

УДК 616-441

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИРЕОИДНОЙ ГЕПАТОПАТИИ

¹Боташева В.С., ²Мозеров С.А., ¹Стадник Н.А.

¹ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет»,
Ставрополь, e-mail: snal@list.ru;

²Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского
ядерного университета «МИФИ», Обнинск, e-mail: s.a.mozerov@list.ru

Получена экспериментальная модель тиреотоксикоза на лабораторных животных, 58 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой тела 250–300 г. Крысам ежедневно вводили L-тироксин в дозе 1,6 мг на 1 кг массы тела. Лабораторных животных выводили из эксперимента через 7, 14, 28, 45, 60 и 90 суток. Проводили забор крови из хвостовой вены для определения тиреоидных гормонов, а также макроскопическое и микроскопическое исследование печени. Результаты исследования показали, что при введении L-тироксина происходит значительное увеличение в крови тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) и снижение тиреотропного гормона (ТТГ). При экзогенном тиреотоксикозе в печени развивается интенсивный перисинусоидальный отек, истончение и атрофия печеночных балок, диффузная гидропическая и баллонная дистрофия гепатоцитов, очаги колликвационного некроза с образованием полостей. Иммуногистохимическое исследование показало, что пролиферативная активность гепатоцитов по экспрессии протеина Ki-67 усиливается и составляет 12–13% (в контрольной группе – 3%), начиная с 45 суток наблюдается снижение экспрессии Ki-67 до 0,5–1%. Экспрессия маркера апоптоза P-53 постепенно повышается и к концу эксперимента составляет 7–8%, что свидетельствует об усилении процессов апоптоза гепатоцитов.

Ключевые слова: тиреотоксикоз, печень, иммуногистохимия, гидропическая дистрофия, перисинусоидальный отек, протеин Ki-67, протеин P-53

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THYROID HEPATOPATHIES

¹Botasheva V.S., ²Mozerov S.A., ¹Stadnik N.A.

¹State Medical University, Stavropol, e-mail: snal@list.ru;

²Obninsk institute of nuclear power – branch of National research nuclear university «MIFI»,
Obninsk, e-mail: s.a.mozerov@list.ru

An experimental model of hyperthyroidism in laboratory animals, 58 adult male rats of Wistar weighing 250–300 grams. Rats were administered daily L-thyroxine in a dose of 1,6 mg per 1 kg of body weight. Laboratory animals were taken out of the experiment after 7, 14, 28, 45, 60 and 90 days. Blood sampling was carried out from tail vein for determination of thyroid hormones, and macroscopic and microscopic examination of the liver. Results showed that administration of L-thyroxine is a significant increase in blood thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) and a decrease of thyroid stimulating hormone (TSH). When exogenous thyrotoxicosis develops in the liver perisinusoidal intense swelling, thinning and atrophy of the liver beams diffuse hydropic and ballooning degeneration of hepatocytes, foci of necrosis kollikvatsionnogo with the formation of cavities. Immunogistohimieskoe study showed that the proliferative activity of hepatocytes on the protein expression of Ki-67 is amplified and is 12–13% (in the control group – 3%) 45 days since a decrease in the expression of Ki-67 to 0,5–1%. Expression of apoptosis marker R-53 is gradually increased and by the end of the experiment is 7–8%, which indicates an increase in apoptosis of hepatocytes.

Keywords: hyperthyroidism, liver, immunohistochemistry, hydropic degeneration, perisinusoidal edema, protein Ki-67, P-53 protein

Среди эндокринных заболеваний тиреоидная патология встречается довольно часто и, по данным ВОЗ, охватывает 7% населения земного шара.

По прогнозам специалистов тенденция к увеличению числа заболеваний щитовидной железы сохраняется на ближайшие годы. Это обусловлено быстрым ростом промышленности и загрязнением окружающей среды промышленными и радиоактивными отходами, изменениями микроэлементного состава почвы, наследственной предрасположенностью [9].

Морфофункциональное состояние щитовидной железы зависит напрямую от антропогенных факторов и является маркером

экологического неблагополучия данного региона. В промышленно развитых странах рост тиреоидной патологии прямо пропорционален загрязнению окружающей среды [2, 3, 5, 7].

Тиреоидная патология сопровождается нарушениями выработки тиреоидных гормонов с развитием гипотиреоза или тиреотоксикоза.

