

© Рикало Н.А., Яровенко Л.О.

УДК: 615.099:591.436:599.323.4:577.164.3:577.112.385

Рикало Н.А., Яровенко Л.О.

Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова, кафедра патологічної фізіології (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ПРИ КОРЕКЦІЇ КВЕРЦЕТИНОМ ТА L-АРГІНІНОМ L-ГЛУТАМАТОМ

Резюме. Установлено, що за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації у щурів різного віку, розвивається ушкодження печінки, основою якого є некротично-дистрофічні зміни з переважанням жирової та білкової паренхіматозної дистрофії. Руйнування гепатоцитів внаслідок жирової дистрофії має більш локальний характер у старих тварин, порівняно зі статевонезрілими та молодими статевозрілими. Після проведеної патогенетичної корекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом відмічена морфологічна картина, яка у ряді випадків характеризувалась меншою інтенсивністю некротично-дистрофічних змін та зменшенням колагенових волокон, що підтверджує їх позитивну дію. Отримані результати досліджень свідчать про більш виразний гепатопротекторний ефект L-аргініну L-глутамату при експериментальному хронічному алкогольному ушкодженні печінки у порівнянні з кверцетином.

Ключові слова: печінка, хронічне алкогольне ушкодження, фіброз, морфологічні дослідження.

Вступ

В останні роки спостерігається тенденція до збільшення захворювань гепатобіліарної системи, що може бути зумовлено різноманітними факторами: вірусного походження, несприятливою екологічною ситуацією, неправильним харчуванням, а також токсичними речовинами [Наконечна та ін., 2014], алкоголь - одне із провідних місць [Зигало та ін., 2011]. Також прогресивно зростає кількість ускладнень хронічних захворювань печінки, таких як стеатоз, гепатит та цироз печінки [Гнатюк, Пришляк, 2005]. Діагностичні прийоми сьогодні включають не тільки клінічні, а і морфологічні методи, які дозволяють на перспективу оцінити резервні можливості печінки [Геращенко та ін., 2011], однак, у практиці морфологічним дослідженням приділяється значно менше уваги, що можна пояснити високим ризиком виникнення ускладнень при заборі матеріалу для біопсії, соціальним статусом та безсимптомним перебігом захворювань [Бабак і др., 2009; Гаврилюк, 2011]. Проте, в експериментальних дослідженнях морфологічна верифікація є одним із основних критеріїв ефективності медикаментозної корекції.

Як відомо, сучасні підходи до лікування патологій печінки передбачають застосування препаратів, хімічний склад яких є збалансованим та таким, котрий має політропну дію та дозволяє швидко досягати терапевтичного ефекту при найменшій вираженості побічної дії [Наконечна та ін., 2014]. Перспективними у даному аспекті є вивчення вітчизняних препаратів: кверцетину [Бабак і др., 2009; Rykalo, Androschuk, 2013] та L-аргініну L-глутамату [Скрипник та ін., 2012] при експериментальному моделюванні хронічного алкогольного ушкодження печінки (ХАУП) у щурів різних вікових періодів. Досліджень, котрі стосувались вікових особливостей ХАУП та ефективності застосування кверцетину та L-аргініну L-глутамату не проводили, а тому таке питання є актуальним.

Мета роботи - вивчити вікові особливості патоморфологічних змін тканини печінки щурів за умов хроні-

чної алкогольної інтоксикації та на тлі патогенетичної корекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом.

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 120 нелінійних білих щурах-самках трьох вікових груп: статевонезрілі тварини (1,5 міс., вихідна маса 60-80 г), молоді статевозрілі (6 міс., вихідна маса 180-220 г), старі тварини (20 міс., вихідна маса 300-320 г). Кожна вікова група була розподілена на 4 підгрупи по 10 тварин у кожній: інтактні тварини; тварини, яким моделювали ХАУП, за методикою Г.А.Ковальова [Ковалев, Петренко, 2004]; тварини з ХАУП при корекції кверцетином (100 мг/кг); тварини з ХАУП при корекції L-аргініном L-глутаматом (35 мг/кг). Перерахунок середньої терапевтичної дози ЕД₅₀ для кверцетину та L-аргініну L-глутамату на масу тіла щура проводили за константою біологічної активності за методикою Ю.Р.Риболовлева, запропонованої у 1979 р. Кратність та тривалість введення кверцетину та L-аргініну L-глутамату становили 12 тижнів.

