

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-163-3-77-80

УДК: 616.36:616.411–087.87]-092.4

Влияние токсического повреждения печени на структурные изменения митохондрий и внутриклеточных органелл*

Лепехова С. А.¹, Гольдберг О. А.², Прокопьев М. В.³, Курганский И. С.^{1,2}, Киреева В. В.¹, Иноземцев П. О.¹, Апарцин К. А.¹

¹ Федеральное государственное учреждение науки «Иркутский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук (664033, г. Иркутск, Россия)

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, Россия)

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Иркутская область «Знак почета» областная клиническая больница (664049, г. Иркутск, Россия)

Effect of toxic liver damage on structural changes in mitochondria and intracellular organelles*

S. A. Lepekhova¹, O. A. Goldberg², M. V. Prokop'ev³, I. S. Kurgansky^{1,2}, V. V. Kireeva¹, P. O. Inozemcev¹, K. A. Apartsin¹

¹ Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (664033, Irkutsk, Russia)

² Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, Russia)

³ Irkutsk Regional Clinical Hospital (664049, Irkutsk, Russia)

Для цитирования: Лепехова С. А., Гольдберг О. А., Прокопьев М. В., Курганский И. С., Киреева В. В., Иноземцев П. О., Апарцин К. А. Влияние токсического повреждения печени на структурные изменения митохондрий и внутриклеточных органелл. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;163(3): 77–80. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-163-3-77-80

For citation: Lepekhova S. A., Goldberg O. A., Prokop'ev M. V., Kurgansky I. S., Kireeva V. V., Inozemcev P. O., Apartsin K. A. Effect of toxic liver damage on structural changes in mitochondria and intracellular organelles. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;163(3): 77–80. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-163-3-77-80

Лепехова Светлана Александровна, заведующий отделом медико-биологических исследований и технологий, главный научный сотрудник, д.б.н.

Гольдберг Олег Аронович, лаборатория клеточных технологий и регенеративной медицины, ведущий научный сотрудник, к.м.н.

Прокопьев Максим Владимирович, врач-хирург, к.м.н.

Курганский Илья Сергеевич, научный отдел экспериментальной хирургии с виварием, младший научный сотрудник

Киреева Виктория Владимировна, отдел медико-биологических исследований и технологий, старший научный сотрудник, к.м.н.

Иноземцев Павел Олегович, отдел медико-биологических исследований и технологий, младший научный сотрудник, к. фарм.н.

Апарцин Константин Анатольевич, директор ИНЦ СО РАН, профессор, д.м.н.

Svetlana A. Lepekhova, Head of the Department of Biomedical Research and Technology, Chief Researcher, Doctor of Biological Sciences

Oleg A. Goldberg, Laboratory of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Leading Researcher

Maksim V. Prokop'ev, Irkutsk Regional Clinical Hospital, Surgeon, PhD

Il'ja S. Kurgansky, scientific department of experimental surgery with vivarium, Junior Researcher

Viktorija V. Kireeva, Department of Biomedical Research and Technology, Senior Researcher

Pavel O. Inozemcev, Department of Biomedical Research and Technology, Senior Researcher, PhD

Konstantin A. Apartsin, Director of Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the RAS, Professor, Doctor of Medical Sciences

✉ **Corresponding author:**

**Лепехова
Светлана Александровна**
Svetlana A. Lepekhova
lepekhova_sa@mail.ru

* **Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал.**

* **Illustration to the article are on the colored inset of the Journal.**

Исследование выполнено в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, отдел медико-биологических исследований и технологий

Поиск маркеров заболеваний печени и связанных с этим патологических состояний является одной из важнейших задач современной фундаментальной и прикладной медицины. Данная патология способна давать осложнения в виде желтухи, коагулопатии и энцефалопатии, а также переходить в полиорганную недостаточность [1, 2].

