

Биолог. журн. Армении, 1-2 (58), 2006

УДК 612.1:599.322:616.36.00

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ CCl_4 -ИНДУЦИРОВАННОМ ЦИРРОЗЕ

И.Б. МЕЛИКСЕТЯН, А.С. МАРГАРЯН, С.С. АБРАМЯН, Л.А. СИМОНЯН,
Р.Б. БАДАЛЯН, И.Г. БАТИКЯН, А.А. СИМОНЯН

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН РА, 375014, Ереван

Исследованы гистологические и гистохимические изменения в печени белых крыс при циррозе, индуцированном CCl_4 , и влияние антиоксидантных факторов - α -токоферола и тиосульфата натрия на эти отклонения. Наблюдались определенные положительные сдвиги в гематопозе и регенерации печени под воздействием этих факторов. Обсуждаются возможные механизмы стимуляции регенерации ткани печени при экспериментальном циррозе.

Կատարվել են սպիտակ առնետների լյարդի հյուսվածաբանական և հյուսվածաքիմիական հետազոտություններ CCl_4 -ով մակածված ցիրոզի դեպքում: Ուսումնասիրվել է հակաօքսիդանտային գործոնների α -տոկոֆերոլի և նատրիումի թիոսուլֆատի ազդեցությունը այդ փոփոխությունների վրա: Վերջիններիս ներգործությամբ դիտվել են հյուսվածքի ձևաբանական ձևախեղումների, հեմատոպոզի ակտիվացման դրսևորումներ: Զննարկվել են լյարդի ռեգեներացման հնարավոր մեխանիզմները փորձարարական ցիրոզի դեպքում:

The histological and histochemical changes in white rats liver with CCl_4 -induced cirrhosis and the effects of antioxidant factors, such as α -tocopherol and sodium thiosulfate on these extrapolations have been investigated. Under the influence of these factors positive shifts take place in liver regeneration and hematopoiesis. Possible mechanisms of stimulation of liver tissue regeneration at experimental cirrhosis are discussed.

Экспериментальный цирроз печени - α -токоферол - тиосульфат натрия - гистологические изменения

Цирроз печени (ЦП) – хроническое полиэтиологическое прогрессирующее заболевание, протекающее с поражением паренхиматозной и интерстициальной тканей органа с дистрофией и некрозом гепатоцитов, регенерацией, склерозом, нарушением архитектоники органа и развитием той или иной степени недостаточности печени [3,18]. В экономически развитых странах ЦП входит в число шести основных причин смерти в возрасте 35-60 лет, составляя от 14 до 30 случаев на сто тысяч населения. В мире ежегодно умирают 40 млн. человек от вирусного цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, развивающейся на фоне носительства вируса гепатита В. В странах СНГ ЦП встречается у 1% населения. Молекулярные механизмы патогенеза ЦП продолжают оставаться в поле зрения исследователей различных направлений гепатологов академического и прикладного профиля. Отсутствие принципиально новой информации

позволяющей осмысленно истинных причинно-следственных факторов, обуславливающих природу указанной патологии, создает существенные трудности в поиске мер по нивелированию и коррекции причин, лежащих в основе инициации развития и генерализации этиопатогенетических механизмов цирроза. В этом аспекте заслуживают внимания результаты наших предыдущих исследований [1], выявившие выраженные отклонения как в качественном, так и в количественном отношении нейтральных и кислых фосфолипидов в печени при CCl_4 -индуцированном циррозе, что хорошо коррелирует с интенсивностью перекисного окисления липидов и состоянием антиоксидантной системы. Вводимые препараты антиоксидантного действия - α -токоферол (ТФ) и тиосульфат натрия (ТСН) в определенной степени нормализуют количество перекисей и фосфолипидный состав в печени экспериментальных животных.

Мы задались целью исследовать гистологические и ультраструктурные изменения ткани печени крыс при циррозе печени, индуцированном тетрахлорметаном (CCl_4), а также воздействие ТФ и ТСН на регенерацию пораженных клеточных структур и возможные механизмы их действия.