Щурів виводили з експерименту одномоментною декапітацією під ефірною анестезією, вилучали печінку, яку фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, проводили через батарею спиртів висхідних концентрацій та занурювали в парафін. Для здійснення гістологічного дослідження мікротомні зрізи (5 мкм) забарвлювали гематоксиліном і еозином та пікрофусциновою сумішшю за Ван Гізон. Гістологічні мікропрепарати вивчали світлооптичними методами під мікроскопом "Olimpus BN-2" зі збільшенням від 100 до 400 разів та отримували цифрові фотокопії зображення. На зрізах печінки, пофарбованих гематоксиліном та еозином, проводили напівкількісну оцінку деяких ознак патологічного процесу: різних видів дистрофій, некротичних проявів, запальної реакції, судинних розладів, порушень гістоархітекτονіки за умов ХАУП та коригуючого впливу досліджуваних препаратів. При фарбуванні за Ван Гізон

аналізували наявність колагенових волокон.

Роботу з тваринами проводили відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) та вимог додатку 4 до "Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин", затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я № 755 від 12 серпня 1977 р. "Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин", що узгоджується з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985 р.).

Результати. Обговорення

Експериментальне дослідження та проведені оглядові гістологічні дослідження тканин печінки щурів усіх вікових груп встановили ознаки розвитку достатньо глибоких морфологічних змін, а саме наявність некротично-дистрофічних змін у структурі тканини печінки.

Доведено, що за умов моделювання ХАУП у щурів 1, 2 та 3 вікової групи виявлені виражені структурні зміни з різким порушенням часточкової будова паренхіми. Центральні вени та синусоїди, балкову організацію клітин не візуалізували. Гепатоцити перебували в стані вираженої дрібнокрапельної (1 та 2 групи тварин), вогнищевої великокрапельної (3 група) жирової та паренхіматозної білкової гідропічної дистрофії, частина їх були деформованими, з нечіткими контурами. Синусоїди візуалізувались слабо по всій величині часточки. Самі гепатоцити збільшувались у розмірах, переважно за рахунок розвитку дистрофії з деформацією ядер цитоплазматичними включеннями, що призводило до розвитку їх некротичних змін. Судини портальних трактів були значно розширеними, їх просвіти повністю вивчені еритроцитами. Порушення кровообігу потенціувало розвиток периваскулярного набряку, який у по-

єднанні з лімфо- та гістіоцитарною інфільтрацією поширювались по стромі. Місцева гіпоксія посилювала синтез колагенових волокон стромі. Імуногістохімічна реакція вказує, що у тварин усіх вікових груп з ХАУП характерним є значне формування колагенових волокон та формування фібротичних змін, переважно периваскулярних зонах портальних трактів, а у щурів 3 групи розростання колагенових волокон в стромі портальних трактів із проникненням її в паренхіму.

При гістологічному дослідженні печінки щурів з ХАУП на фоні корекції кверцетином, встановлено, що у тварин 1 групи видимі структурні зміни проявлялись переважно в централобулярних ділянках і характеризувались менш ушкодженою структурною організацією (рис. 1) у порівнянні з тваринами без лікування. В цілому часточкова структура залишалась порушеною, нерівномірне кровонаповнення синусоїдних капілярів візуалізувалось переважно навколо центральних вен. Переважна більшість гепатоцитів часточки мала виражені ознаки білкової та жирової дистрофії, ознаки некротизації зменшувались, проте залишалась велика кількість клітин зі структурно зміненими ядрами. У периферичних ділянках часточок з'являлись двоядерні гепатоцити, що свідчило про посилення регенераторної активності, індукованої дією препарату. Судини портальних трактів залишались розширеними, з різко вираженим повнокров'ям, периваскулярні простори інтенсивно інфільтрованими лімфо- та гістіоцитами. Слід відмітити зменшення зон некротизації, клітинної інфільтрації та периваскулярного набряку, у порівнянні з тваринами з ХАУП відповідного віку.