Очень важно, что в качестве маркеров могут выступать сигнальные молекулы и биологические процессы, играющие ключевую роль в патогенезе печеночной недостаточности. При этом очевидно,

что, чем универсальнее патогенетическая роль данных процессов, тем более широкий спектр нозологических единиц может быть показанием для потенциального терапевтического воздействия и тем большие перспективы открываются при воздействии на мишень.

Процесс повреждения клеток при воздействии гепатотоксина четыреххлористого углерода связан с восстановительной дегалогенизацией при участии специфического цитохрома P-450 с массой 52 kDa, последующее образование трихлорметилперокси

радикала, инициирующего перекисное окисление липидов эндоплазматического ретикулула с одновременной потерей системы цитохрома P-450, глюкозо-6-фосфатазы и прогрессирующим снижением способности эндоплазматического ретикулула к секвестрации Ca^{2+} . Это событие рассматривают в качестве ключевого в дальнейшем патогенезе деструкции гепатоцитов, поскольку прогрессирующее нарастание концентрации Ca^{2+} в цитозоле в комплексе с активацией перекисного окисления липидов вызывает активацию фосфолипазы A_2 и необратимое повреждение клеточной мембраны гепатоцитов [1, 4].

Морфологическим эквивалентом является развитие массивных некрозов, характерное для

острого токсического повреждения печени четыреххлористым углеродом, которое сменяется жировой дегенерацией ткани, обусловленной аккумуляцией жиронакапливающих клеток в некротических участках с усилением их коллагенсинтетической функции [3, 5]. Однако, по нашему мнению, важным пусковым моментом приводящим к необратимым повреждениям являются структурные изменения митохондрий и внутриклеточных органелл.

Целью нашего исследования было исследовать структуру митохондрий и внутриклеточных органелл при развитии печеночной недостаточности в условиях острого токсического повреждения печени.

Материалы и методы исследования

Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище соответственно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». В эксперимент включали крыс-самцов породы Wistar в возрасте не менее 6 месяцев, весом 200–250 г. Опыты на животных выполнялись в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), приказ № 708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»; правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных», а также основывались на положениях Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУН ИНЦ СО РАН.

У всех экспериментальных крыс моделировали острое токсическое повреждение печени. Моделирование выполняли путем подкожного введения четыреххлористого углерода чистого для анализов из расчета 0,5 мг/100г массы животного по А. Фишеру (1961) [7].

Проведено исследование морфологических изменений структуры ткани печени при токсическом воздействии методом световой и электронной микроскопии.

Для световой микроскопии материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Исследовали депарафинированные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, ПАС-реакцией и с окраской на липиды.

Для определения клеточного состава ткани печени, выведенных из эксперимента животных на 2, 4, 6 сутки эксперимента проводили количественную оценку методом счетного квадрата по Автандилову с использованием окуляр-микрометра [6]. С помощью окулярной морфометрической

сетки подсчитывали количество паренхиматозных клеток и непаренхиматозных клеточных элементов (площадь каждого поля зрения составляла 25600 мкм^2) на препаратах печени 6 крыс каждой группы.

Для электронной микроскопии фрагменты печени, забранные на 2, 4 сутки эксперимента помещали в 10% раствор параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) и фиксировали в течение 24 часов. После промывки постфиксировали в 1% растворе OsO_4 на том же буфере с 0,1М сахарозой в течение 2-х часов, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и заливали в эпон-аралдит.

Ультратонкие срезы толщиной 300–400 Å резали на ультратоме LKB-Nova (Швеция), монтировали на сетки, покрытые формваром. После окрашивания насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца просматривали в электронном микроскопе EM 400 D (Phillips, Голландия) при ускоряющем напряжении 80 КВ. На ультратонких срезах, полученных с каждого блока, фотографировали по 2 случайно выбранных участка цитоплазмы гепатоцитов так, чтобы на одно наблюдение приходилось 8–10 фотопластинок, при увеличении $\times 24000$.

