

УДК 616.36-004:616.24-06:616.36-071.3]-092.9

© І. Я. КРИНИЦЬКА, Ю. М. ОРЕЛ, І. М. КЛІЩ

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"

## Морфометричні показники печінки у щурів із модельованим гепатопульмональним синдромом

I. YA. KRYNYTSKA, YU. M. OREL, I. M. KLISHCH

SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky"

### MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE LIVER IN RATS WITH MODULATED HEPATOPULMONARY SYNDROME

В експерименті на щурах із двома моделями гепатопульмонального синдрому проведено дослідження морфометричних показників печінки. Результати проведеного дослідження вказують на глибокі морфологічно-функціональні зміни печінки, які проявилися ушкодженням і загибеллю гепатоцитів, порушеннями гемодинаміки та структурною перебудовою органа зі збільшенням у його складі відносної частки компонентів стромы.

In experiments on rats with two models of hepatopulmonary syndrome the morphometric parameters of the liver were studied. Results of the investigation indicate a pronounced morphofunctional changes of the liver: injury and death of hepatocytes, impaired hemodynamics and restructuring of the organ with an increasing in its stock relative proportion of stroma components.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій.** В наш час прогресивно зростає кількість ускладнень хронічних дифузних захворювань печінки, в тому числі і з боку дихальної системи, які проявляються артеріальною гіпоксемією, що було названо "гепатопульмональним синдромом" (ГПС) [1].

Прогноз при ГПС – несприятливий і ризик смерті у найближчий рік складає 41 %. Даний синдром можна розглядати як окреме показання до ортотопічної трансплантації печінки [2]. Крім того, оскільки на сучасному етапі патогенез ГПС залишається до кінця не вивченим, то ортотопічна трансплантація печінки є єдиним успішним методом лікування пацієнтів із даною проблемою. Тим не менше, післяопераційна смертність та проміжок між трансплантацією та поліпшенням артеріальної оксигенації збільшуються у хворих із гострою передтрансплантаційною гіпоксемією внаслідок ГПС [3]. Найсильнішим предиктором смерті є передопераційне  $PaO_2 < 50$  мм рт. ст. або менше і перфузійна скінтиграфія легень і мозку з мозковим поглинанням 20 % і більше [4]. Летальність після проведення трансплантації печінки у пацієнтів з  $PaO_2 < 50$  мм рт. ст. протягом року перевищує 40 % [5]. Тим не менше, якщо раніше гіпоксемію вважали відносним протипоказан-

ням до ортотопічної трансплантації печінки, то на сьогодні навпаки – показники  $PaO_2 \leq 50-60$  мм рт. ст. є прямим показанням до трансплантації [6].

Регресування симптомів ГПС після трансплантації печінки не завжди буває повним (повне лише у 80 % пацієнтів) і може тривати 6 місяців і більше [2]. Після трансплантації печінки 5-річну тривалість життя мають 76 % пацієнтів [7]. Інші автори [8, 9] стверджують, що у близько 85,0 % пацієнтів із ГПС після трансплантації печінки спостерігається значне поліпшення або повне усунення гіпоксемії впродовж 1 року.

Залишаються суперечливими дані про залежність рівня респіраторних змін від ступеня ураження гепатоцитів при хронічних дифузних захворюваннях печінки. За результатами наших попередніх досліджень у щурів із модельованим гепатопульмональним синдромом було встановлено виражений дисбаланс газового складу артеріальної крові, наявність ознак гіпоксемії та порушення кислотно-лужного стану [10, 11], що зробило актуальним вивчення ступеня ураження гепатоцитів у тварин із вищевказаною патологією.

**Мета роботи:** проаналізувати морфометричні показники печінки у щурів із модельованим гепатопульмональним синдромом.

**Матеріали і методи.** Досліди проводили на 58 безпородних щурах-самцях масою 180–220 г. У процесі моделювання патології 10 тварин загинули.

Першу експериментальну модель гепатопульмонального синдрому ми створювали шляхом накладання подвійної лігатури на загальну жовчовивідну протоку і подальшого її пересічення скальпелем [12]. Тварин анестезували внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Виконавши розріз під мечоподібним відростком, загальну жовчовивідну протоку відділяли від розташованих поруч тканин, накладали подвійну лігатуру вище і нижче місця планованого перетину. Потім загальну жовчовивідну протоку пересікали скальпелем. У контрольній групі № 1 тварин загальну жовчовивідну протоку було відділено від тканин, але її не пересікали. Післяопераційну рану пошарово, наглухо зашивали. На 31-шу добу після операції тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом.