У тварин 2 вікової групи за умов застосування кверцетину відбувається часткове покращення структурної організації печінки. При цьому часточкова будова тканини порушується мало. Центральні вени та централобулярні синусоїди візуалізуються добре, в їх просвітах виявляються поодинокі еритроцити. Структура гепато-

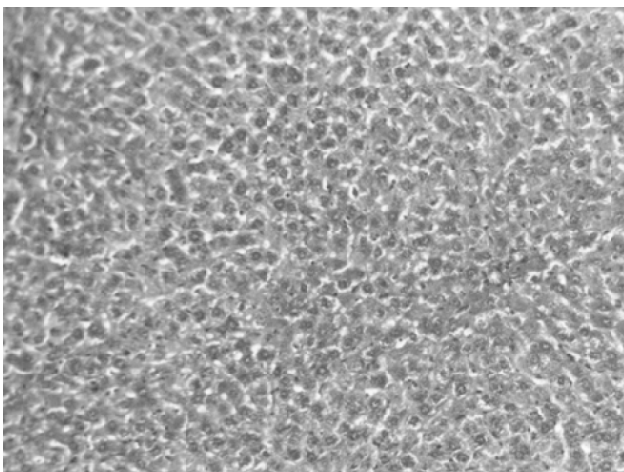


Рис. 1. Печінка щура 1 групи на тлі ХАУП та корекції кверцетином. Частково збережена структурна організація печінкової часточки. Гематоксилін-еозин. x100.

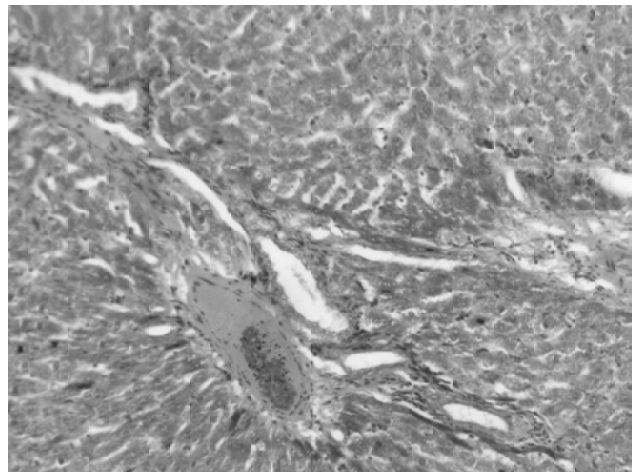


Рис. 2. Печінка щура 2 групи на тлі ХАУП та корекції кверцетином. Колагенові волокна переважно в стромі. Ван Гізон. x100.

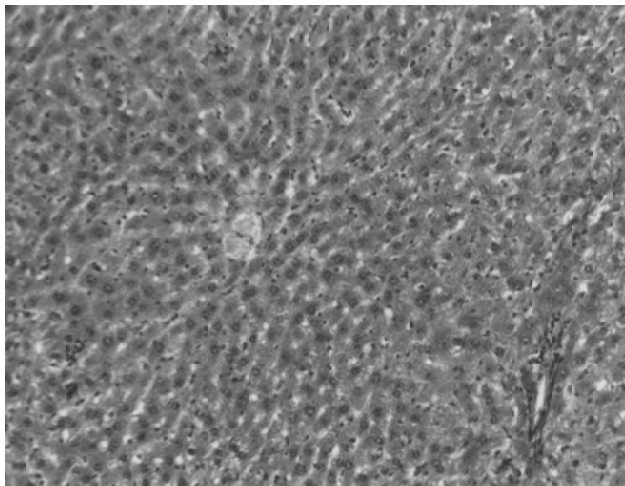


Рис. 3. Печінка щура 3 групи на тлі ХАУП та корекції кверцетином. Частково збережена структурна організація печінкової часточки. Гематоксилін-еозин. x100.