Тиреотоксикоз – это синдром, наличие которого связано с повышенным содержанием тиреоидных гормонов в крови, что встречается при различных заболеваниях или экзогенном избыточном поступлении тиреоидных гормонов [1, 4, 12, 13]. К тиреотоксикозу относятся такие состояния, при

которых имеются клинические и биохимические проявления избыточного содержания тиреоидных гормонов в крови без учета генеза повышения их уровня.

Тиреотоксикоз сопровождается многочисленными нарушениями всех органов и систем, что обусловлено многообразными эффектами тиреоидных гормонов с появлением мультиорганных поражений. В первую очередь поражаются сердечно-сосудистая система, пищеварительная система (тиреотоксический гепатоз), центральная нервная система, орган зрения, репродуктивная система и другие органы [6, 8, 10, 11].

В печени при тиреотоксикозе развиваются выраженные функциональные и структурные изменения. Печень метаболизирует тироксин путем окислительного дезаминирования, дейодирования, конъюгации и экскреции ее в желчь. По данным разных авторов при тиреотоксикозе в печени развивается жировая дистрофия, цирроз, печеночная кома.

В работах, посвященных поражению печени при тиреотоксикозе, основное внимание уделяется клиническим проявлениям. Между тем недостаточно изучены структурные изменения, которые развиваются в печени при данной патологии, их морфогенез и исходы. Имеющиеся сведения малочисленные и разрозненные.

Указанное состояние проблемы явилось основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования: определить характер морфологических изменений в печени при экспериментальном тиреотоксикозе.

Задачи исследования:

1. Изучить гистологические изменения в печени при экспериментальном тиреотоксикозе в динамике.
2. Выявить гистохимические и иммуногистохимические нарушения в печени при экспериментальном тиреотоксикозе в динамике.

Материал и методы исследования

Исследование проведено на белых крысах-самцах линии Вистар весом 250–300 г. Для проведения опытов отбирали здоровых половозрелых крыс в возрасте 8–9 месяцев. Крысы содержались в оптимальных условиях, для их кормления использовали рационы для лабораторных животных в соответствии с ГОСТ Р 50258-92. В ходе эксперимента соблюдали международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных.

На белых крысах-самцах была получена экспериментальная модель тиреотоксикоза путем ежедневного введения L-тироксина в дозе 1,6 мг на 1 кг массы тела. Продолжительность эксперимента составила 90 дней. Крыс выводили из опыта через 7, 14, 21, 45, 60, 90 суток.

Методом иммуноферментного анализа с помощью диагностических наборов Т-3, Т-4, ТГ (DRG international inc, Германия) определяли уровни гормо-

нов щитовидной железы оТ3 (общий трийодтиронин), оТ4 (общий тироксин) и ТТГ (тиреотропный гормон).

Для гистологического исследования кусочки печени фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 10 суток, после чего промывали в проточной воде, проводили через спирты возрастающей крепости, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5–6 микрон. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизон, на гликоген ШИК-реакция, толуидиновым синим, по Маллори в модификации Гейденгайна.

Для иммуногистохимического исследования кусочки печени фиксировали в 10% растворе забуференного формалина, готовили парафиновые блоки и делали серийные срезы с каждого блока толщиной 5 мкм. Иммуногистохимическое исследование проводили непрямой иммунопероксидазным методом с восстановлением антигенной специфичности.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с помощью пакета программ Statistic 6.0 for windows, программы статистического анализа «Biostat» (1998) и модуля Exul пакета Microsoft office 2007 Enterprise в среде Windows Vista Home Premium. Для обработки данных исследования использовались методы описательной статистики с целью получения среднего показателя (М) с последующим проведением множественного парного сравнения с помощью критерия Ньюмена – Кейлса при 5% уровне значимости различий.

Результаты исследования и их обсуждение

При ежедневном введении L-тироксина происходит значительное увеличение в крови тироксина (Т4) до $26,9 \pm 0,02$, в контрольной группе $4,25 \pm 0,03$. Уровень трийодтиронина (Т3) повышается до $1,63 \pm 0,03$ по сравнению с контрольной группой ($1,35 \pm 0,03$). Уровень тиреобластного гормона снижается до $1,4 \pm 0,01$ по сравнению с контрольной группой ($2,6 \pm 0,02$).

