

УДК 615.361.03:616.36-008.64

СОСТОЯНИЕ АКТИВНОСТИ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ И ЛЕЧЕНИЯ

Рябинин В.Е., Полевщикова Е.Е., Пушкарев С.А., Попков П.Н., Стасюк А.А.,
Дубасов А.Ю., Мухаметжанова Р.И.

ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздрава России»,
Челябинск, e-mail: cct49@mail.ru

На животных, леченных биологически активными препаратами фетальной печени, хорионическим гонадотропином и растительным гепатопротективным препаратом «Максар» после вызванного у них токсического цирроза печени, проведена оценка эффективности лечения с помощью метода определения активности ядрышковых организаторов. Токсический цирроз печени индуцировался введением четыреххлористого углерода в течение двух месяцев, лечение проводилось спустя две недели после последней инъекции. Оценка активности ядрышковых организаторов показала, что печень интактных и леченных крыс состоит главным образом из гепатоцитов I типа (с низкой пролиферативной активностью), в то время как у нелеченных крыс – из гепатоцитов II типа (с высокой пролиферативной активностью). Показано модулирующее действие препаратов во всех группах лечения, выражающееся в сдвиге репаративных процессов в сторону внутриклеточной регенерации гепатоцитов.

Ключевые слова: цирроз печени, четырёххлористый углерод (CCl₄), фетальные ткани, активность ядрышковых организаторов, хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), «Максар»

ACTIVITY OF NUCLEOLAR ORGANIZERS IN HEPATOCYTES OF RATS WITH CCl₄-INDUCED CIRRHOSIS AFTER TREATMENT WITH BIOACTIVE PREPARATIONS

Ryabinin V.E., Polevshikova E.E., Pushkarev S.A., Popkov P.N., Stasyuk A.A.,
Dubasov A.Y., Muchametzhanova A.I.

Chelyabinsk State Medical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation,
Chelyabinsk, e-mail: cct49@mail.ru

The therapeutic efficiency of bioactive preparations of human fetal liver (extract, cell-rich fluid), chorionic gonadotropic hormone and «Maksar» (plant-extracted product of *Maakia amurensis*, kindly provided by S.A. Fedoreev, Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, Russia) in the treatment of model toxic liver cirrhosis is shown. Toxic liver cirrhosis was induced by 2-months i.p. administration of carbon tetrachloride (CCl₄) to male rats. Treatment was performed within 14 days after last CCl₄ injection. Evaluation of nucleolar organizer activity (AgNOR) showed that livers of intact rats and treated rats contained mostly type I hepatocytes (low proliferative activity), whereas untreated rats had mostly type II hepatocytes (high proliferative activity). On the contrary, amount of argentaaffin granules per nucleolus was significantly higher in treated groups compared to control and CCl₄-intoxicated rats. The data obtained indicate that all the preparation under consideration are capable of modulating the hepatocyte regeneration, and human fetal liver extract and cell-rich fluid have the most prominent effect.

Keywords: nucleolar organizer activity (AgNOR), cirrhosis, carbon tetrachloride (CCl₄), fetal liver, chorionic gonadotropic hormone, Maksar

Хронические гепатиты и циррозы печени занимают ведущее место в структуре патологии печени [4]. В последние годы в гепатологии достигнуты большие успехи как в отношении методов лабораторной и инструментальной диагностики циррозов, так и в направлении лечебных мероприятий. Однако сложность строения печени и многообразие её функций обуславливают необходимость применения разнообразных диагностических приёмов и методологических подходов к оценке её деятельности в норме, при патологии и лечении. Высокой информативностью при изучении этих явлений обладает метод определения активности ядрышковых организаторов путем окрашивания тканей 50% коллоидным раствором нитрата серебра [1]. В окрашенных пре-

паратах визуализируются ядрышки и интрануклеарные аргентаффиновые белковые гранулы, ассоциированные с зонами нуклеолярной транскрипции. Этот метод может объективно отражать степень напряженности рибосомального синтеза и пролиферативной активности различных клеток [1, 2].

