

О.М. Гаврилюк, І.М. Гаврилюк, І.П. Чикайло

## Морфологічні прояви пошкодження та загоєння при хронічному токсичному ураженні печінки в експерименті

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

**Ключові слова:** тетрахлорметан, етиловий спирт, пошкодження, фіброз, регенерація, печінка.

Проведено аналіз морфологічних проявів процесів пошкодження та загоєння у трьох моделях хронічного токсичного ураження печінки за допомогою розробленої авторами напівкількісної шкали. Встановлено, що для дослідження особливостей процесів регенерації більш доцільно використовувати модель з комбінованим застосуванням тетрахлорметану та етилового спирту. Модель із застосуванням лише тетрахлорметану, в якій спостерігалась циротична трансформація, більш придатна для вивчення фіброзу та ангиогенезу.

### Морфологические проявления повреждения и заживления при хроническом токсическом поражении печени в эксперименте

Е.М. Гаврилюк, И.М. Гаврилюк, И.П. Чикайло

Проведен анализ морфологических проявлений процессов повреждения и заживления в трех моделях хронического токсического поражения печени при помощи разработанной авторами полуколичественной шкалы. Установлено, что для исследования особенностей процессов регенерации более целесообразно использовать модель с комбинированным введением тетрахлорметана и этилового спирта. Модель с введением только тетрахлорметана, в которой наблюдалась цирротическая трансформация, более пригодна для изучения фиброза и ангиогенеза.

**Ключевые слова:** тетрахлорметан, этиловый спирт, повреждение, фиброз, регенерація, печень.**Патология.** – 2010. – Т.7., №2. – С. 90–93

### Morphologic signs of tissue damage and healing in experimental chronic toxic liver injury

O.M. Gavrylyuk, I.M. Gavrylyuk, I.P. Chikajlo

Morphologic signs of tissue damage and healing in three models of toxic liver injury have been analyzed using semiquantitative scale worked out by the authors. It has been established, that the model caused by combined administration of carbon tetrachloride and ethanol may be used for study of regeneration. Model caused by administration only of carbon tetrachloride with the development of cirrhotic transformation is better for investigation of liver fibrosis and angiogenesis.

**Key words:** carbon tetrachloride, ethanol, injury, fibrosis, regeneration, liver.**Pathologia.** 2010; 7(2): 90–93

Процеси загоєння значною мірою зумовлюють особливості перебігу хронічних захворювань печінки. При цьому, вони залежать як від первинних етіологічних чинників, так і від множинних вторинних впливів, які приєднуються на різних етапах патогенезу [4,8]. Тому важливим є пошук кореляцій між дією певного фактору й активацією відповідних механізмів загоєння. На сьогодні зібрано достатньо великий матеріал щодо експериментальних уражень печінки, які більш або менш точно моделюють різноманітні варіанти пошкодження й запалення [11]. Моделі, які дозволяють вивчати процеси загоєння – фіброз, ангиогенез і регенерацію – відомі меншою мірою [3,4]. Особливо важливою є розробка моделей, які б відтворювали переважно один із компонентів процесів загоєння. Це дозволить вивчати вплив різноманітних ліків на названу ланку патогенезу й оцінювати її роль у прогресуванні захворювання.

Сучасні експериментальні моделі відтворюють різні механізми ураження в залежності від причини розвитку патології печінки. Хронічне токсичне ураження печінки моделюють за допомогою повторного введення гепатотоксинів: тетрахлорметану [1,12,14,16], диметилнітрозаміну [9], галактозаміну [15], тіоацетаміду [17], етанолу [7]. Для моделювання уражень, зумовлених нагромадженням у печінці металів, тваринам вводять

нітрилотриацетат заліза або міді [5]. Зміни, спричинені холестазом, викликають перев'язуванням загальної жовчевої протоки [13]. Останнім часом використовують також трансгенні моделі, пов'язані з посиленням експресії генів [19] або їх нокауту [20].