Морфометрический анализ ультраструктурной организации паренхиматозных клеток печени проводили на фотографиях при конечном увеличении $\times 45000$ с помощью открытой тестовой системы по формуле $V=(P_t/P_k) \times 100$, где P_t -число узлов тестовой решетки, попавшей в митохондрии или мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулула; P_k - число узлов тестовой решетки.

Все экспериментальные данные исследования были статистически обработаны с использованием программы Statistica 10.0 (лицензия № AXAR402G263414FA-V), представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилями (25-й и 75-й процентиля). Определение значимости различий, полученных данных (p) в сравниваемых выборках, проведено с использованием непараметрических методов (критерий Манна-Уитни (U), критерий Вилкоксона (W)) [8].

Результаты и их обсуждение

При оценке структурных изменений в ткани печени крыс на 2-е сутки эксперимента при световой микроскопии выявляли очаги некроза гепатоцитов центрлобулярные и коагуляционные, вакуолизацию и липидную инфильтрацию гепатоцитов, участки дисконформации балочных структур.

На 4-е сутки исследования нами были выявлены деструктивные изменения: очаги некроза гепатоцитов; расширенные синусоидальные капилляры со скоплениями эритроцитов; группы нейтрофилов и лимфоцитов вокруг некротически измененных гепатоцитов; увеличенные в объеме ядра ретикулоэндотелиальных клеток; прогрессирующая или тотальная жировая и гидропическая дистрофия гепатоцитов рисунок 1.

Для количественной оценки весь спектр клеток печени крысы был условно разделен нами на три группы. Выделяли гепатоциты без признаков повреждения и гепатоциты с разной степенью вакуолизации цитоплазмы (с крупными вакуолями) и непаренхиматозные фагоцитирующие клетки (макрофаги, нейтрофильные лейкоциты, эндотелиальные клетки). Количество сохранившихся гепатоцитов на 4-е сутки уменьшалось в 3,4 раза и составило 14,6 (13,8–16,8) при норме 49,3 (46,4–52,0), возросло количество вакуолизованных гепатоцитов до 16,0 (15,0–16,8) при отсутствии таких клеток у здоровых животных, увеличивалось количество непаренхиматозных клеток 19,6 (18,0–21,8) при норме 11,0 (8,0–12,0)

Соотношение клеточных элементов в печени животных здоровых и группы с токсическим повреждением печени оказалось различным к 4-м суткам эксперимента. В группе с токсическим повреждением печени удельный вес неповрежденных гепатоцитов был существенно ($p \leq 0,0001$) ниже, а вакуолизованных – выше ($p \leq 0,0001$), чем в норме.

Электронная микроскопия образцов печени крыс на 2 сутки исследования демонстрировала, что значение площади ядра достоверно увеличивается по сравнению с нормой 30,0 (29,6–30,5) и составляет соответственно 35,0 (32,0–36,2) у.е. ($p < 0,05$). Площадь цитоплазмы в клетках животных достоверно увеличивается по сравнению с нормой 6,8 (6,3–6,9) у.е. и составляет соответственно 8,4 (8,1–8,9) у.е. ($p < 0,05$). При электронно-микроскопическом исследовании печени у животных в большинстве гепатоцитов отмечалось понижение электронной плотности цитоплазматического матрикса; выявляются существенные сдвиги важнейших внутриклеточных структур. Профили каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума не имеют большой протяженности, расширены и фрагментированы, на большом протяжении лишены рибосом. Объемная доля гранулярного эндоплазматического ретикулума достоверно увеличивается 10,1 (9,7–11,2)% по сравнению с нормой 6,5 (6,1–6,8)% ($p < 0,05$). Численная плотность гранулярного эндоплазматического ретикулума возросла за счет увеличения его фрагментации.

