

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО МЕДИКАМЕНТОЗНОГО ГЕПАТИТА

Н. А. Рыкало¹, О. Ю. Гуминская¹, М. В. Мнихович^{2, 3}, Д. А. Жакота³,
Г. П. Казанцева⁴, Д. А. Соколов⁵, А. А. Филин⁵

¹Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова,
г. Винница, Украина

²ФГНБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»,
г. Москва, Россия

³ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва, Россия

⁴ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, г. Рязань, Россия

⁵ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко»
Минздрава России, г. Воронеж, Россия

В статье рассматриваются особенности механизмов репаративной регенераций гепатоцитов неполовозрелых крыс на фоне рифампицин–изониазид индуцированного гепатита. Изучение клеточных и молекулярных механизмов, регулирующих репарацию печени после ее повреждений медикаментозного генеза, позволит более тщательным образом исследовать механизмы компенсации структуры и функции печени для разработки наиболее оптимальных вариантов патогенетической коррекции хронического медикаментозного гепатита.

Ключевые слова: медикаментозный гепатит, неполовозрелые крысы, печень, клеточный цикл, репаративная регенерация.

© The authors, 2016

Vinnitsa N. I. Pirogov National Medical University, Vinnitsa, Ukraine

Ryazan I. P. Pavlov State Medical University, Ryazan, Russia

Scientific-Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Russian N. I. Pirogov National Research Medical University, Moscow, Russia

Voronezh N. N. Burdenko State Medical University, Voronezh, Russia

Reparative Regeneration Features of the Immature Rats Liver on the Background of Chronic Drug-Induced Hepatitis

The article discusses the main features of immature rat's hepatocytes reparative regeneration mechanisms on a background of rifampin-isoniazid induced hepatitis. Investigation of cellular and molecular mechanisms of liver repair after drug-induced injury will give more information about the mechanisms of liver structure and function of compensation for improvement of the best options pathogenetic correction of chronic drug-induced hepatitis.

Keywords: drug-induced hepatitis, immature rat liver cell cycle, reparative regeneration.

Введение

Проблема ятрогенной гепатотоксичности достаточно актуальна в современной гепатологии, так как частота медикаментозных гепатитов достаточно высока и имеет тенденцию к увеличению в связи с ростом ряда заболеваний, требующих длительного применения препаратов, обладающих гепатотоксическим действием [1, 2, 5]. Согласно исследованиям британских ученых [6], 20% из общего числа эпизодов печеночной недостаточности у детей связано с приемом лекарственных препаратов, среди них – 5% случаев связано с приемом противотуберкулезных препаратов.

Недостаточно изучен вопрос особенностей репаративной регенерации печени при хроническом медикаментозном гепатите (ХМГ) у неполовозрелых крыс, также открыт вопрос о влиянии гепатопротекторов на эти механизмы [3].

Цель работы – используя метод проточной цитофлуориметрии изучить фазы клеточного цикла в ядрах гепатоцитов неполовозрелых крыс с хроническим рифампицин–изониазид индуцированным гепатитом.

Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование по воспроизведению модели хроническо-

го рифампицин–изониазид индуцированного медикаментозного гепатита проводилось на 40 неполовозрелых нелинейных крысах-самках в возрасте 1 мес., с начальным весом 50–55 г [4].

Все экспериментальные исследования проводились с соблюдением «Общих этических принципов экспериментов на животных» и согласованы с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Для моделирования ХМГ крысам контрольной группы интрагастрально вводили рифампицин в дозе 86 мг/кг и изониазид в дозе 50 мг/кг (на стандартизованном растворителе ТВИН-65 и дистиллированной воде) трижды в неделю в течение 29 дней. Животным интактной группы вводили аналогичный объем стандартизованного растворителя ТВИН-65 и дистиллированной воды.

На 30-й день животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации под тиопенталовым наркозом. Печень экспериментальных животных извлекали под капсулой, для обеспечения стерильных условий. Проточную цитофлуориметрию проводили на многофункциональном проточном цитофлуориметре «PartecPAS» фирмы Partec (Германия) на базе НДЦ ВНМУ им. Н. И. Пирогова. Для проточной цитофлуориметрии из левой большой доли печени иссекали образец тканей (0,5 см³), тщательно промывали 0,9% раствором NaCl, помещали в фосфатно-солевой буфер с pH 7,4 (Sigma, США) и доставляли в портативном холодильнике (температура 4–8°C) для исследования содержания ДНК в ядрах гепатоцитов. Суспензии ядер из клеток печени получали с помощью раствора для исследования ядерной ДНК CyStainDNA фирмы Partec (позволяет одновременно экстрагировать ядра и метить ядерную ДНК) (Германия), в соответствии с протоколом-инструкцией изготовителя. Нуклеарные суспензии готовили с использованием одноразовых фильтров CellTrics 50 мкм (Partec, Германия). В течение 2 часов после забора тканей печени проводили исследование фаз клеточного цикла и содержания ДНК в ядрах гепатоцитов.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ “STATISTICA 6.1” (вла-

