

УДК:616-36.36.001-07:577.15

ОЦЕНКА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Ахмедов Мирхалил Джалилович

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, ассистент кафедры
Общей хирургии.*

Аскарров Тохир Аскарлович

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, доктор
мед.наук, профессор, зав.каф. Общей хирургии.*

Файзиев Ёкуб Нишанович

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, доцент кафедры
Общей хирургии.*

Ашурметов Ахмаджон Махамаджонович

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, доцент кафедры
Общей хирургии.*

Далимов Кенжабек Субутоевич

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, доцент кафедры
Общей хирургии.*

Усаров Анвар Мавлянович

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, ассистент кафедры
Общей хирургии.*

Исмаилов Фарход Миржалилович

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, ассистент кафедры
Общей хирургии.*

*Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт 100140, ул.Богшамал
223.Город Ташкент, Узбекистан.*

Оценка морфо-функционального состояния печени при токсическом гепатите.

Аннотация: в данном исследовании показана активность цитохромоксидазы при токсических поражениях паренхимы печени. Выявлено, что при повреждении печени при различных сроках токсического гепатита приводят к ингибированию цитохромоксидазы. Установлен уровень коэффициента соответствующий определённому количеству повреждённой (или сохранной) паренхимы печени.

Ключевые слова: острая печеночная недостаточность, паренхима печени, токсическое поражение, ишемия, животные, митохондрия.

Assessment of the morphological and functional state of the liver in toxic hepatitis.

*Tashkent Pediatric Medical Institute 100140, Bogishamal str., 223. Tashkent city,
Uzbekistan*

Abstract: in this study, the activity of cytochrome oxidase in toxic lesions of the liver parenchyma is shown. It was revealed that with liver damage at different periods of toxic hepatitis they lead to inhibition of cytochrome oxidase. The coefficient level corresponding to a certain amount of damaged (or intact) liver parenchyma has been established.

Key words: acute liver failure, liver parenchyma, toxic damage, ischemia, animals, mitochondria.

Актуальность темы. В настоящее время во всём мире отмечается неуклонный рост числа больных с заболеваниями печени. При этом различная печёночная патология в большинстве случаев сопровождается развитием серьёзных осложнений вплоть до появления печёночной недостаточности [1,2,3]. Несмотря на кажущуюся простоту определения ОПН, на практике диагностировать этот синдром непросто из-за зачастую сложной клинической картины, отсутствия явного отягощающего фактора, трудностей в дифференциальной диагностике с терминальной стадией болезни печени и определении необходимости и целесообразности конкретных терапевтических

вмешательств. Диагностика ОПН основывается на данных анамнеза, клинической картине, биохимических изменениях [2,4,14].

Материалы и методы.

Для создания экспериментальной модели гепатоцеллюлярной недостаточности эксперименты были проведены на 110 крысах-самцах линии Вис тар массой 180-220гр. Проведено 3 серий экспериментов:

1. Контрольная группа.
2. После затравки в дозе 150 мг/100 гр массы внутрибрюшинным введением DL-галактозамина [5,6] (исследования через 12ч.,18ч.,24ч., и 48ч.).
3. После затравки внутрибрюшинным введением 0,25 мл/100 гр массы CCL4 [6,7,8] (исследования через 12ч.,18ч.,24ч., и 48ч.).

Животных забивали декапитацией в холодной комнате. Быстро извлекали печень, промывали и готовили гомогенат в среде, состоящей из 0,25 сахарозы, 2×10^{-4} М ЭДТА (этилендиаминтетраацетат); 0,01 М трис-HCL буфера с pH 7,4 в соотношении ткани и среды 1:2. Полярографический анализ проводили со стандартным платиновым электродом Кларка закрытого типа на полярографе LP-7 [9].