Друга експериментальна модель ГПС була створена шляхом 8-тижневого внутрішньошлункового введення олійного розчину  $CCl_4$  (400 г на 1 л) в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини в перший день експерименту, 0,3 мл на 100 г на третій день експерименту і далі кожного третього дня до закінчення експерименту 0,3 мл на 100 г. Додатково в раціон щурів було введено суміш кукурудзяної муки, смальцю і холестеролу та розчин алкоголю. Контрольна група тварин № 2 перебувала на стандартному раціоні віварію і отримувала внутрішньошлунково оливкову олію в еквівалентній кількості [13].

Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” [14].

Для гістологічних досліджень шматочки печінки фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну та заливали в парафінові блоки. Готували гістологічні зрізи завтовшки 5–6 мкм і фарбували їх гематоксиліном та еозином. На гістологічних препаратах оцінювали такі морфометричні параметри: діаметр гепатоцитів, діаметр ядер гепатоцитів, ядерно-цитоплазматичний індекс у гепатоцитах, відносний об’єм паренхіми, стромально-паренхіматозний індекс, відносний об’єм центральних вен, відносний об’єм синусоїдів, відносний об’єм портальних трактів та відносний об’єм пошкоджених гепатоцитів [15].

Результати оброблено параметричними методами варіаційної статистики з визначенням t-критерію Стьюдента.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Динаміку змін досліджуваних нами морфометрич-

них параметрів печінки ілюструють дані, представлені в таблиці 1.

Встановлено, що у піддослідних тварин контрольної групи № 1 діаметр гепатоцита складав  $(14,2 \pm 0,3)$  мкм, діаметр його ядра  $(4,9 \pm 0,2)$  мкм, а ядерно-цитоплазматичний індекс  $- 0,0740 \pm 0,0008$ . Структурні співвідношення складових елементів печінки на тканинному рівні організації характеризувалися показниками їх відносного об’єму. Отанній становив  $(79,1 \pm 1,4)$  % для паренхіми,  $(3,4 \pm 0,2)$  % – для ушкоджених гепатоцитів,  $(9,9 \pm 0,2)$  % – для центральних вен,  $(9,4 \pm 0,2)$  % – для синусоїдів,  $(1,2 \pm 0,1)$  % – для портальних трактів. Стромально-паренхіматозний індекс при цьому дорівнював  $0,218 \pm 0,009$ .

У контрольній групі № 2 числові величини перелічених вище морфометричних параметрів були практично ідентичними. Діаметр гепатоцитів і їх ядер складав  $(15,0 \pm 0,5)$  і  $(5,2 \pm 0,2)$  мкм відповідно, ядерно-цитоплазматичний індекс дорівнював  $0,0755 \pm 0,001$ . Відносний об’єм паренхіми становив  $(78,8 \pm 1,6)$  %, ушкоджених гепатоцитів –  $(4,1 \pm 0,3)$  %, центральних вен –  $(10,2 \pm 0,3)$  %, синусоїдів –  $(9,0 \pm 0,3)$  %, портальних трактів –  $(1,3 \pm 0,1)$  %, стромально-паренхіматозний індекс –  $0,224 \pm 0,008$ .

Дистрофічні та некротичні зміни клітин печінкової паренхіми, що мали місце в тварин обох експериментальних груп, проявилися зменшенням розмірів гепатоцитів, їх ядер, а також зміною ядерно-цитоплазматичних співвідношень. Діаметр гепатоцитів у щурів на 31-шу добу після перев’язки загальної жовчовивідної протоки зменшувався на 28,87 % відносно контролю, у щурів з тетрахлорметаніндукованим цирозом – на 36,00 %. В обох випадках різниця між значеннями морфометричного показника у контрольних і досліджуваних групах була статистично достовірною –  $p < 0,001$ . Поперечник ядра гепатоцита у тварин на 31-шу добу після перев’язки загальної жовчовивідної протоки меншав на 8,16 %. При введенні  $CCl_4$  цей параметр зменшувався на 21,15 %, при цьому  $p < 0,01$ . Паралельно регресував і ядерно-цитоплазматичний індекс – на 20,95 % у експериментальній групі № 1 і на 32,98 % у групі № 2 ( $p < 0,001$  в обох випадках).

Описані деструктивні зміни гепатоцитів знайшли своє відображення у різкому зменшенні відносного об’єму паренхіми печінки – на 38,6 % в експериментальній групі № 1 і на 52,6 % у групі № 2, а також у значному зростанні відносного об’єму ушкоджених гепатоцитів – в 8,7 і 12,4 раза відповідно. Відмінність між перерахованими величинами була статистично достовірною у групах контролю та експериментальних групах ( $p < 0,001$ ).