Материал и методика. В работе использованы беспородные белые крысы-самцы массой 180-200 г, содержащиеся в обычных условиях вивария. ЦП вызывали введением крысам 100%-ного раствора CCl_4 интратрибушинно в дозе 0,3 мл на массу животного, 2 раза в неделю, в течение 20-и дней. Животные были разделены на 6 групп (по 6 крыс в каждой):

I. контрольная группа (интактные животные);

II. группа животных с экспериментальным ЦП;

III. группа животных, получавшая ТФ;

IV. группа животных с экспериментальным ЦП, получавшая ТФ;

V. группа животных, получавшая ТСН;

VI. группа животных с экспериментальным ЦП, получавшая ТСН.

Животным III и IV групп 2 раза в неделю вводили 0,4 мг масляного раствора ТФ, а V и VI - 1 мг ТСН на массу животного. Животным I группы вводили 1 мл физиологического раствора 2 раза в неделю.

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом без перфузии. Печень быстро извлекали и в течение 24-48 ч фиксировали при 4° в 4%-ном формалине, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) и содержащем 3%-ный раствор хлористого кальция. Промывали ткань и помещали в физиологический раствор, буференный 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4), содержащий 30% сахарозы. На замораживающем микротоме готовили срезы толщиной 50 мкм.

В работе использованы: 1) гистологический метод с окраской гематоксилин-эозином; а) окраска срезов 1%-ным раствором гематоксилина (10 мин); б) промывание срезов под проточной водой (10 мин); в) окраска срезов 0,1% -ным раствором эозина (1-2 мин); 2) гистохимический метод по определению активности кислой фосфатазы (КФ) [2].

Результаты и обсуждение. Согласно результатам исследований, у интактных крыс в печеночных дольках анастомозирующие трабекулы равномерно расположены между портальными зонами и центральными венами (рис. 1 А,Б). Синусоиды между тяжами гепатоцитов не расширены и в основном не содержат форменных элементов крови (рис. 1А,Б), кроме единичных эритроцитов и лимфоцитов. Между гепатоцитами проследиваются тонкие желчные капилляры (рис. 1Б). В нескольких участках выделяются портальные триады с расположенными в них портальными

венами, печеночными артериями и желчными протоками. Стенки центральных вен целостные, в них иногда выделяются эндотелиальные клетки. Центральные вены в основном пустуют (рис. 1А,Б). Междольковые соединительнотканые перегородки или прослойки тонкие и равномерной толщины.

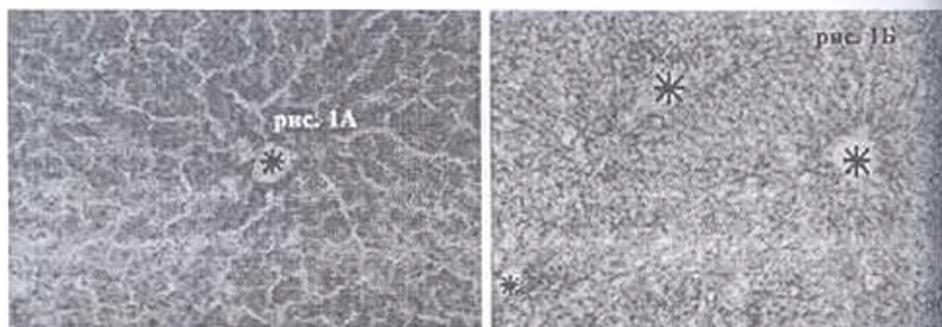


Рис.1. Структуры печени у intactных крыс (А) в печеночной дольке хорошо видны радиально ориентированные вокруг центральной вены (звездочки) тяжи (трабекулы) гепатоцитов, между которыми равномерно расположены синусоиды одинаковой величины. Гистологический метод с окраской гематоксилином и эозином (ГЭ) (Б): участок трех печеночных долек с центральными венами (звездочки) в центре каждой дольки; между дольками выделяются светлые участки соединительнотканной прослойки печеночной триады (междольковые портальные вены, печеночные артерии, желчные протоки, а также лимфатические сосуды). Выделяются также ретикулярные волокна вокруг гепатоцитов и синусоидов, активность КФ в которых значительно выше у центральных вен. Гистохимический метод по определению активности кислот фосфатазы (КФ). Ок. х 12,5; Об. х 6,3(А) и 10 (Б).