Целью данного исследования явилось изучение показателей активности ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс при токсическом циррозе печени и после лечения препаратами фетальной печени, хорионическим гонадотропином и гепатопротективным препаратом «Максар».

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на половозрелых крысах-самцах массой от 180 до 220 г в количестве 71 особь. Животные были разделены на 6 групп. I–V опытные

группы составили животные, которым подкожно вводили 50% масляный раствор CCl_4 в дозе 0,1 мл 3 раза в неделю в течение 2-х месяцев. Животные VI группы – интактные. Через 2 месяца I-й опытной группе после возникновения у них цирроза печени вводили экстракт фетальной печени человека; II опытной группе – клеточную суспензию фетальной печени человека; III опытной группе – хорионический гонадотропин человека; IV опытной группе – растительный препарат «Максар» (экстракт *Маакии амурской*), который был любезно предоставлен ведущим научным сотрудником С.А. Федоревым (Тихоокеанский ин-т биоорг. химии ДВО РАН).

Источником фетальной печени человека служили остатки абортного материала, полученные в результате самопроизвольных выкидышей, а также при вызывании преждевременных родов по социальным показаниям (20–22 недельного срока внутриутробного развития плода). Время, прошедшее от момента взятия фетальной печени до эксплантации в организм животных, не превышало 4-х часов. В стерильных условиях извлекали печень, в небольшом объеме раствора Рингера рассекали на фрагменты. Затем готовили 10% гомогенат путем центрифугирования фрагментов печени в растворе Рингера при 5000 об/мин в течение 10 минут. Полученный экстракт фетальной печени человека сразу же вводили крысам, подвергшимся интоксикации, по 1,5 мл каждой 1 раз в неделю в течение 2 недель. Клеточную суспензию фетальной печени готовили следующим способом: извлеченную печень в небольшом объеме раствора Рингера рассекали на фрагменты, разводили раствором Рингера до 10% по массе взятой навески печени, затем добавляли коллагеназу и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Далее пипетировали иглами уменьшающегося диаметра, добавляли раствор Рингера, вновь пипетировали. После центрифугирования супернатант сливали, к осадку добавляли раствор Рингера, снова пипетировали и центрифугировали при тех же условиях. Таким путем отмывали раствор от коллагеназы еще несколько раз. После последнего центрифугирования супернатант сливали, к осадку добавляли первоначальный объем раствора Рингера, пипетировали и вводили по 1,5 мл полученной клеточной суспензии внутрибрюшинно каждой крысе, подвергшейся интоксикации, 1 раз в неделю в течение 2 недель. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) при лечении вводили внутрибрюшинно 3 дня подряд по 1,5 мл раствора, полученного при разведении ампул по 500 ЕД физраствором из расчета 170 ЕД на животное. Раствор «Максара» готовили следующим образом: к 1 г сухого препарата добавляли 5 мл 96% этилового спирта и 45 мл дистиллированной воды, перемешивали, полученную взвесь вводили животным перорально под лёгким эфирным наркозом из расчёта 1 мл на 100 г веса 1 раз в неделю в течение 2 недель. Материал печени нелеченных и интактных животных забирали на забое через 4 недели после прекращения введения CCl_4 , а леченных – через 2 недели после окончания лечения. Забой животных проводили под эфирным наркозом.

Ядрышковые организаторы в гепатоцитах выявляли в парафиновых срезах печени крыс [3]. Оценку активности ядрышковых организаторов проводили при увеличении $\times 1000$ с масляной иммерсией и зеленым светофильтром, используя микроскоп «JENAMED-2» [8]. Для анализа было взято 20 клеток