У зв'язку з тим, що відтворення хронічних уражень печінки шляхом повторного введення токсичної речовини є найбільш простим і доступним, надано перевагу саме цій моделі. При цьому обрано найповніше вивчені гепатотоксини (тетрахлоретан і етанол), дія яких базується на активації процесів перекисного окислення ліпідів та індукції оксидативного стресу.

Оскільки на сьогодні одним із найбільш достовірних методів діагностики лишається морфологічне дослідження, ми вважали, що для оцінки процесів загоєння доцільним буде аналіз гістологічних змін у тканині печінки.

#### Мета роботи

Вивчення морфологічних особливостей процесів пошкодження й загоєння у трьох експериментальних моделях хронічного ураження печінки.

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконано на 24 статевозрілих нелінійних щурах-самцях масою 180–220 г, яких утримували у віварії за стандартних умов розміщення, харчування

й санітарно-гігієнічних норм. Утримання тварин і всі маніпуляції з ними проводили згідно загальних принципів Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та вимог Закону України №3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Тварин поділено на чотири групи. Першій групі щодня вводили інтрагастрально тетрахлорметан у вигляді 20% олійного розчину по 0,2 мл/100 г маси тіла й 40% розчин етилового спирту з розрахунку 0,35 мг/100 г маси тіла впродовж 30 днів. Другій групі вводили інтрагастрально тетрахлорметан у вигляді 20% олійного розчину в дозі 0,2 мл/100 г маси тіла двічі на тиждень упродовж 30 днів. Обидві моделі розроблено на основі аналізу відомостей наукової літератури і власних досліджень. Третій групі перші 10 днів експерименту замість води для пиття давали 5% розчин етилового спирту, а наступних 20 днів – 15% розчин етилового спирту за методикою Е.М. Дорошенка. Четверта група – контрольна. Біологічний матеріал (кров і печінку) забирали на третю добу після останнього введення гепатотоксичної речовини шляхом декапітації на фоні ефірного наркозу.

З метою оцінки функціонального стану печінки визначали вміст аспаратамінотрансферази, аланінамінотрансферази, лужної фосфатази та  $\gamma$ -глутамілтранспептидази у сироватці крові тварин за допомогою біохімічного аналізатора BTS-370 (Іспанія).

Для визначення особливостей морфологічних проявів пошкодження, фіброзу та регенерації було проведено гістологічне дослідження. Для цього тканина печінки фіксувалась у 10% розчині формаліну, після чого

підлягала рутинній обробці. Основні гістологічні зміни досліджувались при забарвленні гематоксилін-еозином, для виявлення колагену застосовувався аніліновий синій (трихром Массона).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Statistica, для порівняння вибірок використовували t-критерій Стьюдента.

#### Результати та їх обговорення

Вивчення вмісту ферментів у сироватці крові дозволило виявити відмінності активності аспаратамінотрансферази, аланінамінотрансферази, лужної фосфатази та  $\gamma$ -глутамілтранспептидази у досліджуваних групах тварин (табл. 1).

При ураженні печінки, зумовленому одночасним застосуванням тетрахлорметану й етилового спирту спостерігалось статистично достовірне підвищення активності АЛТ, АСТ і ЛФ. Активність ГГТП при цьому не змінювалась. Введення тетрахлорметану двічі на тиждень призводило до статистично достовірного збільшення активності АЛТ, АСТ і ЛФ і не відбивалось на активності ГГТП. При тривалому застосуванні етилового спирту зростала активність АЛТ, АСТ та ГГТП. На відміну від двох попередніх моделей із застосуванням тетрахлорметану, введення етанолу не спричиняло змін активності ЛФ, але супроводжувалось зростанням ГГТП.

Установлені зміни ферментної активності печінки свідчать про те, що в усіх досліджуваних моделях токсичного ураження печінки спостерігались порушення її функціонального стану.