У крыс с введением CCl_4 интратрибушинно с целью получения модели цирроза печени наблюдаются значительные очаговые изменения ближе к портальным зонам (рис. 2А). Сказанное в данном случае выражается в неодинаковом проявлении активности КФ вокруг центральных вен. Изменения происходят и в паренхиме, и в строме печени. Соединительнотканые прослойки стромы довольно расширены и содержат уже стромальные клетки, возможно, фибробласты, а также лимфоциты и эритроциты.

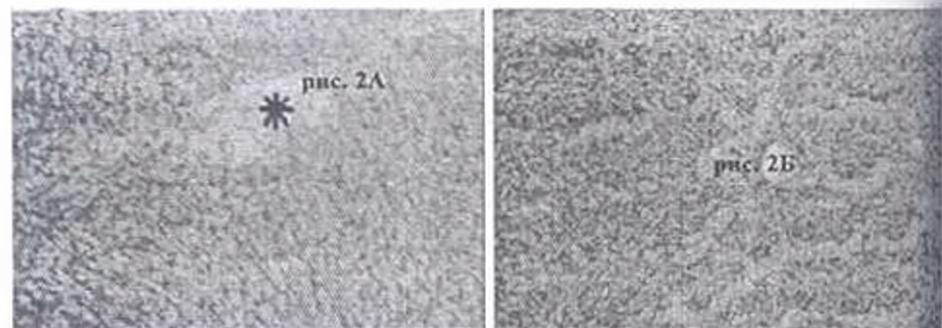


Рис. 2. Структуры поврежденной печени у крыс, интратрибушинно CCl_4 (А): очаговые структурные изменения происходящие в печени. Расширение центральной вены (звездочка) (А) и синусоидов вокруг центральной вены (Б). Гистологический метод по определению активности КФ. Ок. х 12,5; Об. х 6,3(А) и 16 (Б).

Гепатоциты паренхимы, которая представляет систему анастомозирующих трабекул из гепатоцитов с синусоидами между ними, выглядят морфологически деформированными, вследствие чего тяжи гепатоцитов выглядят намного уже. Стенки центральных вен местами не прослеживаются, а сами синусоиды значительно расширены и неправильной формы (рис. 2Б). Кроме того, местами выявляются разбросанные по паренхиме извилистые структуры, напоминающие капилляры, с высокой активностью в них кислой фосфатазы.

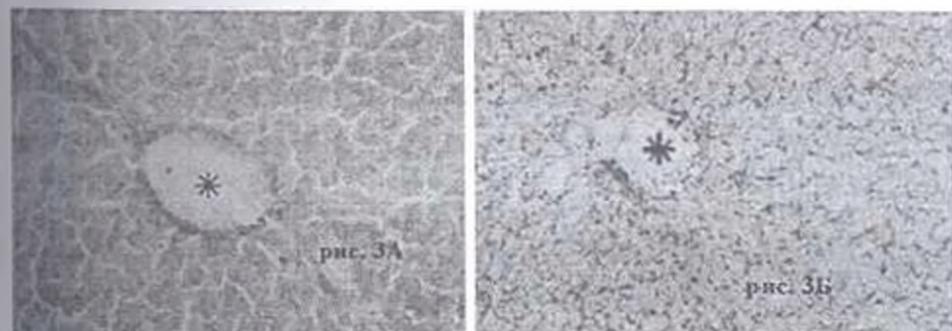


Рис. 3. Структуры поврежденной печени крыс после введения ТФ (А): равномерное расположение синусоидов вокруг центральной вены (звездочка). Хорошо выделяются трабекулы гепатоцитов, в которых четко видны их ядра. Окраска с ГЭ. (Б): в центральных венах и их окружении (звездочка), а также в синусоидах наблюдается накопление форменных элементов крови. Гистохимический метод по определению активности КФ. Ок. х 12,5; Об. х 10 (А) и 16 (Б).