для каждого животного. В гепатоцитах подсчитывали число ядрышек, интрануклеолярных и экстрануклеолярных включений, а также сумму аргентаффинных гранул и нуклеолярные индексы, вычисляемые как отношение числа ядрышек к числу интрануклеолярных аргентаффинных включений. С целью оценки процессов пролиферации производили подсчет числа гепатоцитов 1-го и 2-го типа. В гепатоцитах 1-го типа выявляли аргентаффинные внутриядрышковые включения или диффузно окрашенные ядрышки. Такое распределение включений наблюдается в непролиферирующих клетках [1]. В гепатоцитах 2-го типа визуализировались не только целиком прокрашенные ядрышки и депозиты внутри них, но и диспергированные в кариоплазме аргентаффинные белковые гранулы, т.е. экстрануклеолярные включения. Такой тип распределения аргентаффинных гранул характерен для пролиферирующих клеток. Полученные данные в абсолютных значениях подвергали обработке приемами вариационной статистики. Достоверность различий оценивали по критерию t Стьюдента и χ^2 .

Результаты исследования и их обсуждение

Через 2 месяца после введения CCl_4 у крыс развился цирроз печени, который морфологически проявлялся отсутствием типичных печеночных долек и диффузным разрастанием соединительной ткани. Паренхима печени состояла из ложных печеночных долек, регистрировалась диффузная и зональная жировая дистрофия гепатоцитов. В портальных трактах наблюдалось разрастание фиброзной ткани, диффузная лимфоцитарная и гистиоцитарная инфильтрация. Лечение сопровождалось появлением типичных печеночных долек, представленных несколько увеличенными в размерах гепатоцитами с гиперхромными ядрами, пронизанными соединительно-тканевыми прослойками. В печеночных дольках после лечения была отмечена обычная радиарная ориентация печеночных балок. Результаты определения активности ядрышковых организаторов в эксперименте представлены в табл. 1, 2.

Рассматривая данные по активности ядрышковых организаторов в экспериментах с интоксикацией CCl_4 , вызывающей цирротические изменения в печени, и последующим лечением (табл. 1), можно выделить ряд закономерностей. Не вызывает сомнения факт, что активность ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс с циррозом печени нарастает в результате действия гепатотоксичного яда CCl_4 . Такое явление даже на фоне достаточно выраженной жировой, вакуольной и других видов дистрофии свидетельствует об известной способности гепатоцитов резко интенсифицировать гиперпластические процессы в их ультраструктурах в ответ на повреждающее воздействие [6]. Это говорит о том, что

организму в высшей степени свойственна способность к экономии материальных ресурсов и к максимальной концентрации их на главном участке развёртывания приспособительной реакции [6]. Количество ядрышек при хронической интоксикации CCl_4 возрастает более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Возможно, что увеличение их числа при циррозе печени происходит за счёт активации ЯОР, которые ранее были неактивными и не выявлялись

методом серебрения [7]. Абсолютное число интрануклеолярных включений также возрастает, однако нуклеолярный индекс остаётся практически неизменным, что говорит об одинаковом количестве интрануклеолярных включений, приходящемся на отдельное ядрышко как в норме, так и при циррозе. Это согласуется с представлениями о том, что репаративная регенерация печени протекает в равной степени в двух формах – клеточной и внутриклеточной [6].

Таблица 1

Число ядрышек, интрануклеолярных и экстрануклеолярных аргентафинных гранул и отношение числа ядрышек к числу интрануклеолярных аргентафинных гранул в гепатоцитах у крыс

Экспериментальные группы	Абсолютное число ядрышек на гепатоцит	Абсолютное число интрануклеолярных включений на гепатоцит	Абсолютное число экстрануклеолярных включений на гепатоцит	Суммарное число включений на гепатоцит	Отношение числа ядрышек к числу интрануклеолярных включений
I (n = 260)	5,13 ± 0,09*	26,34 ± 0,53**	1,13 ± 0,11*	27,45 ± 0,52*	0,20 ± 0,006*
II (n = 260)	4,70 ± 0,09*	22,91 ± 0,49**	0,92 ± 0,11*	23,81 ± 0,47**	0,21 ± 0,007*
III (n = 280)	2,95 ± 0,07*	15,98 ± 0,54**	0,49 ± 0,06*	16,46 ± 0,51**	0,19 ± 0,008*
IV (n = 240)	2,96 ± 0,07*	15,63 ± 0,37**	0,61 ± 0,06**	16,25 ± 0,35**	0,19 ± 0,003*
V (n = 200)	6,92 ± 0,34**	18,29 ± 0,99**	3,74 ± 0,21**	22,03 ± 1,17**	0,38 ± 0,016
VI (n = 180)	3,07 ± 0,12	7,98 ± 0,25	0,28 ± 0,03	8,27 ± 0,26	0,39 ± 0,004