Митохондрии большей частью округлой формы, их матрикс гомогенный, электронно-светлый, кристы различной длины, просматриваются плохо. Встречаются вакуолизованные митохондрии с полностью разрушенными кристами. При морфометрическом исследовании отмечали увеличение объемной доли митохондрий до 29,7 (29,0–31,0)% при норме 20,0 (19,6–21,0)%, ($p = 0,006$) и снижение численной плотности митохондрий до 5,9 у.е. К отдельным митохондриям прилежат первичные лизосомы. Лизосомы как первичные, так и вторичные встречаются по всей площади цитоплазмы. Особенно много вторичных лизосом около желчных канальцев. Довольно часто встречаются миелиновые тельца.

Липидные включения располагаются в виде капель различной величины. Гранулы гликогена встречаются редко в единичных количествах и располагаются между мембранами гранулярной сети и митохондриями. Ядра имеют светлый матрикс. Околоядерное пространство ядерной оболочки у большинства ядер на большом протяжении расширено. Хроматин располагается отдельно лежащими глыбками по всему срезу ядра. Изменения в комплексе Гольджи сводятся к дезорганизации его компонентов, которые представлены в виде вакуолей. Желчные канальцы значительно расширены. Между отдельными гепатоцитами выявляются очень широкие межклеточные щели. Ультраструктура стенки синусоидов нарушена. В пределах одного среза встречаются синусоиды как с равномерно расширенным, так и деформированным просветом. В них располагается большое количество эритроцитов.

Клетки Купфера в большинстве случаев набухшие. Их ядра увеличены в объеме, ядрышко располагается эксцентрично. Ядерный хроматин разбросан по всей площади ядра. Отмечаются признаки активации фагоцитарного аппарата. В цитоплазме наблюдаются скопления лизосом, остаточных телец и липидных капель. Каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума значительно расширены, резко увеличено количество вторичных лизосом. Зачастую отростки клеток Купфера проникают в пространство Диссе. Последнее на больших промежутках значительно расширено и заполнено аморфным электронно-светлым материалом.

Исследование ультраструктуры печени на 4 сутки эксперимента выявило, что площадь цитоплазмы увеличивается до 10,2 (9,8–11,0) у.е. $p = 0,001$. В просвете синусоидов встречаются как отдельно лежащие клеточные органеллы, так и целые участки цитоплазмы. Гепатоциты заполнены темным цитоплазматическим матриксом. Деструктивные изменения представлены расширением и фрагментацией гранулярного эндоплазматического ретикулума (Рисунок 2). Цитоплазма заполнена жировыми включениями различного диаметра. Во многих гепатоцитах эти включения занимают практически весь объем гиалоплазмы. Гликоген,

так же, как и первичные лизосомы практически исчезают из цитоплазмы. Митохондрии набухшие, с гомогенно плотным матриксом, кристы просматриваются плохо или полностью разрушены.

Визуальную картину подтверждают и количественные данные. Морфометрическое исследование показало существенное увеличение объемной плотности гранулярного эндоплазматического ретикула по сравнению с нормой 6,5 (6,1–6,8)% до 36,8 (34,9–39,0) ($p=0,0001$), отмечается увеличение числа фрагментов гранулярного эндоплазматического ретикула до 79,4 (77,2–82,3) при норме 40,1 (38,4–42,0) ($p=0,001$).

Стопки и цистерны комплекса Гольджи значительно расширены, в отдельных гепатоцитах отмечается их деструкция. Перинуклеарное пространство на значительном протяжении расширено.

Встречаются глубокие инвагинации ядерной оболочки. Площадь ядер составила 37,6 (36,0–39,5) у.е. В материале наблюдается перестройка стенки

синусоидов, часто встречаются набухшие синусоидальные клетки. Местами их плазмолемма разрушена и разрушена, тогда в просвете синусоидов встречаются клеточные органеллы и мембраны. Клетки Купфера значительно увеличены в объеме, часто занимают весь просвет синусоида. Их ядра крупные, кариолемма изрезана. Ядрышки просматриваются плохо. В цитоплазме в большом количестве встречаются вторичные лизосомы, вакуоли, липидные включения различных размеров. Каналы гранулярного эндоплазматического ретикула значительно расширены, часто на большом протяжении лишены рибосом. Микроворсинки гепатоцитов, выступающие в пространство Диссе, сглажены.