Под воздействием ТФ и особенно ТСН гистологическая картина больше всего напоминает структуру печени интактных крыс (рис. 3 и 4). Синусоиды везде одинаковой величины и равномерно расположены между тяжами гепатоцитов (рис. 3А, 4А). Однако вокруг гепатоцитов и особенно в центральных венах наблюдается значительное накопление разных структур (рис. 3Б, 4А, Б), которые дифференцировать без использования специальных тестов представляет определенные трудности. Однако несмотря на это, среди них отчетливо можно отдифференцировать форменные элементы крови — эритроциты, лимфоциты и мегакариоциты.

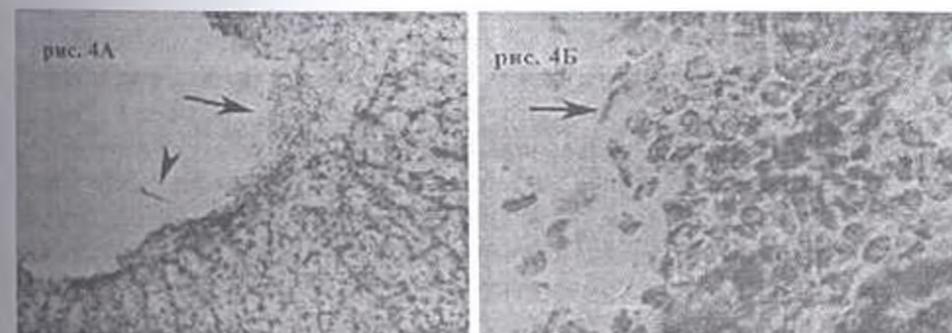


Рис. 4. Структуры поврежденной печени крыс после введения ТСН (А): усиление активности КФ и увеличение числа форменных элементов крови (стрелки) в центральных венах и их окружении, а также в синусоидах между гепатоцитами; появление в центральной вене структуры, напоминающей нервные волокна (шпательная стрелка). (Б): фрагмент рисунка (А), где видны клетки разной величины и формы (стрелки), среди которых выделяются овальные клетки, возможно, овальные клетки печени. Гистохимический метод по определению активности КФ. Ок. х 12,5; Об. х 16 (А) и 100 (Б).

Надо особо отметить, что встречается множество структур овальной формы, напоминающих овальные клетки печени, а возможно, и макрофаги (рис. 4Б).

У интактных крыс, обработанных ТФ и ТСН с целью выяснения их воздействия на нормальные структуры, выявили картину (рис. 5 и 6), аналогичную с полученной при воздействии вышеописанных веществ на поврежденную печень. Особенно хорошо отличаются мегакариоциты, находящиеся в стадии выделения кровяных пластинок (рис 6). Однако здесь, как и у крыс с пиррозом, без введения ТФ и ТСН также наблюдаются очаговые, но не очень выраженные изменения.