При дослідженні гістологічних змін у тканині печінки виділено дві групи процесів – пошкодження й загоєння з ознаками фіброзу, ангиогенезу й регенерації. В кожній з досліджуваних моделей ці зміни оцінювались окремо, їх аналіз представлено в таблицях 2 і 3.

Таблиця 1

#### Активність ферментів сироватки крові при різних моделях хронічного ураження печінки щурів

Групи тварин	АЛТ (од/л)	АСТ (од/л)	ЛФ (од/л)	ГГТП (од/л)
Контроль	155,0±30,1	171,6±24,5	275,1±49,6	39,8±17,4
Тетрахлорметан + етанол	260,4±39,2*	414,5±68,1*	704,9±21,7*	26,3±13,1
Тетрахлорметан	327,5±89,8*	359,9±79,9*	769,9±126,3*	38,2±18,7
Етанол	230,4±53,2*	290,7±46,1*	302,3±67,2	224,2±78,7*

Примітка: вірогідна різниця в порівнянні з групою контролю  $p < 0,01$ .

Таблиця 2

#### Морфологічні прояви пошкодження в досліджуваних групах тварин

Групи тварин	Мікровакуольні зміни цитоплазми гепатоцитів	Макровакуольні зміни цитоплазми гепатоцитів	Загибель клітин (некроз, апоптоз гепатоцитів)
Контроль	Поодинокі	Відсутні	Відсутні
Тетрахлорметан + етанол	Клітини з дрібними вакуолями у вигляді окремих вогнищ	Клітини з дрібними, великими вакуолями, гігантські гепатоцити з мультилокулярною цитоплазмою, дифузно розміщені у часточці	Множинні вогнищеві скупчення макрофагів на місці загиблих гепатоцитів, фігури апоптозу
Тетрахлорметан	Невеликі групи клітин з дрібними вакуолями	Вогнища з 2-3 клітин, які містять одну велику вакуоль, що виповнює всю цитоплазму	Поодинокі вогнищеві скупчення макрофагів на місці загиблих гепатоцитів, фігури апоптозу
Етанол	Помірно виражене переважно у перипортальних ділянках	Відсутні	Поодинокі клітини з ознаками цитолізу та апоптозу

**Морфологічні прояви загоєння в досліджуваних групах тварин**

Групи тварин	Склероз	Ангіогенез	Регенерація
Контроль	Відсутній	Відсутній	Відсутня
Тетрахлорметан + етанол	Розширення портальних трактів та поодинокі короткі септи	Поодинокі судини в септах	Проліферати овальних клітин, біліарного епітелію, синусоїдних клітин
Тетрахлорметан	Множинні септи, які з'єднують портальні тракти з формуванням псевдочасточок	Множинні судини у септах	Вогнищеві проліферати біліарного епітелію
Етанол	Поодинокі тонкі септи	Поодинокі судини в септах	Гіперплазія синусоїдних клітин та овальних клітин

Частина виявлених морфологічних проявів була розцінена як ознаки й, можливо, ступені вираженості пошкодження. Наявність дрібних вакуолей у клітині, особливо в гепатоцитах перипортальних відділів часточки, ймовірно асоціюється з незначним ступенем альтерації. Формування таких вакуолей може зумовлюватись нагромадженням ліпідів, рідини або глікогену. Великовакуольні зміни із зміщенням ядра на периферію клітини й гігантські мультилокулярні гепатоцити з центрально розміщеним ядром відповідають помірним ураженням. Наявність ознак загибелі клітин – вираженої еозинофілії цитоплазми з наступною фрагментацією клітини (апоптозу) або цитолізу й скупчення макрофагів на місці загиблих гепатоцитів свідчить про значний ступінь вираженості пошкодження.