делец ЦНИТ ВНМУ им. Н. И. Пирогова, лицензионный № ВХХR901E246022FA). Определяли характер распределения признаков каждого из полученных вариационных рядов. Достоверность различий между независимыми количественными величинами определяли при нормальном распределении по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Проточная цитофлуориметрия печени неполовозрелых крыс, получавших в течение месяца противотуберкулезные препараты (рифампицин и изониазид), показала, что доля ядер клеток, пребывающих в фазе покоя и в пресинтетической фазе клеточного цикла (G_0 – G_1 интервал), была меньше чем в контроле на 11% (63,85±5,28% против 71,79±7,99% у крыс контрольной группы, при $p < 0,001$), что может свидетельствовать об альтерации высокоспециализированных гепатоцитов – наиболее чувствительных к воздействию гепатотоксических веществ, а также о мобилизации резервов (G_0 фаза) для обеспечения регенерации. Вместе с тем зарегистрировано, что доля ядер, пребывающих в фазе синтеза ДНК (S-фаза), была в три раза выше и составила 8,05±1,28% против 2,66±0,46% ($p < 0,0001$), что свидетельствует о существенном усилении синтетических процессов в ядрах гепатоцитов и активации компенсаторно-приспособительных механизмов в ответ на повреждение. Установлена обратная корреляционная связь ($r = 0,80$, $p < 0,05$) между показателями G_0 – G_1 и S-фазой у животных с ХМГ, что указывает на активацию синтетических процессов в ответ на повреждение гепатоцитов.

Нами зарегистрировано увеличение количества ядер (на 10%) в премитотической (постсинтетической) и митотической (G_2M) фазах. Данный показатель составляет 28,10±5,41% против 25,55±4,61 ($p < 0,05$), что свидетельствует об усилении митотических процессов в клетках печени в ответ на повреждение.

Достоверное увеличение индекса пролиферации (PI) (сумма показателей фаз S и G_2M) на 28,2% в ядрах гепатоцитов неполовозрелых крыс с ХМГ до 36,15±5,28 ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными в контрольной группе, что свидетельствует о развитии репаративной регенерации клеток печени

в ответ на альтерацию, вызванную воздействием гепатотоксинов.

Установлено достоверное увеличение доли ядер клеток печени в S-фазе в 3 раза, также возрастание PI при экспериментальном ХМГ у неполовозрелых крыс по сравнению с PI идентичных по возрасту крыс контрольной группы. Данные изменения подтверждают усиление синтеза ДНК и возникает, на наш взгляд, как компенсаторно-приспособительная реакция, направленная на восстановление массы поврежденного органа.

Введение лекарственных препаратов с гепатотоксическими свойствами неполовозрелым крысам приводит к повреждению ядер клеток паренхимы печени, что подтверждается увеличением фрагментации ДНК ядер гепатоцитов, как основного показателя патогенно индуцированного апоптоза, то есть развития необратимого повреждения клеток. У животных с ХМГ на гистограммах наблюдается существенное увеличение интервала R1 в сравнении с животными контрольных групп ($12.38 \pm 2.79\%$ против $5.9 \pm 1.37\%$, $p < 0.001$).

Одновременно зарегистрировано увеличение количества ядер гепатоцитов в S-фазе клеточного цикла при ХМГ у неполовозрелых крыс с усилением патологии ядра, то есть фрагментацией ДНК. Между показателями фрагментации ДНК ядер клеток печени и S-фазой установлено прямая сильная корреляционная связь ($r = 0.80$, $p < 0.001$).

Выводы

Полученные данные свидетельствуют об усилении патогенно индуцированного некроза, который синхронно с некрозом происходит в тканях печени при сочетанном воздействии рифампицина и изониазида, прямо коррелирует с компенсаторным усилением фазы синтеза ДНК в клетках печени, но является недостаточным для полного восстановления структуры и функции органа. Альтерация паренхимы печени гепатотоксическими лекарственными препаратами проявляется процессами некроапоптоза и одновременно инициирует активацию клеточного цикла, то есть переход клеток из фазы покоя в фазы G₁, S, G₂M, что свидетельствует о включении защитных механизмов, направленных на сохранение целостности органа.

Список литературы

1. Адеметионин при алкогольассоциированных заболеваниях печени: клинико-экспериментальное исследование / М.А. Бутов, А.С. Василевская, М.В. Мнихович, О.А. Маслова // *Врач*. 2014. № 6. С. 49–52.
2. Гепатопротекторы в устранении алкогольных повреждений печени / А.С. Василевская [и др.] // *Экспериментальная гастроэнтерология*. 2013. № 12. С. 79–82.
3. Мороз В. М. Вплив гепатопротекторів на клітинні механізми репаративної регенерації тканини печінки при хронічному токсичному гепатиті у статевонезрілих щурів / В.М. Мороз, Н.А. Рыкало // *Журнал АМН України*. 2010. Т. 16, № 4. С. 701–712.
4. Патент № 77270 України, МПК (2013) G09B 23/28. Спосіб моделювання токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів / Н. А. Рыкало, О. Ю. Гуминська; власник Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова. – № u2012 08154; заявл. 03.07.2012; опубл. 11.02.2013, Бюл. № 3.
5. Шульпекова Ю. О. Лекарственные поражения печени / О.Ю. Шульпекова // *Врач*. 2010. № 7. С. 13–18.
6. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure / K.F. Murray [et al.] // *J.Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008. Vol. 47(4). P. 395–405.

Информация об авторах

Рыкало Надежда Анатольевна – д-р мед. наук, доцент зав. кафедрой патофизиологии Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

Гуминская Ольга Юрьевна – ассистент кафедры патофизиологии Винницкого национального медицинского университете имени Н.И. Пирогова. oyguminska@gmail.com

Мнихович Максим Валерьевич – канд. мед. наук, ведущий научн. сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», доцент кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии пед. ф-та ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Жакота Дмитрий Анатольевич – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова».

Казанцева Галина Петровна – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины ГБОУ ВПО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Соколов Дмитрий Александрович – канд. мед. наук, доцент кафедры нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО «ВГМУ им. Н. Н. Бурденко» Минздрава России.

Филин Андрей Анатольевич – канд. мед. наук, зав. кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО «ВГМУ им. Н. Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

Поступила в редакцию 19.02.2016 г.