Масса печени при тиреотоксикозе постепенно увеличилась и к концу эксперимента достигла 10 грамм (в контрольном материале 5,1 грамм), размеры печени увеличились почти в 2 раза по сравнению с контрольной группой.

Патогистологические изменения печени крыс при экспериментальном тиреотоксикозе. Через 7 суток от начала эксперимента структурные изменения в печени не обнаружены. Отмечается неравномерное венозное полнокровие синусоидных капилляров. В единичных гепатоцитах обнаружены мелкие вакуоли. Основная масса гепатоцитов без патологических изменений.

Через 14 суток в строении печени наблюдается усиление отека преимущественно в перивенулярных пространствах. В участках отека происходит набухание основного вещества соединительной ткани, а также набухание и расслоение пучков коллагеновых волокон. Однако признаки дезорганизации соединительной ткани не обнаружены. При

окраске толуидиновым синим метахромазия не наблюдается. В гепатоцитах обнаружены признаки гидропической дистрофии с накоплением в цитоплазме мелких вакуолей, заполненных прозрачной цитоплазматической жидкостью. Вакуолизация цитоплазмы носит очаговый характер и наблюдается в отдельных гепатоцитах. При окраске суданом III липиды в цитоплазме гепатоцитов не обнаружены. В I зоне на периферии долек встречаются единичные двуядерные гепатоциты (делящиеся), небольшое количество крупных гепатоцитов с большими гиперхромными ядрами.

Через 21 сутки в печени сохраняются сосудистые нарушения и отмечается усиление отека. Отек распространяется на все дольки и носит диффузный характер. Коллагеновые волокна набухшие, отодвигаются отечной жидкостью, клеточные элементы сдавливаются, ядра их сморщиваются. Происходит набухание отростков фибробластов. При окраске толуидиновым синим обнаружена метахромазия.

По всей поверхности среза в строме печени определяются многочисленные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, гистиоцитов и фибробластов. Инфильтраты расположены в строме долек, в междольковой соединительной ткани, особенно в перипортальной зоне. Большинство инфильтратов располагаются вокруг сосудов. Помимо инфильтратов скопления лимфоцитов обнаружены в синусоидах печени. В гепатоцитах отмечается диффузная гидропическая дистрофия, которая распространяется почти на всю дольку. В цитоплазме гепатоцитов обнаружены крупные вакуоли, которые заполняют почти всю клетку, и ядро плавает в этой жидкости. При окраске суданом III в отдельных гепатоцитах встречаются мелкие капли липидов преимущественно в I зоне. В перипортальных зонах увеличивается число двуядерных делящихся гепатоцитов, а также число крупных гепатоцитов. Пролиферирующие гепатоциты занимают всю I зону и перемещаются к центру долек. В указанные сроки пролиферирующие гепатоциты распространяются почти во II зону.

Через 28 суток отек стромы становится весьма интенсивным и распространяется на всю печень. Основное вещество набухает и разрушается, происходит дезорганизация соединительной ткани с накоплением гликозаминогликанов. При окраске толуидиновым синим наблюдается феномен метахромазии. В эти сроки нарастает интенсивность дистрофических изменений. Цитоплазма гепатоцитов подвергается цитолизу. Очаги цитолиза многочисленные и более крупные, чем на 21-е сутки. Отмечается тотальное повреждение гепатоци-

тов с развитием очагов колликвационного некроза. Увеличивается число пролиферирующих гепатоцитов. Пролиферирующие гепатоциты с I зоны перемещаются к центру дольки и на 28-е сутки достигают III зоны. При окраске суданом III на периферии отдельных долек видны очажки мелкокапельной жировой дистрофии.

Через 45 суток интенсивность отека значительно усилилась, перисинусоидальные пространства расширились. Печеночные балки местами атрофированы. Перивенулярные пространства также резко расширены. Гепатоциты с тяжелыми дистрофическими и некротическими изменениями, увеличилось количество очагов цитолиза с образованием полостей.

Между полостями в паренхиме печени определяются светлые гепатоциты, увеличенные в объеме, округленные, как бы с пустой цитоплазмой. Ядра описанных гепатоцитов уменьшены в размерах, пикнотичные. Такие измененные гепатоциты составляют основную массу печеночных клеток и расположены во всей печени, особенно в I и II зонах.