Ознаки репарації включали прояви фіброзу з ангіогенезом і регенерації (проліферації паренхіматозних і синусоїдних клітин). Оскільки ці процеси в певному розумінні можна розцінювати як конкуруючі, кількісна оцінка проводилась окремо для кожного з них. Процеси фіброгенезу досліджено найповніше, тому їх можна легко оцінити кількісно, використовуючи принцип уже відомих шкал (Rivera С.А., 2001). Ангіогенез до певної межі відбиває тканинну реорганізацію та шунтування, тому ми вважали, що його потрібно описувати окремо, але виявлені прояви корелювали з фіброзом, ймовірно відображаючи спільні патогенетичні механізми. Крім

того, детальна оцінка ангіогенезу потребує застосування додаткових методів забарвлення (виявлення маркерів ендотелію). Про регенерацію відомо найменше, тому здійснено спробу врахувати в шкалі не тільки кількісні характеристики, а й якісні (тип проліферуючих клітин – синусоїдних, овальних клітин, гепатоцитів і біліарних епітеліоцитів).

Для уніфікації підходів розроблено шкалу напівкількісних змін, яка дозволила об'єктивізувати морфологічні описи й оцінити ступінь їх вираженості (рис. 1–3, кольор. вкладка 4). Запропонована шкала передбачає виділення трьох ступенів вираженості кожного з досліджуваних патологічних процесів – пошкодження, фіброзу та регенерації (табл. 4). Важливо, що такий підхід дає змогу оцінити кореляції між процесами пошкодження й різними патогенетичними варіантами загоєння. Це може мати значення при подальшому використанні запропонованих моделей.

Використання запропонованої шкали дозволяє оцінити досліджувані моделі в наступний спосіб: у групі з одночасним застосуванням тетрахлорметану й етилового спирту активність процесу була помірно вираженою, а загоєння відбувалась переважно за рахунок процесів регенерації; у групі з введенням тетрахлорметану активність і, особливо, пошкодження були значного ступеня вираженості, загоєння здійснювалось за рахунок вираженого фіброзу (стадія циротичної трансформації),

Таблиця 4

**Напівкількісна шкала для оцінки процесів пошкодження та загоєння при хронічних токсичних ураженнях печінки**

Патологічний процес	I ступінь	II ступінь	III ступінь
Пошкодження	Дрібні інтрацитоплазматичні вакуолі переважно у гепатоцитах перипортальних відділах часточки	Великовакуольні зміни із зміщенням ядра на периферію клітини та гігантські мультилокулярні гепатоцити з центрально розміщеним ядром	Скупчення макрофагів на місці загиблих гепатоцитів, фігури апоптозу, гепатоцити з вираженим цитолізом
Фіброз	Розширення портальних трактів та поодинокі короткі септи з дрібними судинами	Множинні тонкі септи з дрібними судинами, що формують нечіткі псевдочасточки	Широкі септи, які з'єднують портальні тракти із значною кількістю судин; формуванням чітких псевдо часточок
Регенерація	Гіперплазія синусоїдних клітин та овальних клітин	Вогнищеві проліферати овальних клітин та біліарного епітелію	Значні проліферати синусоїдних, овальних клітин, біліарного епітелію з формуванням просівів

однак регенераторна активність була незначною; в групі з тривалим застосуванням етилового спирту ступінь пошкодження був незначним, процеси загоєння теж мало виражені, з рівномірним розвитком фіброзу й регенерації. Оскільки в останніх із запропонованих моделей ступінь вираженості морфологічних змін був незначним, використання їх у подальших дослідженнях вважаємо недоцільним.

#### Висновки

1. Досліджувані чинники (тетрахлорметан і алкоголь) при хронічному введенні в різних комбінаціях зумовлюють характерні варіанти ураження тканини печінки й наступного їх прогресування.

2. Запропонована напівкількісна шкала дозволяє об'єктивізувати оцінку морфологічних змін у досліджуваних моделях, виявити кореляцію між ступенем альтеративних змін та ознаками загоєння.

3. Для аналізу особливостей процесів регенерації доцільніше використовувати модель з комбінованим застосуванням тетрахлоретану й алкоголю.

4. Модель із застосуванням лише тетрахлорметану, за якої спостерігалась циротична трансформація, більш придатна для вивчення фіброзу й ангиогенезу.