Примечание: группа I – лечение экстрактом фетальной печени (20–22 нед. гестации); группа II – лечение клеточной суспензией фетальной печени (20–22 нед. гестации); группа III – лечение хорионическим гонадотропином человека; группа IV – лечение препаратом «Максар»; группа V – интоксикация CCl_4 без лечения; группа VI – интактные животные; n – общее количество исследованных гепатоцитов в группе; * – достоверные различия обнаружены в группах I–IV по отношению к V группе ($p < 0,05$); ** – достоверные различия обнаружены в группах I–V по отношению к VI группе ($p < 0,05$).

Таблица 2

Число гепатоцитов 1-го и 2-го типов у крыс

Группа крыс	Число гепатоцитов 1-го типа	Число гепатоцитов 2-го типа	Всего
I	168 (64,6%)	92 (35,4%)	260 (100,0%)
II	193 (74,2%)	67 (25,8%)	260 (100,0%)
III	216 (77,1%)	64 (22,9%)	280 (100,0%)
IV	171 (71,3%)	69 (28,7%)	240 (100,0%)
V	8 (4,0%)	192 (96,0%)	200 (100,0%)
VI	144 (80,0%)	36 (20,0%)	180 (100,0%)

Примечание: нумерация экспериментальных групп такая же, как и в табл. 1; выявлены достоверные отличия между I, II, III, IV, VI группами по отношению к V группе ($\chi^2 (p < 0,0001)$).

При лечении во всех группах отмечалось резкое снижение числа ядрышек, в случаях лечения ХГЧ и «Максаром» с достижением контрольных отметок, что коррелирует со снижением пролиферативной активности клеток [1, 7]. В то же время уменьшение числа интрануклеолярных включений было не так значительно, а в случаях лечения экстрактом и клеточной суспензией фетальной печени количество интрануклеоляр-

ных включений даже несколько возросло по сравнению с интоксикацией. Тем не менее, расчёт нуклеолярных индексов показал близость их значений для всех групп лечения, что свидетельствует о едином росте числа интрануклеолярных включений, приходящегося на отдельное ядрышко. Данные изменения происходят, по всей видимости, за счёт рекомбинационных преобразований аргентаффинного вещества ядрышек. Уве-

личение зоны фибриллярных центров приводит к интенсификации рибосомального синтеза в зонах нуклеолярной транскрипции гепатоцитов. Таким образом, при лечении происходит интенсификация процессов внутриклеточной регенерации, в то время как пролиферативная активность снижается. С этими данными согласуется изменение распределения гепатоцитов по типам (табл. 2). При лечении количество экстракнуклеолярных включений и клеток 2-го типа снижается по сравнению с интоксикацией и стремится к контрольным значениям.

Мы считаем, что такой положительный терапевтический эффект, вероятно, обусловлен появлением в гепатоцитах белков, блокирующих их пролиферативный потенциал, в то время как биосинтетические процессы остаются на высоком уровне, а в случае лечения препаратами фетальной печени даже интенсифицируются. Таким образом, по данным показателям можно говорить о наличии положительного терапевтического эффекта при лечении всеми способами, однако в сравнительном аспекте можно отметить более сильное модулирующее действие препаратов фетальной печени, проявляющееся в сохранении и увеличении количества белков-регуляторов, ассоциированных с зонами нуклеолярной транскрипции.