На фоне описанных изменений и выраженного отека отмечается диффузная инфильтрация стромы печени лимфоцитами с примесью небольшого количества гистиоцитов. В указанные сроки впервые выявлена очаговая пролиферация фибробластов. Пролиферирующие гепатоциты обнаружены во всех 3 зонах ацинуса.

Через 60 суток отек печени становится очень интенсивным, наблюдается значительная атрофия и истончение печеночных балок и гепатоцитов. В печени определяются обширные очаги цитолиза с образованием крупных оптически пустых пространств в виде полостей. По периферии этих очагов наблюдается значительное скопление пролиферирующих гепатоцитов, а также пролиферация фибробластов, некоторое утолщение коллагеновых волокон в перипортальных зонах с развитием очагов фиброза.

Через 90 суток в печени значительно нарастает перисинусоидальный и перивенулярный отек. Печеночные балки очень истончены, края балок неровные, как бы зазубрены. Тяжелые дистрофические и некротические изменения носят распространенный характер, еще больше увеличивается число и размеры пустых полостей. Пролиферация гепатоцитов наблюдается во всей паренхиме печени. Наблюдается очаговая и диффузная инфильтрация лимфоцитами и гистиоцитами. В строме печени усиливается пролиферация фибробластов, нарастает фибриллогенез и определяются мелкие очаги фиброза, которые располагаются по ходу портальных трактов и в области триад.

Методом иммуногистохимического исследования с использованием моноклональных антител Ki-67 и P-53 оценивали пролиферативную активность гепатоцитов в различные сроки эксперимента. Ki-67 является маркером клеточной пролиферации на любой стадии митоза и окрашивает делящиеся клетки. На 7-е сутки эксперимента индекс пролиферации составляет 2–3% (в контрольной группе 2–2,5%), при этом ядра окрашиваются в темно-коричневый цвет. Положительная реакция на Ki-67 выявлена только в I зоне долики. На 14-е сутки экспрессия маркера Ki-67 составила 3%, на 21-е сутки 4–5%. На 28-е сутки выявлено статистически достоверное увеличение экспрессии протеина Ki-67 5–7%, гепатоциты с положительной реакцией расположены в I и частично во II зоне долики. На 45-е сутки экспрессия протеина Ki-67 обнаружена во всех долях долики и достигает наиболее высоких цифр 9–10%. К концу эксперимента в связи с атрофическими изменениями гепатоцитов экспрессия Ki-67 значительно снижается (0,5–1%). Экспрессия маркера апоптоза P-53 постепенно повышается и к концу эксперимента составляет 7–8%, что свидетельствует об усилении процессов апоптоза гепатоцитов.

Выводы

Таким образом, при экспериментальном тиреотоксикозе наблюдается постепенное увеличение размеров и массы печени почти в 2 раза по сравнению с нормой. При гистологическом исследовании выявлен диффузный перисинусоидальный и периваскулярный отек, атрофия и истончение балок, диффузная гидropическая дистрофия гепатоцитов, многочисленные очаги цитолиза с образованием полостей, очаговая и диффузная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы печени, усиление репаративных процессов, пролиферация фибробластов, усиление фибриллогенеза с развитием фиброза. При иммуногистохимическом исследовании выявлено повышение пролиферативной активности гепатоцитов по экспрессии протеина Ki-67, а также повышение экспрессии маркера апоптоза P-53.

Описанные иммуногистохимические и гистологические изменения характерны для тиреоидной гепатопатии «тиреотоксической печени».

Список литературы

1. Балаболкин М.И. Эндокринология. – М., 1998. – 582 с.
2. Винник Л.Ф. Послеоперационная реабилитация больных зобом с использованием стационарозамещающих технологий // Амбулатор. хирургия. – 2006. – № 4. – С. 23–25.
3. Данилова О.В. Возможные исходы лечения диффузно-токсического зоба / О. В. Данилова // Вестн. новых мед. технологий. – 2001. – № 2. – С. 73–73.
4. Дедов И.И. Эндокринология: клин. рек. / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко. – М., 2007. – 304 с.

5. Елизарова Л.А. Опыт проведения пункционной аспирационной тонкоигольной биопсии при патологии щитовидной железы // Южно-Рос. мед. журн. – 2003. – № 5/6. – С. 83–83.

