

УДК 613.81:591.8:591.436:599.323.4

Л. О. ЯРОВЕНКО

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

ПОКАЗНИКИ МОРФОМЕТРИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ НА ТЛІ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ ТА L-АРГІНІНУ L-ГЛУТАМАТУ

Висвітлені зміни морфометричних параметрів тканини печінки у щурів-самиць різних вікових періодів на тлі хронічного алкогольного ушкодження печінки та фармакокорекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом в експерименті. Результати показали, що хронічне алкогольне ушкодження печінки супроводжується морфометричними змінами діаметра гепатоцитів, їх ядер, ядерно-цитоплазматичного відношення, стромально-паренхіматозного відношення, відносного об'єму ушкоджених клітин печінки та відносно об'єму двоядерних гепатоцитів. За даними морфометрії найбільших змін паренхіма печінки зазнала у статевонезрілих та старих тварин. Більш виражений гепатопротекторний ефект на структуру печінки проявляє L-аргінін L-глутамат, що підтверджено наявністю низки сильних прямих кореляційних зв'язків.

Ключові слова: хронічне алкогольне ушкодження печінки; морфометричний аналіз; кверцетин; L-аргінін L-глутамат

ВСТУП

Незважаючи на успіхи у діагностиці патологій печінки, на сьогодні існує гостра потреба у більш точних методах діагностики для прогнозу патогенезу та прогресування печінкової недостатності. Морфологічні методи, морфометричний аналіз дозволяють оцінити стан тканини печінки, ступінь ушкодження гепатоцитів та резервні можливості, тобто здатність печінки до репаративної регенерації, крім того з'ясувати ефективність застосування лікарських засобів. Сьогодні в медико-біологічних дослідженнях широко використовують морфометричні методи, які дозволяють більш глибоко вивчити кількісні особливості фізіологічних та патологічних процесів і гістологічно пояснити їх [1]. Дана система морфометричного дослідження широко використовується та має міжнародне визнання [2, 3], тому актуальним є дослідження морфометричних показників печінки щурів при хронічному алкогольному ушкодженні печінки (ХАУП), які дозволять з'ясувати закономірності морфогенезу та об'єктивно оцінити морфоструктуру тканини печінки за умов ХАУП та визначити коригувальний вплив кверцетину та L-аргініну L-глутамату. Необхідно зазначити, що зміни морфометричних параметрів тканини печінки у щурів-самиць різних вікових груп за умов ХАУП вивчені недостатньо [4] та потребують подальшого дослідження.

Мета роботи: вивчити вікові особливості зміни морфометричних показників гепатоцитів у щурів різних вікових груп за умов ХАУП та фармакокорекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено експериментальне дослідження на 120 білих безпородних щурах-самицях. Залежно від мети в експеримент входили тварини 3 вікових періодів: статевонезрілі, молоді статевозрілі та старі тварини. Кожна вікова група була розподілена на 4 підгрупи: інтактні тварини (n=10); тварини, яким моделювали ХАУП (n=10) за методикою Г. А. Ковальова (2004) [5]; тварини з ХАУП при корекції кверцетином (100 мг/кг; n = 10); тварини з ХАУП при корекції L-аргініном L-глутаматом (35 мг/кг; n = 10).

Утримання щурів і маніпуляції 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.).

© Яровенко Л. О., 2016

Матеріалом експериментального дослідження була печінка дослідних тварин. Евтаназію щурів здійснювали в умовах легкого ефірного наркозу. Вирізували шматочки печінки, які фіксували в 10,0 % нейтральному розчині формаліну, після проведення через етилові спирти поміщали в парафін. Мікромомні зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином за Ван Гізоном. Гістологічні мікропрепарати досліджували світлооптично та морфометрично [1, 6]. Визначали такі показники: діаметри гепатоцитів, діаметри їхніх ядер, ядерно-цитоплазматичні відношення, стромально-паренхіматозне відношення в досліджуваних клітинах печінки, відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів, відносний об'єм двоядерних гепатоцитів. Отримані цифрові величини обробляли статистично з використанням непараметричних методів оцінки, достовірними вважали ймовірність похибки менше 5 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих морфометричних параметрів показав, що дистрофічні та некротичні зміни клітин печінкової паренхіми, які зустрічались у щурів з ХАУП, проявились вираженими структурними змінами гепатоцитів, вони були деформованими з нечіткими контурами, діаметр гепатоцитів при цьому збільшився: у щурів 1-ї групи на 16,7 % ($p < 0,001$), у тварин 2-ї групи – на 23,5 % ($p < 0,001$) та у щурів 3-ї групи – на 19,5 % ($p < 0,001$) у порівнянні з інтактними значеннями ідентичних за віком тварин. Переважна більшість клітин перебувала у фазі некротичних змін, тому діаметр ядер гепатоцитів зменшувався: у 1-ї групі на 37,8 % ($p < 0,001$), у 2-ї групі – на 9,5 % ($p > 0,05$) та 3 групі – на 35,4 % ($p < 0,001$).