Вывод

Таким образом, исследования показали, что печень интактных и леченных крыс состоит главным образом из гепатоцитов I типа (с низкой пролиферативной активностью), в то время как у нелеченных крыс — из гепатоцитов II типа (с высокой пролиферативной активностью). Модулирующее действие лекарственных препаратов позволяет снизить опасность образования неконтролируемого пула пролиферирующих клеток и способствует направлению репаративных процессов в сторону внутриклеточной регенерации гепатоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке по гранту ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение № 8275).

Список литературы

1. Крокер Д. Молекулярная диагностика. Методы: пер. с англ.; под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. — М., 1999.
2. Куренков Е.Л. Морфологическая характеристика полиповидных образований желудка и фонового хронического гастрита // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. — 2000. — Т.10, № 2. — С. 18–25.
3. Куренков Е.Л., Кузнецов М.Е., Шевяков С.А., Расохин А.Г. Активность ядрышковых организаторов в клет-

ках эритробластических островков костного мозга при различных функциональных состояниях эритропоэза // Вестн. РАМН. — 2002. — № 3. — С. 13–16.

4. Львов Д.К. Вирусный гепатит С — «ласковый убийца» // Рос. журн. гастроэнтерол. и гепатол. — 1995. — Т.5, № 1. — С. 4–6.

5. Состояние активности ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс после индукции четыреххлористым углеродом цирроза печени и лечения биологически активными препаратами печени и селезенки / А.М. Мальшева, П.Н. Попков, Е.Л. Куренков, В.Е. Рябинин, С.И. Гробоной // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, № 7. — С. 114–117.

6. Саркисов Д.С. Очерки истории общей патологии. — М., 1993. — 336 с.

7. Штейн Г.И., Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н. Изменение морфометрических параметров окрашенных серебром ядрышек гепатоцитов крыс при циррозе печени и в процессе ее реабилитации // Цитология. — 1999. — Т. 41, № 7. — С. 574–580.

8. Crocker J., Egan M.J. Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas // J. Pathol. — 1998. — Vol. 3. — P. 233–239.

References

1. Croker D. Molekuljarnaja diagnostika. Metody // Pod red. S. Herringtona, Dzh. Makgi; Per. s angl. M., 1999.

2. Kurenkov E.L. Morfologicheskaja karakteristika polipovidnyh obrazovanij zheludka i fonovogo hronicheskogo gastrita // Ros. zhurn. gastrojenterol., gepatol. i koloproktol. 2000. T.10, no. 2. pp. 18–25.

3. Kurenkov E.L., Kuznecov M.E., Shevjakov S.A., Rassohin A.G. Aktivnost' jadrjshkovykh organizatorov v kletkah jeritroblasticheskikh ostrovkov kostnogo mozga pri razlichnyh funkcional'nyh sostojanijah jeritropojeza // Vestn. RAMN. 2002. no. 3. pp. 13–16.

4. L'vov D.K. Virusnyj gepatit S — «laskovoj ubijca» // Ros. zhurn. gastrojenterol. i gepatol. 1995. T.5, no. 1. pp. 4–6.

5. Malysheva A.M., Popkov P.N., Kurenkov E.L., Rjabinin V.E., Grobovoj S.I. Sostojanie aktivnosti jadrjshkovykh organizatorov v gepatocitah krysv posle indukcii chetyrehhloristym uglerodom cirroza pecheni i lechenija biologicheski aktivnymi preparatami pecheni i selezhenki // Bjull. jeksp. biol. i med. 2006. T.142, no. 7. pp. 114–117.

6. Sarkisov D.S. Ocherki istorii obwey patologii. M., 1993. 336 p.

7. Shtejn G.I., Kudrjavceva M.V., Kudrjavcev B.N. Izmenenie morfometricheskikh parametrov okrashennykh serebrom jadrjshkek gepatocitov krysv pri cirroze pecheni i v processe ee rehabilitacii // Citologija. 1999. T. 41, no. 7. pp. 574–580.

8. Crocker J., Egan M.J. Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas // J. Pathol. 1998. Vol. 3. pp. 233–239.

Рецензенты:

Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития», г. Челябинск;

Сашенков С.Л., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития», г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 15.11.2012.