6. Золоедов В.И. Влияние мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при тиреотоксикозе / В.И. Золоедов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попова // Биомед. химия. – 2008. – № 1. – С. 114–120.

7. Петунина Н.А. Особенности диагностики и лечения заболеваний щитовидной железы у пожилых пациентов // Пробл. эндокринологии. – 2008. – № 3. – С. 36–41.

8. Попов С.С. Оксидативный статус и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном гипертиреозе и действии мелатонина / С.С. Попов, А.Н. Пашкова, Т.Н. Попова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – № 8. – С. 170–173.

9. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы: рук. – СПб., 2002. – 288 с.

10. Sapin R. TSH, T3 et T4 libres: les dosages et leurs limites // Spectra boil. – 2009. – Vol. 28, № 175. – P. 76–83.

11. Fong T.L. Hyperthyroidism and hepatic dysfunction. A case series analysis / T.L. Fong, J.G. McHutchison, T.B. Reynolds // J Clin Gastroenterol. – 1992. – Vol. 14. – P. 240–244.

12. Guyton A. The thyroid metabolic hormones // Medical Physiology. – Philadelphia, 1991. – P. 831–841.

13. Noto, H. Hyperthyroidism presenting as dysphagia / H. Noto, T. Mitsuhashi, S. Ishibashi // Intern Med. – 2000. – Vol. 39. – P. 472–473.

References

1. Balabolkin M.I. Jendokrinologija. M., 1998. 582 p.
2. Vinnik L.F. Posleoperacionnaja rehabilitacija bol'nyh zobom s ispol'zovaniem stacionarozameshchajushhh tehnologij // Ambulator. hirurgija. 2006. no. 4. pp. 23–25.
3. Danilova O.V. Vozmozhnye ishody lechenija diffuzno-toksicheskogo zoba // Vestn. novyh med. tehnologij. 2001. no. 2. pp. 73–73.
4. Dedov I.I. Jendokrinologija: klin. rek. / I.I. Dedov, G.A. Mel'nichenko. M., 2007. 304 p.
5. Elizarova L.A. Opyt provedenija punkcionnoj aspiracionnoj tonkoigol'noj biopsii pri patologii shhitovidnoj zhelezy // Juzhno-Ros. med. zhurn. 2003. no. 5/6. pp. 83–83.
6. Zoloedov V.I. Vlijanie melatonina na svobodnoradikal'nyj gomeostaz v tkanjah krysv pri tireotoksikoze / V.I. Zoloedov, A.N. Pashkov, T.N. Popova // Biomed. himija. 2008. no. 1. pp. 114–120.
7. Petunina N.A. Osobennosti diagnostiki i lechenija zabolevanij shhitovidnoj zhelezy u pozihilyh pacientov // Probl. jendokrinologii. 2008. no. 3. pp. 36–41.
8. Popov S.S. Oksidativnyj status i sodержanie citrata v tkanjah krysv pri jeksperimental'nom gipertireoze i dejstvii melatonina / S.S. Popov, A.N. Pashkova, T.N. Popova // Bjul. jeksperim. biologii i mediciny. 2007. no. 8. pp. 170–173.
9. Hmel'nickij O.K. Citologicheskaja i gistologicheskaja diagnostika zabolevanij shhitovidnoj zhelezy: ruk. SPb., 2002. 288 p.
10. Sapin R. TSH, T3 et T4 libres: les dosages et leurs limites // Spectra boil. 2009. Vol. 28, no. 175. pp. 76–83.
11. Fong T.L. Hyperthyroidism and hepatic dysfunction. A case series analysis / T.L. Fong, J.G. McHutchison, T.B. Reynolds // J Clin Gastroenterol. 1992. Vol. 14. pp. 240–244.
12. Guyton A. The thyroid metabolic hormones // Medical Physiology. Philadelphia, 1991. pp. 831–841.
13. Noto H. Hyperthyroidism presenting as dysphagia / H. Noto, T. Mitsuhashi, S. Ishibashi // Intern Med. 2000. Vol. 39. pp. 472–473.

Рецензенты:

Коробкеев А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии, ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь;

Бондарь Т.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой медицинской биохимии, клинической лабораторной диагностики и фармации, ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь.

Работа поступила в редакцию 21.05.2014.