Описані деструктивні зміни гепатоцитів знайшли своє відображення у значному збільшенні відносного об'єму пошкоджених гепатоцитів, який у 1-ї групі тварин становив $90,45 \pm 1,31$ % ($p < 0,001$) проти $2,23 \pm 0,09$ % інтактних щурів, у 2-ї групі – $86,74 \pm 1,67$ % ($p < 0,001$) проти $3,07 \pm 0,32$ % ($p < 0,001$) та у 3 групі – $89,63 \pm 1,46$ % ($p < 0,001$) проти $4,75 \pm 0,23$ %; різко зменшувалось ядерно-цитоплазматичне відношення на 73,4 % ($p < 0,001$) у тварин 1-ї групи, на 50,7 % ($p < 0,001$) у щурів 2-ї групи та на 73 % ($p < 0,001$) у 3-ї групі тварин. Узагальнюючим комплексним індикатором описаних вище патологічних змін печінкової тканини можна вважати стромально-паренхіматозний індекс, який при моделюванні ХАУП збільшувався і становив $0,159 \pm 0,016$ ($p < 0,001$) проти інтактних значень $0,062 \pm 0,004$ у щурів 1-ї вікової групи, у 2-ї групі – $0,184 \pm 0,021$ ($p > 0,05$) проти $0,133 \pm 0,015$ та у 3-ї групі – $0,203 \pm 0,014$ ($2 p < 0,01$) проти $0,174 \pm 0,016$. Таким чином, у 1-ї групі збільшувався даний індекс майже у 2,5 рази, у 2-ї групі – на 38,3 % та у 3-ї – на 16,7 %. Отримані дані є підтвердженням збільшення частки стромальних структур та загибелі гепатоцитів зі зменшенням об'єму паренхіми.

Регенераторна активність у щурів 1-ї групи при ХАУП була низькою у порівнянні з інтактом, що підт-

верджується відносним об'ємом двоядерних гепатоцитів $2,99 \pm 0,13$ ($p < 0,001$) проти інтактних значень $8,27 \pm 0,30$, таким чином, відбувалось зменшення на 63,8 %. У щурів 2-ї та 3-ї груп спостерігалось навпаки збільшення відносного об'єму двоядерних гепатоцитів на 70,3 % ($p < 0,001$) та на 18,3 % ($p < 0,001$) у порівнянні з інтактними значеннями ідентичних за віком тварин, що, на нашу думку, пояснює активацію компенсаторних механізмів у відповідь на пошкодження гепатоцитів. При проведенні кореляційного аналізу встановлена наявність достовірних прямих сильних кореляційних зв'язків (у кількості 15) між морфометричними параметрами у щурів усіх вікових груп за умов ХАУП, що доводить зв'язок досліджуваних показників зі ступенем ушкодження печінки.

За умов фармакокорекції кверцетином у щурів 1-ї групи переважна більшість гепатоцитів мала виражені ознаки дистрофії, що складало $30,84 \pm 1,63$, $p < 0,001$ у порівнянні з показниками ХАУП, проте відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів зменшувався на 65,9 % ($p < 0,001$) у порівнянні із тваринами з ХАУП. Ознаки некрозів дещо зменшувались, діаметри ядер гепатоцитів збільшувались на 44,2 % ($p < 0,001$), ядерно-цитоплазматичне відношення збільшувалось у 2,5 рази ($p < 0,001$), стромально-паренхіматозне співвідношення зменшувалось на 35,2 % ($p < 0,01$) в порівнянні з тваринами з ХАУП. У периферичних ділянках часточок з'являлись двоядерні гепатоцити, відносний об'єм яких зростає на 93,6 % ($p < 0,001$), що свідчить про посилення регенераторної активності.

У щурів 2-ї групи при застосуванні кверцетину відносний об'єм пошкоджених гепатоцитів також зменшувався на 48 % ($p < 0,001$), однак діаметр гепатоцитів та їх ядер незначно різнився відносно показників щурів з ХАУП, показник стромально-паренхіматозного відношення мав тенденцію до зниження і становив $0,171 \pm 0,008$; також слід відмітити незначне збільшення відносного об'єму двоядерних гепатоцитів у тварин 2-ї групи, яке становило $14,14 \pm 0,70$ %.