Таким образом, нами установлено повреждение клеток печени при токсическом воздействии с необратимыми изменениями к четвертым суткам исследования с разрушением митохондрий и других внутриклеточных органелл.

Литература | References

1. *Искра А.И., Лепехова С.А.* Перспектива использования биотехнологий для коррекции печеночной недостаточности (обзор литературы) // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 1 (95). – С. 112–119.
Iskra A. I., Lepel'khova S. A. Perspektiva ispol'zovaniya biotekhnologij dlja korrekcii pechenochnoj nedostatochnosti (obzor literatury) [The prospect of using biotechnology for the correction of liver failure (literature review)]. Bjulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdelenija Rossijskoj akademii medicinskih nauk – [Bulletin of the East-Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences], 2014, no.1 (95), pp. 112–119.
2. *Разумова М.С., Литвинова Е.С., Быстрова Н.А., Чуева Т.В.* Метаболическая активность культуральной жидкости ксеногенных, аллогенных гепатоцитов и фибробластов в условиях экспериментального острого тетрахлорметанового поражения печени // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2016. – № 2. – С. 74–80.
Razumova M. S., Litvinova E. S., Bystrova N. A., Chueva T. V. Metabolicheskaja aktivnost' kul'tural'noj zhidkosti ksenogennyh, allogennyh hepatocitov i fibroblastov v uslovijah jeksperimental'nogo ostrogo tetrahlormetanovogo porazhenija pecheni [Metabolic activity of culture fluid of xenogenic, allogenic hepatocytes and fibroblasts under conditions of experimental acute tetrachloromethane liver damage]. Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik Chelovek i ego zdorov'e – [Kursk Scientific and Practical Gazette Man and his health], 2016, no. 2, pp. 74–80
3. *Ramachandran A. Jaeschke H.* Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology // J. Clin. Transl. Res. 2017 Feb;3(Suppl 1). – p.157–169. doi: 10.18053/jctres.03.2017S1.002.
4. *Tang D. Wang F. Tang J. et al.* Dicranostiga leptopodu (Maxim.) Fedde extracts attenuated CCl_4 -induced acute liver damage in mice through increasing anti-oxidative enzyme activity to improve mitochondrial function // Biomed Pharmacother. 2017 Jan;85. – p.763–771. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.097. Epub 2016 Dec 4.
5. *Лепехова С.А.* Саногенез печеночной недостаточности под влиянием ксенотрансплантации клеток печени и селезенки (экспериментальное исследование): автореф. ... дис. д-ра биол. наук. – Иркутск, 2010. – 47 с.
Lepel'khova S. A. Sanogenez pechenochnoj nedostatochnosti pod vlijaniem ksenotransplantacii kletok pecheni i selezenki (jeksperimental'noe issledovanie). Avtoreferat Diss. dokt. biol. nauk [Sanogenesis of liver failure under the influence of xenotransplantation of liver and spleen cells (experimental study). Abstract Dr. biol. sci. diss.]. Irkutsk, 2010, 47 p.
6. *Автандилов Г.Г.* Морфометрия в патологии. – М.: Медицина, 1973. – 248 с.
Avtandilov G. G. Morfometrija v patologii. [Morphometry in pathology]. Moscow, Medicine, 1973. 248 p.
7. *Фишер А.* Физиология и экспериментальная патология печени. – Будапешт, 1961. – 230 с.
Fisher A. Fiziologija i jeksperimental'naja patologija pecheni [Physiology and experimental pathology of the liver]. Budapest, 1961. 230 p.
8. *Спрейс И.Ф., Алферова М.А., Михалевиц И.М., Рожкова Н.Ю.* Основы прикладной статистики (использование Excel и Statistica в медицинских исследованиях): учеб. пособие. – Иркутск: РИО ГИУВа, 2006. – 71 с.
Sprejs I. F., Alferova M. A., Mihalevich I. M., Rozhkova N. Ju. Osnovy prikladnoj statistiki (ispol'zovanie Excel i Statistica v medicinskih issledovanijah): uchebnoe posobie [Fundamentals of applied statistics (use of Excel and Statistica in medical research): study guide.]. Irkutsk, RIO GIUV, 2006, 71 p.