Таблиця 1. Морфометричні показники печінки щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом (M±m)

Морфометричні показники	Досліджувані групи			
	контрольна група №1 (n=12)	експериментальна група №1 (n=12)	контрольна група №2 (n=12)	експериментальна група №2 (n=12)
Діаметр гепатоцита, мкм	14,2±0,3	10,1±0,1 p <sub>1</sub> <0,001	15,0±0,5	9,6±0,2 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05
Діаметр ядра гепатоцита, мкм	4,9±0,2	4,5±0,1	5,2±0,2	4,1±0,3 p <sub>1</sub> <0,01
Ядерно-цитоплазматичний індекс	0,0740±0,0008	0,0585±0,0012 p <sub>1</sub> <0,001	0,0755±0,001	0,0506±0,0008 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Відносний об'єм паренхіми, %	79,1±1,4	40,5±1,0 p <sub>1</sub> <0,001	78,8±1,6	26,2±0,6 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів, %	3,4±0,2	29,7±0,9 p <sub>1</sub> <0,001	4,1±0,3	50,9±3,0 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Відносний об'єм центральних вен, %	9,9±0,2	10,4±0,4	10,2±0,3	11,8±0,3 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,05
Відносний об'єм синусоїдів, %	9,4±0,2	8,9±0,1 p <sub>1</sub> <0,05	9,0±0,3	8,1±0,2 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,01
Відносний об'єм портальних трактів, %	1,2±0,1	2,3±0,2 p <sub>1</sub> <0,001	1,3±0,1	2,9±0,2 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05
Стромально-паренхіматозний індекс	0,218±0,009	0,322±0,010 p <sub>1</sub> <0,001	0,224±0,008	0,401±0,013 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001

Примітки:

- 1) p<sub>1</sub> – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами;
- 2) p<sub>2</sub> – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

Розлади печінкової гемодинаміки, які супроводжували модельований ГПС, проявлялися повнокров'ям центральних вен, про що свідчить збільшення їх відносного об'єму. Цей морфометричний показник інтенсифікувався відносно контролю на 0,5 % у першій експериментальній групі і на 1,6 % – у другій. Слід зазначити, що остання відмінність була статистично достовірною (p<0,01), що вказує на більш виражені дисциркуляторні порушення у щурів із тетраклорметаніндукованим цирозом.

За рахунок некрозу гепатоцитів і патологічних змін архітектоніки печінкових часточок у піддослідних тварин зменшувався відносний об'єм синусоїдів: на 0,5 % в експериментальній групі № 1 і на 0,9 % – у групі № 2. В обох групах різниця була достовірна порівняно з контрольними тваринами (p<0,05).

Активізація склеротичних процесів, явища холестази (особливо у тварин із пересіченою жовчовивідною протокою), повнокров'я судин – ці пато-

логічні зміни зумовили збільшення відносного об'єму портальних трактів. Зростання цього показника відносно контрольних значень було статистично достовірним в обох експериментальних групах (p<0,001) і склало 1,1 % у групі № 1 і 1,6 % – у групі № 2.

Узагальнюючим комплексним індикатором описаних вище патологічних змін печінкової тканини можна вважати стромально-паренхіматозний індекс, який збільшувався в 1,47 раза в експериментальній групі № 1 і у 1,79 раза – в групі № 2 (рис. 1). При цьому числові значення індексу достовірно відрізнялися від тотожних у групах контролю (p<0,001). Такі трансформації є результатом зростання частки стромальних структур та загибелі гепатоцитів і зменшення об'єму паренхіми.

Зіставляючи між собою значення вивчених нами морфометричних показників печінкової тканини в обох експериментальних групах, встановлено, що всі вони, за винятком діаметра ядра гепатоцита,

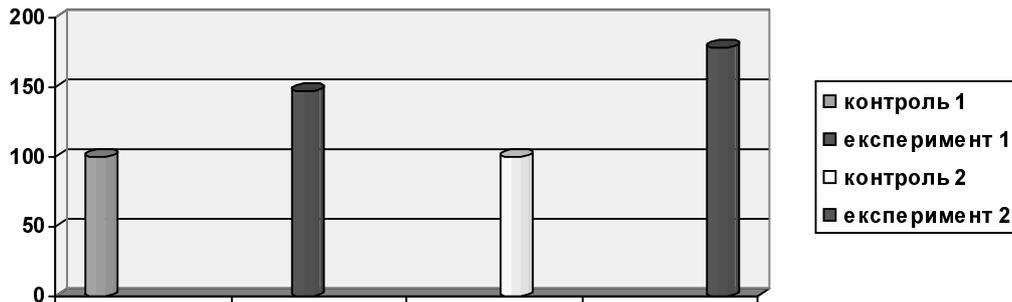


Рис. 1. Зміни стромально-паренхіматозного індексу печінки у відсотках.