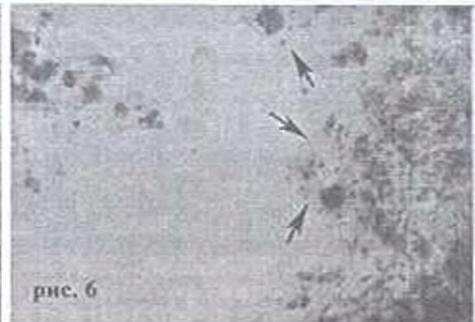
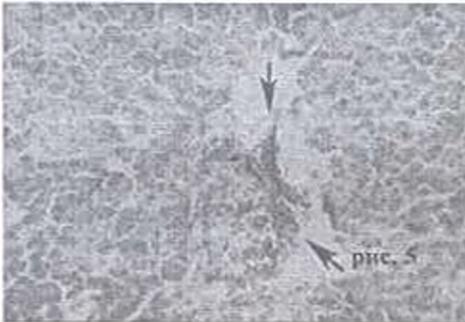


Рис. 5. Структура печени крыс с введением ТФ. Увеличение числа форменных элементов крови в сосудах центральной вены стромы (стрелки); синусоиды различной величины расположены среди трабекул гепатоцитов. Окраска с ГЭ. Ок. x 12,5; Об. x 16.

Рис. 6. Структура печени крыс с введением ТСН. Мегакариоциты в центральной вене в стадии выделения кровяных пластинок (стрелки). Гистохимический метод по определению активности КФ. Ок. x 12,5; Об. x 100.

Известно, что метаболические процессы, которые происходят в каждой из трех зон синуса — метаболической единицы печени, состоящей из порталных трактов и центральной вены, несколько различаются по своему характеру. Этим объясняется тот факт, что некоторые токсины или недостаток того или иного питательного вещества в рационе поражают различные зоны в неодинаковой степени. И уже становится понятно, почему некоторые отделы печеночных долек поражаются в различных условиях больше, чем другие, и почему степень повреждения, определяемая в пределах периферии дольки, нередко варьирует от среза к срезу. Исходя из вышесказанного, можно объяснить происходящие в печени очаговые изменения ближе к порталным венам у крыс, получивших СС₁.

Наблюдаемое нами под воздействием ТФ и ТСН резкое увеличение числа форменных элементов крови в синусоидах и центральных венах печени можно объяснить активацией гематопоза, приводящей к укреплению иммунной системы. При этом не исключено попадание в печень и стволовых клеток (СК) из костного мозга (КМ).

В настоящее время ученые фокусируют свое внимание на стволовые клетки в постэмбриональном периоде развития животных. Известно, что стволовые клетки (СК) способны самообновляться и могут воспроизводить множественные типы клеток. Сегодня уже имеется новое доказательство,

что СК присутствуют во многих тканях, как полагалось ранее, и что эти клетки способны воспроизвести и другие типы клеток.

Стволовые клетки выявлены во многих тканях животных и человека. Список тканей, содержащих стволовые клетки, растет и включает в себя костный мозг, периферическую кровь, спинной и головной мозг, печень, поджелудочную железу и др.

Основной функцией стволовых клеток является поддержание постоянного состояния функционирующей клетки, названное гомеостазом, а также, с некоторыми ограничениями, замещение погибших из-за повреждения и болезней клеток [11, 15]. СК костного мозга могут затем дифференцироваться в другую мезодермального происхождения ткань, такую как скелетная мышца [8, 10], сердечная мышца [12, 16], печень [4, 13, 21].

Из двух типов СК, обнаруженных в циркулирующей крови, но не происходящих из КМ, одна популяция, названная перипитамы, может иметь тесное отношение к стромальным клеткам КМ [5]. Перипитамы считаются СК, происходящими из крови, которые, однако, могут быть отнесены к стромальным клеткам КМ. Считают, что перипитамы в тканях у взрослых являются СК и участвуют в процессах ангиогенеза. Появление в наших экспериментах канализации в поврежденной печени можно объяснить активацией перипитамов и свидетельствует о компенсаторных процессах в органе кровообращения.

Согласно нашим результатам, у крыс с циррозом печени после воздействия ТСН в центральных венах и их окружении выявляются различные клеточные структуры, среди которых выделяются и овальные клетки печени.