#### Література

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Дорошенко Е. Влияние смеси аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, таурина и триптофана на структуру печени и фонд свободных аминокислот у крыс при хронической алкогольной интоксикации и синдроме отмены алкоголя / Е.М.Дорошенко, Нефёдов Л.И., В.Ю.Смирнов [и др.] // Режим доступа : [http://www.nil.grsu.by/docs/uchlit/stat\\_vesBPA.doc](http://www.nil.grsu.by/docs/uchlit/stat_vesBPA.doc)
3. Albanis E. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy / E. Albanis, S.L. Friedman // Clin. Liver Dis. – 2001. – Vol. 5. – P. 315–334.
4. Bataller R. Liver fibrosis / R. Bataller // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 115. – P. 209–218.
5. Carthew P. A unique rodent model for both the cardiotoxic and hepatotoxic effects of prolonged iron overload / P. Carthew, B.M. Dorman, R.E. Edwards [et al.] // Lab Invest. – 1993. – Vol. 69. – P. 217–222.
6. Dunn M.A. Liver collagen synthesis in murine Schistosomiasis / M.A. Dunn, M. Rojkind, K.S. Warren [et al.] // J Clin Invest. – 1977. – Vol. 59. – P. 666–674.
7. French S.W. Intragastric ethanol infusion model for cellular

- and molecular studies of alcoholic liver disease / S.W. French // J Biomed Sci. – 2001. – Vol. 8 – P. 20–27.
8. Friedman S.L. Hepatic fibrosis 2006: report of the third AASLD single topic conference. S.L. Friedman., D.C.Rockey, D.M. Bissell // Hepatology. – 2007. – Vol. 45. – P. 242–249.
  9. George J. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: The early deposition of collagen / J. George, K.R.Rao, R.Stern [et al.] // Toxicology. – 2001. – Vol. 156. – P. 129–138.
  10. George J. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis / J. George, N. Pera, N.Phung [et al.] // J Hepatol. – 2003. – Vol. 39. – P. 756–764.
  11. Hammel P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct / P.Hammel // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 344. – P. 418–423.
  12. Hernandez-Munoz R. Adenosine reverses a preestablished CCl4-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats / R. Hernandez-Munoz, M. Diaz-Munoz, J.A.Suarez-Cuenca [et al.] // Hepatology. – 2001. – Vol. 34. – P. 677–687.
  13. Hinz S. Histological and biochemical changes induced by total bile duct ligation in the rat / S. Hinz, H.Franke, G. Machnik [et al.] // Exp Toxicol Pathol. – 1997. – Vol. 49. – P. 281–288.
  14. Hutterer F. Turnover of hepatic collagen in reversible and irreversible fibrosis / F. Hutterer, M. Eisenstadt, E. Rubin // Experientia. – 1970. – Vol. 26. – P. 244–245.
  15. Jonker A.M. Immunohistochemical study of hepatic fibrosis induced in rats by multiple galactosamine injections / A.M. Jonker, F.W. Dijkhuis, P.Moerkerk [et al.] // J Hepatology. – 1994. – Vol. 19. – P. 775–781.
  16. Leclercq I.A. Limited therapeutic efficacy of pioglitazone on progression of hepatic fibrosis in rats / I.A. Leclercq, C. Sempoux, P. Starkel [et al.] // Gut. – 2006. – Vol. 55. – P. 1020–1029.
  17. Muller A. Thioacetamide-induced cirrhosis-like lesions in rats - Usefulness and reliability of this animal model / A. Muller, F. Machnik, T. Zimmerman [et al.] // Exp Pathol. – 1988. – Vol. 34. – P. 229–236.
  18. Rivera C.A. Attenuation of CCl4-induced hepatic fibrosis by GdCl3 treatment or dietary glycine / C.A. Rivera, B.U. Bradford, K.J. Hunt [et al.] // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2001. – Vol. 281. – P. 200–207.
  19. Ueberham E. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF- $\alpha$  1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis / E. Ueberham, R.Low, U. Ueberham [et al.] // Hepatology. – 2003. – Vol. 37. – P. 1067–1078.
  20. Xu Z. Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia / Z. Xu, L. Chen, L.Leung [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 4120–4125.