достовірно відрізняються між собою ( $p < 0,05 \dots 0,001$ ). Таке порівняння свідчить про більш значне ураження печінки при моделюванні ГПС шляхом введення  $CCl_4$  порівняно з моделлю, яка передбачає механічне пересічення жовчовивідної протоки.

**Висновки.** Отже, модельований ГПС супроводжується суттєвими змінами гістоморфометричних параметрів печінкової тканини, що вказує на її гли-

бокі морфофункціональні зміни. Якісний характер цих змін проявляється ушкодженням і загибеллю гепатоцитів, порушеннями гемодинаміки та структурною перебудовою органа із збільшенням у його складі відносної частки компонентів строми. Інтенсивність патологічних змін є більш вираженою при моделюванні ГПС шляхом введення тетрахлорметану, що об'єктивно підтверджується величинами всіх досліджуваних морфометричних показників.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Rodriguez-Roisin R. Hepatopulmonary syndrome — a liver-induced lung vascular disorder / R. Rodriguez-Roisin, M. J. Krowka // *The New England Journal of Medicine*. — 2008. — Vol. 358, № 22. — P. 2378–2387.
- Гепатопульмональний синдром: состояние проблемы / Л. Ю. Ильченко, И. Г. Федоров, А. А. Карабиненко [и др.] // *СТМ*. — 2009. — № 1. — С. 84 – 88.
- Liver transplantation for hepatopulmonary syndrome: a ten-year experience in Paris, France / C. Taille, J. Cadranel, A. Bellocq [et al.] // *Transplantation*. — 2003. — Vol. 75. — P. 1482–1489.
- Fukushima K. Y. Two cases of hepatopulmonary syndrome with improved liver function following long-term oxygen therapy / K. Y. Fukushima, H. Yatsushashi, A. Kinishita [et al.] // *J. Gastroenterology*. — 2007. — Vol. 42 – P. 176–180.
- Roberts K. E. Genetic risk factors for hepatopulmonary syndrome in patients with advanced liver disease / K. E. Roberts, S. M. Kawut, M. J. Krowka // *Gastroenterology*. — 2010. — Vol. 139. — P. 130–139.
- Pulmonary-Hepatic vascular Disorders (PHD) / R. Rodriguez-Roisin, M. J. Krowka, P. Herve [et al.] // *Eur. Respir. J.* — 2004. — Vol. 24. — P. 861–880.
- Гепатопульмональний синдром / С. В. Курсов, К. Г. Михневич, Н. В. Лизогуб, С. Н. Скороплет // *Медицина неотложных состояний*. — 2009. — № 5 (24). — С. 35–39.
- Абрагамович М. О. Гепатопульмональний синдром: особливості патогенезу, діагностики, клінічного перебігу та ліку-

- вання / М. О. Абрагамович // *Український медичний альманах*. — 2010. — Т. 13, № 5. — С. 10–13.
- Lange P. A. Hepatopulmonary syndrome: effects of liver transplantation / P. A. Lange, J. K. Stoller // *Clin. Chest Med.* — 1996. — Vol. 17. — P. 115–123.
- Криницька І. Я. Зміни газового складу артеріальної крові у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом / І. Я. Криницька, І. М. Кліщ // *Вісник наукових досліджень*. — 2012. — № 4 (69). — С. 72–75.
- Криницька І. Я. Кислотно-лужний стан крові у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом / І. Я. Криницька, І. М. Кліщ // *Шпитальна хірургія*. — 2012. — № 4. — С. 52–55.
- Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome / M. B. Fallon, G. A. Abrams, J. W. McGrath [et al.] // *Am. J. Physiol.* — 1997. — Vol. 272. — P. 779–784.
- Multiple pathogenic factor-induced complications of cirrhosis in rats: A new model of hepatopulmonary syndrome with intestinal endotoxemia / Hui-Ying Zhang, De-Wu Han, Zhong-Fu Zhao [et al.] // *World J. Gastroenterology*. — 2007. — Vol. 13 (25). — P. 3500–3507.
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. — Council of Europe. Strasbourg. — 1986. — № 123. — 52 p.
- Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. — М. : Медицина, 2002. — 240 с.

Отримано 22.01.13