ДИНАМІЦІ МОДЕЛЮВАННЯ ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ

Холодкова О. Л., Перепелюк М. М., Горчаг Д. М., Ромак О. І.

Резюме. В роботі з'ясовано, що за умов моделювання токсичного гепатиту в динаміці експериментального ураження спостерігається поступове руйнування тканини печінки, зростання об'єму сполучної тканини. Гостре запалення печінки на початку формування патології поступово сягає піку в середині терміну спостереження, і тримається на стабільному рівні до 8-го тижня. Вміст прозапальних цитокінів коливається від значного підвищення на початку процесу, без адекватно-стримуючого зростання протизапальних цитокінів, до поступового зниження, хоча й не до рівня контрольних показників. Після припинення патологічного впливу ССІ4 на печінку регуляторно-гомеокінетичні процеси організму тварин переводять запальний процес у хронічний перебіг з гальмуванням імунної відповіді.

Ключові слова: токсичний гепатит, експеримент, морфо-функціональний стан печінки, цитокіни.

УДК 616.36-008-091 : 599.323.4.

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС В ДИНАМИКЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

Холодкова Е. Л., Перепелюк Н. Н., Горчаг Д. М., Ромак О. И.

Резюме. В работе выявлено, что при моделировании токсического гепатита в динамике экспериментального поражения наблюдается постепенное разрушение ткани печени, рост объема соединительной ткани. Острое воспаление печени в начале формирования патологии постепенно достигает пика в середине срока наблюдения, и держится на стабильном уровне до 8-ой недели. Содержание провоспалительных цитокинов колеблется от значительного повышения в начале процесса, без адекватно-сдерживающего роста противовоспалительных цитокинов, до постепенного снижения, хотя и не до уровня контрольных показателей. После прекращения патологического воздействия ССІ4 на печень регуляторно-

гомеокинетические процессы организма животных переводят воспалительный процесс в хроническое течение с торможением иммунного ответа.

Ключевые слова: токсический гепатит, эксперимент, морфо-функциональное состояние печени, цитокины.

UDC 616.36-008-091: 599.323.4.

MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER OF RATS IN THE DYNAMICS OF TOXIC HEPATITIS MODELING

Kholodkova O. L., Perepeljuk M. M., Gorchag D. M., Romak O. I.

Abstract. Interrupting the sequence of pathogenetic events in the formation of toxic hepatitis (TH) can lead to the healing. Finding out the features of the liver at the stages of development of TH will contribute to the improvement of diagnosis and treatment of this socially significant pathology.

The purpose of the study: to find out the morpho-functional state of the liver of rats in the dynamics of formation of TG.

Materials: the study was conducted on sexually mature male rats Wistar. TH was modeled by intragastric insertion of CCl₄ solution for 8 weeks. There were 2 groups of animals: with simulated TH and intact. The beginning of the experiment was considered the 1st day after the CCl₄ cancellation. Pathomorphological examination of the liver was carried out; general and biochemical blood tests, measurements of the content of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10. The animals were removed from the experiment at the 14th, 28th and 56th day after the end of the TH modeling.

Results: On the 14th day of experiment leukocytosis, lympho- and erythrocytopenia, a significant increase in the activity of cytolytic enzymes and the content of total bilirubin, and a decrease in the total protein content were observed. Significant increase in the content of IL-2, IL-6 and IL-4 relative to control were found, while the content of IL-10 didn't differ significantly. In the liver tissue there are areas of necrosis, monolobular nodules. The ratio of hepatocytes / connective tissue was 12.

After 4 weeks, the phenomena of leukocytosis, lympho- and erythrocytopenia persist. The activity of the cytolytic enzymes also remains significantly elevated, with the slightly increased activity of AIAT, while the AsAT – decreases somewhat; the content of total bilirubin and total protein remains at the pre-term level. The content of IL-2 and IL-6 significantly decreased compared to the previous term, but for IL-2 this figure remained at 44.2% higher than the control values, IL-6 – almost didn't differ from the control group; IL-4 content increases by 74%, IL-10 – also increases by almost 20% relative to control. Violation of the hepar structure, edema and hypertrophy of the stroma, focal hepatocyte necrosis, expressive lymphohistiocytic infiltration were found. The ratio of hepatocytes / connective tissue is reduced to 5.4.

After 8 weeks, in the blood retains the phenomena of leukocytosis, lympho- and erythrocytopenia, the activity of the cytolytic enzymes is somewhat suppressed, but remains significantly higher than the control: for AIAT – by 72%, for the AsAT – twice; the content of total bilirubin is reduced, but still almost triple higher than the control. The decrease in the volume of hepatocytes is revealed, centrolobular necrosis and trabecular atrophy, hydropic dystrophy of hepatocytes are detected, monolobular nodules are formed in the wide area of connective tissue. The ratio of hepatocytes / connective tissue is 2.8.

Conclusions. After the cessation of the pathological effects of CCl₄ on the liver, the regulatory-homeokinetic processes of the rat reverse the inflammatory process into a chronic course with inhibition of the immune response.

Keywords: toxic hepatitis, experiment, morpho-functional state of the liver, cytokines.

Рецензент – проф. Проніна О. М.

Стаття надійшла 17.08.2017 року