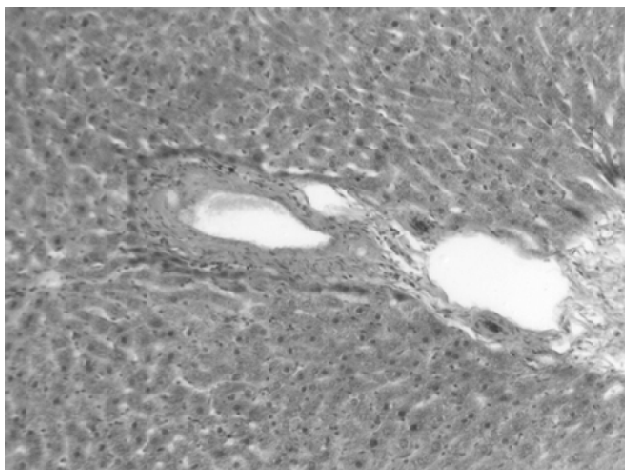


Рис. 5. Печінка щура 2 групи на тлі ХАУП та корекції L-аргініном L-глутаматом. Незначної кількості колагенових волокон переважно в судинному компоненті. Ван Гізон. x100.

цитів, у порівнянні із попередньою групою досліджень, вражається менше. Клітини переважно однакових розмірів, структуровані в балкову організацію, з відносно збереженими міжклітинними контактами, проте із проявами переважно білкової паренхіматозної дистрофії. Однак, слід відмітити зменшення проявів дистрофічних змін у порівнянні зі щурами без лікування. Судини портальних трактів залишались розширеними і повнокровними, периваскулярно мав місце набряк та помірна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, яка поширювалась у товщу часточки. Імуногістохімічна реакція вказує, що застосування кверцетину при ХАУП запобігає формуванню колагенових волокон строми печінки (рис. 2).

У щурів 3 вікової групи корекція ХАУП кверцетином також частково покращує структурний стан печінки (рис. 3). При цьому спостерігається відновлення балкової організації гепатоцитів, контури та кровонаповнення центральних вен зменшуються. Розміри переважної більшості клітин набувають однотипного характеру, проте їх ци-

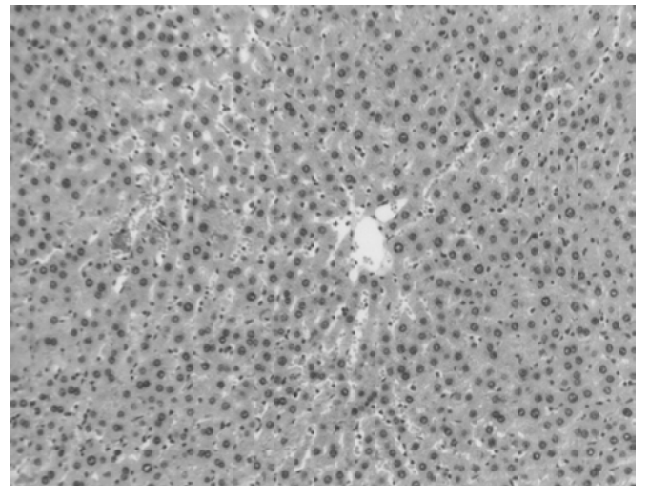


Рис. 4. Печінка щура 1 групи на тлі ХАУП та корекції L-аргініном L-глутаматом. Різде зменшення дистрофічних проявів. Гематоксилін-еозин. x100.

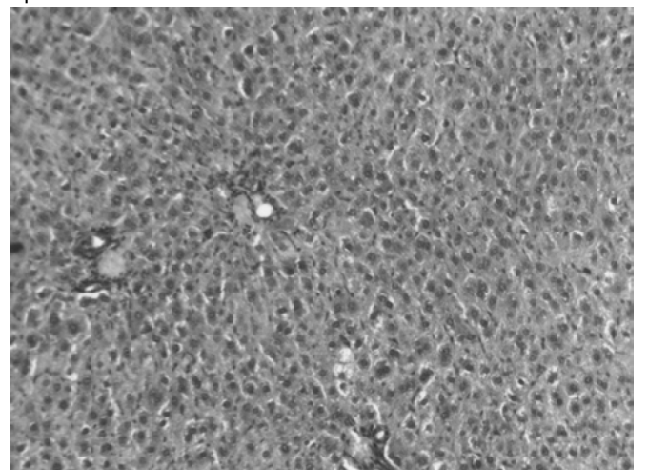


Рис. 6. Печінка щура 3 групи на тлі ХАУП та корекції L-аргініном L-глутаматом. Помірні дистрофічні зміни. Гематоксилін-еозин. x100.