К статье

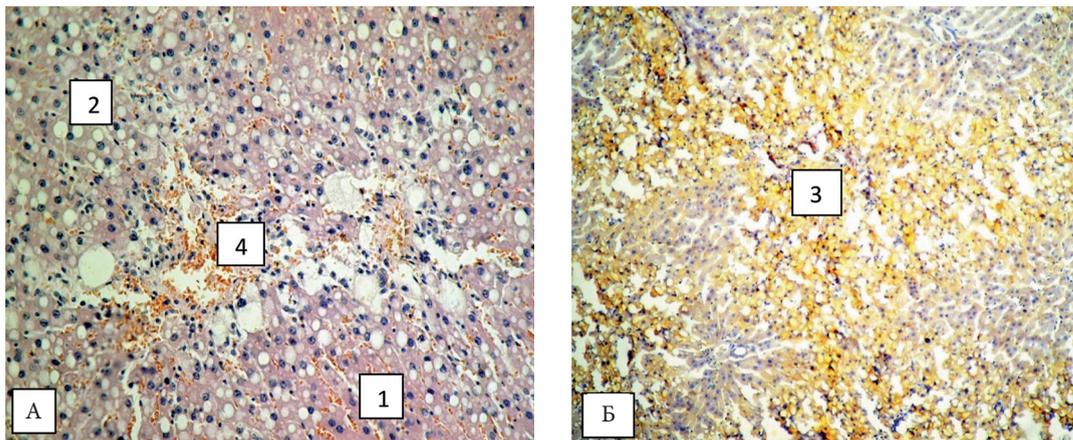
Влияние токсического повреждения печени на структурные изменения митохондрий и внутриклеточных органелл (стр. 77–80)

To article

Effect of toxic liver damage on structural changes in mitochondria and intracellular organelles (p. 77–80)

Рисунок 1.

Figure 1.



Крыса, структура печени при остром токсическом повреждении, 4-е сутки эксперимента, световая микроскопия: 1 – балки гепатоцитов; 2 – вакуолизованные гепатоциты; 3 – очаги липидов; 4 – макрофаги, лейкоциты, лимфоциты. А – окраска гематоксилином и эозином; Б – окраска суданом III. Увеличение $\times 150$.

Rat, liver structure in acute toxic damage, 4th day of the experiment, light microscopy: 1 – hepatocyte beams; 2 – vacuolation of hepatocytes; 3 – lipid foci; 4 – macrophages, leukocytes, lymphocytes. A – coloring hematoxylin and eosin; B – coloring Sudan III. Magnification $\times 150$.

Рисунок 2.

Крыса, токсическое повреждение печени на 4-е сутки исследования, участок цитоплазмы гепатоцита; 1 – вакуолизованный гранулярный эндоплазматический ретикулум лишенный рибосом; 2 – набухшие митохондрии с разрушенными кристами. Увеличение $\times 45000$.

Figure 2.

Rat, toxic liver damage on the 4th day of the study, a section of the hepatocyte cytoplasm; 1 – vacuolation granular endoplasmic reticulum devoid of ribosomes; 2 – swollen mitochondria with destroyed cristae. Magnification $\times 45,000$.