#### Відомості про авторів:

Гаврилук О.М., доцент, к. мед. н., кафедра патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету.

Гаврилук І.М., доцент, к. мед. н., кафедра фармакології Львівського національного медичного університету.

Чикайло І.П., доцент, к. мед. н., кафедра фармакології Львівського національного медичного університету.

#### Адреса для листування:

Гаврилук Олена Михайлівна 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

Тел.: (0322) 769371, 786415, e-mail: elenalvua@yahoo.com

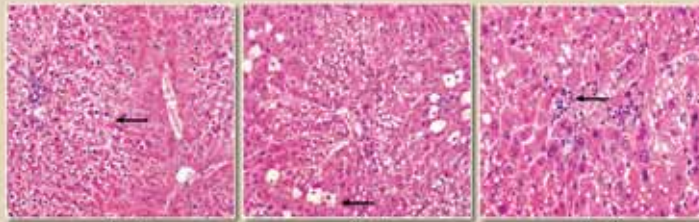


Рис. 1. Прояви пошкодження.  
 а. Мікроеваскулярні зміни гепатоцитів перипортальної зони. ГЕ x 200.  
 б. Вогнища з 2-3 клітин, які містять одну велику вакуолю, що вповнює всю цитоплазму гепатоцита з мультиполікулярною цитоплазмикою. ГЕ x 200.  
 с. Вогнища з скупченими макрофагами на місці загинблих гепатоцитів, виражена еозинофілія та фрагментація окремих гепатоцитів (апоптоз). ГЕ x 400.

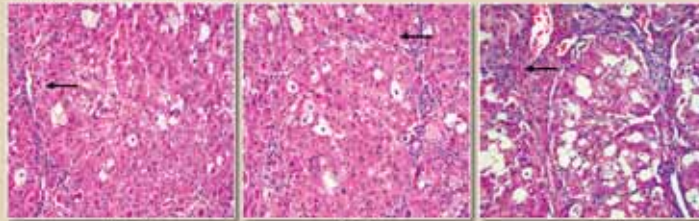


Рис. 2. Прояви фіброзу.  
 а. Розширення портальних трактів та утворення поздовжніх коротких септ. ГЕ x 200.  
 б. Міоживні тонкі септи з формуванням нечітких псевдоністочок. ГЕ x 200.  
 с. Широкі септи, які обмежують чіткі псевдоністочка (цери). ГЕ x 200.

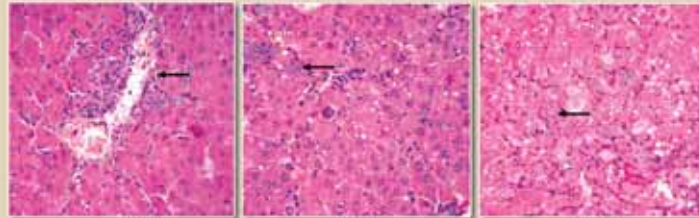


Рис. 3. Прояви регенерації.  
 а. Запальний інфільтрат та незвичайні плеїоморфні овальні клітини на межі портального тракту. ГЕ x 400.  
 б. Помірна плеїоморфія овальних клітин та мілярного апарату. ГЕ x 400.  
 с. Переважання плеїоморфії біліярного епітелію, місцями з утворенням просвітів. ГЕ x 400.

(Рис. 1а, 1б, 1с, 2а, 2б, 2с, 3а, 3б, 3с до статті О.М. Гаєрилюк, І.М. Гаєрилюк, І.П. Чикайло «Морфологічні прояви пошкодження та загоєння при хронічному токсичному ураженні печінки в експерименті» С. 90-93)