топлазма дрібнозерниста, із різною інтенсивністю сприйняття барвників. Ядра візуалізуються у переважній більшості клітин, проте контури їх нечіткі, окремі просвітлені, або різко зменшені в розмірах. Просвіти синусоїдів візуалізуються в окремих полях зору, містять поодинокі еритроцити та помірну кількість макрофагів.

Просвіти судин портальних трактів дещо зменшуються, що відповідно, зменшує розвиток периваскулярного набряку. В стромі органа, особливо в судинних компонентах виявлялась достатня кількість сформованих колагенових волокон.

Встановлено, що корекція кверцетином ХАУП запобігає та структурно зменшує формування колагенових волокон строми печінки у всіх вікових групах, у порівнянні з нелікованими щурами, що свідчить про протекторну дію даного препарату. Отримані результати експериментального дослідження узгоджуються із даними О.Я.Бабака, оскільки підтверджено, що кверцетин проявляє гепатопротекторну дію, цитостатичну,

антипроліферативну (інгібує інсуліноподібний фактор росту-1, апоптоз та онкогени і гени, які контролюють клітинний цикл) та антифібротичну [Бабак и др., 2009].

При проведенні патогенетичної корекції ХАУП L-аргініном L-глутаматом у щурів 1 групи виявлено, що структура паренхіми пошкоджувалась мало. Звертає на себе увагу значно менші дистрофічні прояви (рис. 4). Цитоплазма гепатоцитів переважно гомогенна за структурою, однорідна. Ядра, переважно гіперхромні, візуалізуються практично у всіх клітинах, їх діаметр збільшений. Центральні судини дещо розширені, проте малокровні, в окремих полях зору виявлявся незначний периваскулярний набряк. Лімфо- та гістіоцитарна інфільтрація була мінімальною. Синусоїди централобулярних зон теж дещо розширені, містять поодинокі еритроцити та незначну кількість макрофагів. Балкова організація залишалась збереженою лише в окремих полях зору. Некротичні зміни клітин були мінімальними. По всій величині часточки добре візуалізувались двоядерні гепатоцити, що вказує на протекторну дію L-аргініну L-глутамату. Про покращення структурних змін свідчить і незначна кількість колагенових волокон строми.

У 2 групі щурів використання L-аргініну L-глутамату з метою гепатопротекції показало, що ефективність його переважала у централобулярних ділянках печінкових часточок. Гістологічно найменші зміни в гепатоцитах були виявлені навколо центральних вен. Самі ж судини практично не розширювались, еритроцити в них не візуалізувались. Проте в інших ділянках, як в центральних і перипортальних полях в клітинах виявлялась виражена жирова та незначна білкова дистрофія. Про різке зростання регенераторних змін свідчило збільшення двоядерних гепатоцитів у порівнянні з дією кверцетину. Портальні тракти все ще залишались розширеними завдяки помірній лімфо- та гістіоцитарній інфільтрації та периваскулярного набряку.

Про покращення структурних змін свідчить і незначна кількість колагенових волокон строми (рис. 5). Таким чином, наявність незначної кількості колагенових волокон (див. рис. 5), переважно в судинному компоненті і відсутність їх у стромальних елементах органа свідчить про високу гепатопротекторну дію L-аргініна L-глутамата.

Застосування L-аргініну L-глутамату у тварин 3 вікової групи також сприяло структурному відновленню тканини печінки. Візуально в гепатоцитах зменшились ознаки жирової дистрофії, проте вогнищеве просвітлення цитоплазми свідчить про наявність білкової дистрофії. Часточкова структура печінки та балкова організація залишались порушеними (рис. 6). Синусоїди візуалізувались слабо. Контури клітин були різними, міжклітинні контакти частково порушеними. Портальні тракти зали-

шались розширеними за рахунок нерівномірного кровонаповнення судин та помірної лімфо- та гістіоцитарної інфільтрації у поєднанні із потовщеними стінками судин та строми за рахунок формування колагенових волокон.