У щурів 3-ї групи кверцетин також частково покращує структурний стан паренхіми печінки, наявні дистрофічні зміни, а діаметр гепатоцитів становить $16,51 \pm 0,38$ мкм, що лише на 2 % менше за показники щурів з ХАУП. Ядра зменшені в розмірах, їх діаметр становить $3,11 \pm 0,17$ мкм, що на 2 % більше за показник з ХАУП. Відносний об'єм пошкоджених гепатоцитів зменшується на 34,9 % та становить $58,32 \pm 1,09$ ($p < 0,001$) у порівнянні з показниками щурів з ХАУП даної вікової групи. Стромально-паренхіматозне відношення та ядерно-цитоплазматичне відношення в тканині даної досліджуваної групи незначно різнилися від показників щурів з ХАУП. Відносний об'єм двоядерних гепатоцитів незначно збільшувався на 7,0 %. Встановлена наявність між морфометричними параметрами щурів при патогенетичній корекції кверцетином низки достовірних сильних прямих зв'язків: у 1-ї групі – 8, у 2-ї та 3-ї – по 15 ($p < 0,05$).

За умов застосування L-аргініну L-глутамату спостерігали різке зменшення дистрофічних проявів, про

що свідчить зменшення у тварин 1-ї вікової групи діаметра клітин на 10,0 % ($p < 0,05$) та збільшення їх діаметра ядра на 68,2 % ($p < 0,001$), а також стрімке зростання та нормалізація ядерно-цитоплазматичного відношення у порівнянні з ХАУП. Також спостерігали зменшення стромально-паренхіматозного відношення на 42,8 % до $0,091 \pm 0,014$ ($p < 0,01$). Некротичні зміни клітин були мінімальними, відносний об'єм двоядерних гепатоцитів зростав у 4 рази ($p < 0,001$). Відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів зменшувався на 83,9 %. Таким чином, можна відмітити позитивний вплив на гістоморфометричні показники у тварин 1-ї групи гепатопротектора L-аргініну L-глутамату.

У 2-ій групі за умов використання L-аргініну L-глутамату ядерно-цитоплазматичне відношення збільшувалось, що свідчить про гепатопротекторну дію препарату, однак відносний об'єм пошкоджених гепатоцитів хоча і зменшувався у 3 рази та становив $27,82 \pm 0,67$ ($p < 0,001$), однак так і не досягав інтактних значень ідентичних за віком тварин. Про посилення регенераторної активності свідчить збільшення на 33,7 % ($p < 0,001$) відносного об'єму двоядерних гепатоцитів та зменшення стромально-паренхіматозного відношення на 18,5 %.

У щурів 3-ї групи також L-аргінін L-глутамат сприяв структурному відновленню тканини печінки. Діаметр гепатоцитів незначно зменшувався на 5,0 %, діаметр ядер зростав на 16,1 %, що значно перевищує даний показник тварин із корекцією кверцетином і становить $3,54 \pm 0,18$ ($p < 0,05$). Відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів зменшувався на 55,2 % у порівнянні з групою щурів з ХАУП, проте все ще залишався високим і становив $40,17 \pm 1,56$ ($p < 0,001$). Відносний об'єм двоядерних гепатоцитів збільшувався на 16,7 %, що значно краще, ніж у групі тварин із корекцією кверцетином. Проведений кореляційний аналіз взаємозв'язків між морфометричними параметрами показав наявність достовірних прямих сильних кореляційних зв'язків за умов корекції ХАУП L-аргініном L-глутаматом, а саме: у тварин 1-ї групи встановлено 10 кореляційних зв'язків, у щурів 2-ї та 3-ї групи – по 15 кореляційних зв'язків між досліджуваними морфометричними показниками, що, на нашу думку, може вказувати на більшу ефективність гепатопротектора L-аргініну L-глутамату.

Таким чином, у результаті проведених морфометричних досліджень встановлено, що L-аргінін L-глутамат сприяє більш ефективному відновленню морфометричних параметрів паренхіми печінки в умовах хронічної токсичної дії алкоголю та активує процеси репаративної регенерації печінкової тканини.

ВИСНОВКИ

Отже, за умов моделювання ХАУП у щурів доведено наявність достовірних суттєвих змін гісто-морфометричних параметрів печінкової тканини, що вка-

зує на її глибокі морфофункціональні зміни: збільшення діаметра гепатоцитів, стромально-паренхіматозного відношення та відносного об'єму двоядерних гепатоцитів, зменшення діаметра їх ядер, ядерно-цитоплазматичного відношення та відносного об'єму двоядерних гепатоцитів. Інтенсивність перерахованих структурних змін у печінці щурів є більш вираженою у статевонезрілих і старих тварин.