В поджелудочной железе и печени содержатся множественные типы дифференцированных клеток, которые образуются от СК. Последние исследования на грызунах указывают на то, что происходящие из мезодермы гематопозитические СК (ГСК) могут внедриться в печень после ее повреждения и демонстрировать пластичность через превращение в гепатоциты, обычно происходящие из энтодермы [13, 17, 21]. Пластичность - способность взрослых СК дифференцироваться в иной ткани, а не в ткани, где они образуются. Однако неизвестно имеет ли место такого рода пластичность без повреждения печени и воспроизводят ли ГСК, происходящие из КМ, овальные клетки печени [6]. Овальные клетки печени могут возникать из порталных трактов и могут давать начало гепатоцитам [7, 14] или эпителию желчных протоков [9, 20]. И несмотря на то что овальные клетки существуют в печени, пока не ясно воспроизводят ли они гепатоциты [19, 22].

Известно, что сами гепатоциты могут быть ответственны за хорошо известную способность печени восстанавливаться.

Исходя из вышеприведенных литературных, а также собственных данных относительно воздействия применяемых нами антиоксидантных факторов (ТФ и ТСН) на восстановление структуры печени крыс с циррозом, можно предположить, что эти вещества включаются в механизм регенерации

печеночных структур посредством активации гематопоэза КМ и укрепления иммунной системы, а также попадания в печень форменных элементов крови.

Однако не исключено участие овальных клеток печени, выявленные нами при введении животным антиоксидантных факторов, в процессе регенерации органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карагезян К.Г., Маргарян А.С., Овсепян Л.М., Симонян А.А., Симонян Л.А., Батикян И.Г., Бабалян Р.Б. Биолог. журн. Армении, 57, 3-4, 165-169, 2005.
2. Меликсетян И.Б. Докл. научн. конф. Ин-та физиол. им. Л.О.Орбеля НАН Армении, посвященной 60-летию основания института; 6-7 октября, 108-111, 2003.
3. Подымова С.Д. Болезни печени. М., 1984.
4. Alison M.R., Poulson R., Jeffery R., et al. Nature, 406, 257, 2000.
5. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Stem Cells, 19, 180-192, 2001.
6. Crosby H.A., Strain A.J. Gut, 48, 153-154, 2001.
7. Dabeva M.D., Shafritz D.A. Am.J.Pathol., 143, 1606-1620, 1993.
8. Ferrari G., Cussella-De Angelis, Coletta M., et al. Science, 279, 1528-1531, 1998.
9. Germain L., Noel M., Gourdeau H., et al. Cancer Res., 48, 368-378, 1988.
10. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D., et al. Nature, 401, 390-394, 1999.
11. Holzer H. Cell lineages, stem cells and the 'quantal' cell cycle concept. In: Stem cells and tissue homeostasis. Eds: B.L.Lord, C.S.Potten, and R.J.Cole. Cambridge, New York: Cambridge University Press.. 1-28, 1978.
12. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., et al. Nat.Med., 7, 430-436, 2001.
13. Lagasse E., Connors H., Al Dhalimy M., et al. Nat.Med., 6, 1229-1234, 2000.
14. Lazaro C.A., Rhim J.A., Yamada Y., Fausto N. Cancer Res., 58, 5514-5522, 1998.
15. Leblond C.P. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. National Cancer Institute., 14, 119-150, 1964.
16. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Nature, 410, 701-705, 2001.
17. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., et al. Science, 284, 1168-1170, 1999.
18. Rasmussen H. H., Fallingborg J. F., Mortensen P. B., et al. Scand. J. Gastroenterol., 22(6), 604-610, 1997.
19. Sell S. Cancer Res., 50, 3811-3815, 1990.
20. Sirica A.E., Mathis G.A., Sano N., Elmore L.W. Pathobiology, 58, 44-46, 1990.
21. Theise N.D., Nimmakayalu M., Gardner R., et al. Hepatology, 32, 11-16, 2000.
22. Thorgeirsson S.S. Am.J.Pathol., 142, 1331-1333, 1993.

Поступила 29.III.2008