Таким чином, у проведених нами гістологічних дослідженнях виявлено, що L-аргінін L-глутамат сприяє більш ефективному та інтенсивному відновленню структурних компонентів печінки та зменшенню колагенових волокон в умовах хронічної токсичної дії алкоголю. Отримані дані співзвучні з літературними даними О.С.-Хухніної, які вказують на нормалізацію обміну сполучної тканини при хронічній патології печінки алкогольного та неалкогольного ґенезу за умов застосування L-аргініна L-глутамата, за рахунок гальмування синтезу колагену та глікозаміногліканів та посилення продукції протеогліканів з антиоксидантними властивостями [Хухніна, 2004].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Установлено, що у щурів різних вікових груп за умов ХАУП розвивається ушкодження печінки, яке морфологічно виражається некротично-дистрофічними змінами з переважанням жирової та білкової паренхіматозної дистрофії та значним формуванням колагенових волокон. За однакових умов експерименту вразливими до токсичної дії етанолу є статевонезрілі та старі тварини, оскільки морфологічні зміни структури печінки характеризувались більш локальними дистрофічними змінами гепатоцитів, порівняно із молодими статевозрілими тваринами.

2. На тлі введення етанолу в печінці щурів всіх вікових груп спостерігається розростання колагенових волокон з розвитком фіброзу. Доведено, що кверцетин та L-аргінін L-глутамат за умов ХАУП проявляють антифібротичний ефект.

3. Проведені гістологічні дослідження доводять, що гепатопротектор L-аргінін L-глутамат сприяє більш ефективному та інтенсивному відновленню структурних компонентів печінки при ХАУП у порівнянні із кверцетином свідченням чого є значне зменшення некротичних проявів, зниження виразності жирової та білкової дистрофій паренхіми печінки, зменшення фіброзу та прискорення процесів відновлення гепатоцитів.

Поряд із виявленими патоморфологічними змінами гістоструктури печінки доцільним є проведення досліджень щодо стану функціональної активності печінки та процесів репаративної регенерації у щурів різного віку за умов ХАУП. Крім того, вивчення дії препаратів при ХАУП дозволить у подальшому удосконалити та оптимізувати антифібротичну терапію.

Список літератури

Бабак О.Я. Фиброз печени: современные представления о механизмах, способах диагностики и лечения /

О.Я.Бабак, Е.В.Колесникова, Н.А.Кравченко //Сучасна гастроентерол.- 2009.- №2 (46).- С.5-15.

Гаврилюк О.М. Особливості стромально-паренхіматозних співвідношень при цирозі печінки різної етіології /

- О.М.Гаврилюк //Патологія.- 2011.- Т.8, №1.- С.83-85.
- Герашенко С.Б. Значення комп'ютерної морфометрії в діагностиці хронічного гепатиту з синдромом холестазу /С.Б.Герашенко, О.І.Дельцова, А.Д.Захарич //Вісник проблем біол. і мед.- 2011.- Вип.2, Т.2.- С.52-55.
- Гнатюк М.С. Морфофункціональні особливості секреторної активності миокарда при токсических поражениях /М.С.Гнатюк, А.М.Пришляк // Нейроэндокринология.- Санкт-Петербург: Аграф, 2005.- С.148-150.
- Ковалёв Г.А. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс /Г.А.Ковалёв, А.Ю.Петренко //Вісник Харківського нац. унів.-та.- 2004.- №617.- С.15-18.
- Кореляційні паралелі в оптимізації діагностики фіброзу печінки /Е.В.Зигало, Т.В.Майкова, Н.Г.Гравіровська [та ін.] //Науковий вісник Ужгородського унів., серія "Медицина".- 2011.- №2 (41).- С.308-311.
- Наконечна С.С. Дослідження впливу густого екстракту фіалки на морфологічну структуру печінки щурів за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту /С.С.Наконечна, С.М.Марчишин, В.П.Пида //Здобутки клініч. і експерим. мед.- 2014.- С.79-83.
- Скрипник І.М. Комплексна оцінка впливу глутаргіну на функціональний стан печінки у хворих на хронічний токсичний гепатит алкогольної етіології /І.М.Скрипник, Г.В.Невойт, І.І.Дегтярьова //Гастроентерология.- 2012.- Т.6, №3.- С.22-24.
- Хухліна О.С. Зміни показників сполучної тканини у хворих на стеатогепатит алкогольного та неалкогольного генезу та їх корекція глутаргіном /О.С.Хухліна //Лікар. справа.- 2004.- №7.- С.25-28.
- Rykalo N. A. Research of the anticytolytic and anticholestatic activity of thiotriazoline and quercetin in chronic drug-induced hepatitis in immature rats /N.A.Rykalo, O.V.Androschuk //Клініч. фармація.- 2013.- Т.17, №4.- С.38-40.