Наші дослідження свідчать, що за умов застосування кверцетину та L-аргініну L-глутамату морфофункціональні властивості відновлюються, зменшується об'єм пошкоджених клітин та активуються процеси репаративної регенерації. Більш виражений гепатопротекторний ефект на структуру печінки та морфометричні параметри проявляє L-аргінін L-глутамат, на що ще вказує наявність великої кількості достовірних прямих сильних кореляційних зв'язків.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Балльная система оценки морфологических изменений печени при хроническом гепатите // РЖГК. – 2004. – № 2. – С.4-8.
3. Геращенко С. Б. Значения компьютерной морфометрии в диагностике хронического гепатита с синдромом холестаза / С. Б. Геращенко, О. І. Дельцова, А. Д. Захарич // Вісник проблем біол. і медицини. – 2011. – Т. 2, вип. 2. – С. 52-55.
4. Гнатюк М. С. Морфофункціональні особливості секреторної активності міокарда при токсичних поражениях / М. С. Гнатюк, А. М. Пришляк. – Нейроендокринолог. – С.Пб.: Аграф, 2005. – С. 148-150.
5. Ковалёв Г. А. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс / Г. А. Ковалёв, А. Ю. Петренко // Вісн. Харк. нац. унів. – 2004. – № 617. – С. 15-18.
6. Сорочинников А. Г. Гистологическая и микроскопическая техника / А. Г. Сорочинников, А. Е. Дорошевич. – М.: Медицина, 1997. – 448 с.
7. Avtandilov G. G. Fundamentals of quantitative pathological anatomy. – М.: Medicine, 2002. – 240 p.
8. Gerashchenko S. B. The value of computer morphometry in the diagnosis of chronic hepatitis with cholestasis syndrome / S. B. Gerashchenko, A. I. Dyeltsova, A. D. Zaharych // Bull. problems of boil. and medicine. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 52-55.
9. Hnatiuk M. S. Morphological and functional features of the secretory activity of myocardial toxic lesions / M. S. Hnatiuk, A. M. Prishlyak // Neuroendocrinol. – 2005. – P. 148-150.
10. Kovalev G. A. Experimental model of alcoholic liver injury in female rats / G. A. Kovalev, A. Y. Petrenko // Visn. Khark. Nat. Univ. – 2004. – № 617. – P. 15-18.

11. Scoring System assessment of morphological changes of the liver in chronic hepatitis // RZHGG. – 2004. – № 2. – P. 4-8.
12. Sorochinnikov A. G. Histological and microscopic machinery / A. G. Sorochinnikov, A. E. Dorosevich // Medicine. – 1997. – P. 448.

УДК 613.81:591.8:591.436:599.323.4**Л. А. Яровенко****ПОКАЗАТЕЛИ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА И L-АРГИНИНА L-ГЛУТАМАТА**

Представлены изменения морфометрических параметров ткани печени у крыс-самок разных возрастных периодов на фоне хронического алкогольного повреждения печени и фармакокоррекции кверцетином и L-аргинином L-глутаматом в эксперименте. Результаты показали, что хроническое алкогольное повреждение печени сопровождается морфометрическими изменениями диаметра гепатоцитов, их ядер, ядерно-цитоплазматического отношения, стромально-паренхиматозного отношения, относительного объема поврежденных клеток печени и относительного объема двухъядерных гепатоцитов. По данным морфометрии наибольших изменений паренхима печени претерпела у неполовозрелых и старых животных. Более выраженный гепатопротекторный эффект на структуру печени проявляет L-аргинин L-глутамат, что подтверждено наличием ряда сильных прямых корреляционных связей.

Ключевые слова: хроническое алкогольное повреждение печени; морфометрический анализ; кверцетин; L-аргинин L-глутамат

UDC 613.81:591.8:591.436:599.323.4**L. A. Yarovenko****DATA OF LIVER TISSUE MORPHOMETRIC INVESTIGATION OF THE RATS OF DIFFERENT AGES ON THE BASE OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION AND AFTER QUERCETIN AND L-ARGININE L-GLUTAMATE INTRODUCTION**

This article contains data about morphometric parameters of studies liver tissue in rats of different age periods females with chronic alcoholic liver disease and on the background of pathogenetic correction using quercetin and L-arginine-L-glutamate in the experimental conditions. Results showed that chronic alcoholic liver disease accompanied by morphometric changes of the hepatocytes' diameter and their nuclei, nuclear-cytoplasmic ratio, stromal-parenchymatous ratio, the related volume of damaged hepatocytes and related volume of dual-core hepatocytes. According to morphometry, the biggest changes undergone liver parenchyma in immature and old animals. More pronounced hepatoprotective effect on the structure of the liver showing L-arginine L-glutamate, which is confirmed by the presence of a number of strong direct correlation.

Key words: chronic alcoholic liver disease; morphometric analysis; quercetin; L-arginine L-glutamate

Адреса для листування:
E-mail: yarovenk_o@mail.ru.
Яровенко Л. О.

Надійшла до редакції 02.12.2015 р.