Рыкало Н.А., Яровенко Л.А.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ПРИ КОРРЕКЦИИ КВЕРЦЕТИНОМ И L-АРГИНИН L-ГЛУТАМАТОМ

Резюме. Установлено, что в условиях экспериментальной хронической алкогольной интоксикации у крыс разного возраста, развивается поражение печени, основой которого является некротическо-дистрофические изменения с преобладанием жировой и белковой паренхиматозной дистрофии. Разрушение гепатоцитов вследствие жировой дистрофии имеет более локальный характер у старых крыс, по сравнению с неполовозрелыми и молодыми половозрелыми. После проведенной патогенетической коррекции кверцетином и L-аргинином L-глутаматом отмечалась морфологическая картина, которая в ряде случаев характеризовалась меньшей интенсивностью некротическо-дистрофических изменений, что подтверждает их положительное действие. Полученные результаты исследований свидетельствуют о более выраженном гепатопротекторном эффекте L-аргинина L-глутамата при экспериментальном хроническом алкогольном повреждении печени по сравнению с кверцетином.

Ключевые слова: печень, хроническое алкогольное повреждение, фиброз, морфологические исследования.

Rykalo N.A., Yarovenko L.A.

PATHOLOGICAL CHANGES IN RATS LIVER OF DIFFERENT AGES WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION AND AFTER CORRECTION BY QUERCETIN AND L-ARGININE-L-GLUTAMATE

Summary. Established that under conditions of experimental chronic alcoholic intoxication in rats of different ages develop liver disease, which is based on necrotic and dystrophic changes with prevalence of fat and protein intracellular degeneration. The hepatocytes destruction caused by pulverulent fat and intracellular protein degenerations have more locally character in the old animals in compare with the immature and mature young animals. After pathogenetic correction by quercetin and L-arginine-L-glutamate was observed next morphological changes, which in some cases were characterized by lower intensity of necrotic and dystrophic change and a decrease in collagen fibers, which confirm the positive impact of the selected remedy. The obtained results show that L-arginine-L-glutamate has more hepatoprotective effect in rats with chronic alcoholic liver disease, compared with quercetin.

Key words: liver, chronic alcoholic liver disease, fibrosis, morphological study.

Рецензент: д.мед.н., професор Костюк Г.Я.

Стаття надійшла до редакції 20.05.2015 р.

Рыкало Надія Анатоліївна - д.мед.н., доцент, завідувач кафедри патологічної фізіології ВНМУ ім.М.І.Пирогова; rikalo77@mail.ru
Яровенко Людмила Олександрівна - ст. лаборант кафедри патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова; + 38 096 870-43-51; yarovenk_o@mail.ru

© Бабий А.М.

УДК: 591.4+616.37+599.323.001.6

Бабий А.М.

ГУ "Институт гастроэнтерологии НАМН Украины" (просп. Правды, 96, г.Днепропетровск, 49000, Украина)

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА ОКСИДА АЗОТА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме. Исследование проведено на 40 крысах-самцах линии Wistar после ежедневного внутрибрюшинного введения донатора готовых молекул оксида азота (NO) натрия нитропруссиды производства "Реахим" (Украина) в дозе 1,5 мг/кг через 1 сутки (n=6); 2 суток (n=6); 6 суток (n=6); 12 суток (n=6); 30 суток (n=6). Установлено, что избыточное поступление NO приводит к морфологическим изменениям поджелудочной железы (ПЖ): вазодилатации со стазом форменных элементов крови через 1 и 2 суток; очаговому некрозу, деструкции ацинарной ткани, дилатации протоков с ухудшением оттока