В полярографическую кювету объемом 1,1 мл. поочередно вносили гомогенат из расчёта 1-2 мг. белка, аскорбат натрия в конечной концентрации 2мМ, ТМДФ- [10] (тетраметиленапарафенилендиамин)-1 мкМ и цитохром-С- [11] 1 мкМ. Скорость дыхания выражали в нмоль O₂/минут. мг. белка. Высчитывали прогностический коэффициент (ПК) по формуле: $ПК = \frac{\text{Цитохром С} - \text{Аскорбат Na}}{\text{ТМДФД} - \text{Аскорбат Na}}$

Взвесь ксеногенных гепатоцитов получали комбинированным методом Берри-Фриенд в модификации А.И. Арчакова[12]. Степень морфологической сохранности полученных гепатоцитов оценивали методом световой и фазово-контрастной микроскопии, с предварительной окраской витальным красителем

- 0,2% трипановым синим. Цифровой материал обработан методом вариационной статистики [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Через 12 часов после затравки DL-галактозамином (табл.#1),

Таблица# 1.

Скорость потребления кислорода (в нмоль O₂ мин⁻¹ мг.белка) печени экспериментальных животных в различных метаболических состояниях

Период исследования	Аскорбат зависимое потребление O ₂	ТМФД-оксидазная активность	ЦитохромС-оксидазная активность
Контрольная группа	10,50±0,15	20,00±1,50	27,90±3,00
DL-галактозамин, через (час):12	17,10±0,98*	21,90±1,10	41,80±3,50*
18	13,10±0,60*	17,00±0,60	40,01±1,16*
24	13,50±0,60*	15,90±0,60*	36,82±0,60*
48	13,00±0,40*	15,10±0,80*	39,01±4,43*
CCl ₄ , через 12 час	13,73±0,37*	21,90±0,41	73,20±3,03*
24	11,82±0,41	14,85±0,44	65,90±2,02*

Примечание :* - различия между показателями контрольной и опытной групп достоверны (P<0,05).

полярнографические исследования показали скорость аскорбат-зависимого потребления O₂ возрастала на 62,8% (P<0,05), в дальнейшем этот показатель постепенно снижается и к концу эксперимента это увеличение составляет лишь 23,8%. В отличие от неё ТМФД-оксидазная активность гомогената печени

постепенно снижается (на 24,5% через 48 часов затравки). Цитохром-С оксидазная активность повышена статистически значимо на 30-50% во все сроки исследования.

Морфологическое исследование ткани печени выявило, что уже через 12 часов после затравки DL-галактозамином (рис.#1)- балочное строение печени несколько нарушено ,контуры гепатоцитов нечёткие.



Рис.#1. Очаговая вакуолярная дистрофия гепатоцитов с перифокальной лимфолейкоцитарной инфильтрацией через 12 часов после затравки DL-галактозамином . Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200.

В паренхиматозных клетках наблюдаются обеднение ядер хроматином. Повсеместно встречаются рассеянные по паренхиме круглоклеточные инфильтраты с примесью лейкоцитов. Часто инфильтраты локализуются вблизи венозных сосудов.

С увеличением продолжительности времени от начала затравки (18 и 24 часа) эти изменения усугубляются, и к 48 часам (рис.#2) отражают наиболее тяжёлые повреждения: тотальные некробиотические изменения гепатоцитов.



Рис.# 2. Тотальные некробиотические изменения гепатоцитов через 48 часов после затравки DL-галактозамином. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200.

Подсчёт количества жизнеспособных клеток печени показывает, что их количество с увеличением времени от начала затравки уменьшается. Так, через 12 часов количество жизнеспособных клеток составляет 50% а коэффициент 5,05, в то время как через 48 часов составляет 10-12% а коэффициент 13,2 (рис.#3).

Подсчёт количества жизнеспособных клеток печени показывает, что их количество с увеличением времени от начала затравки уменьшается. Так, через 12 часов количество жизнеспособных клеток составляет 50% а коэффициент 5,05, в то время как через 48 часов составляет 10-12% а коэффициент 13,2 (рис.#3).

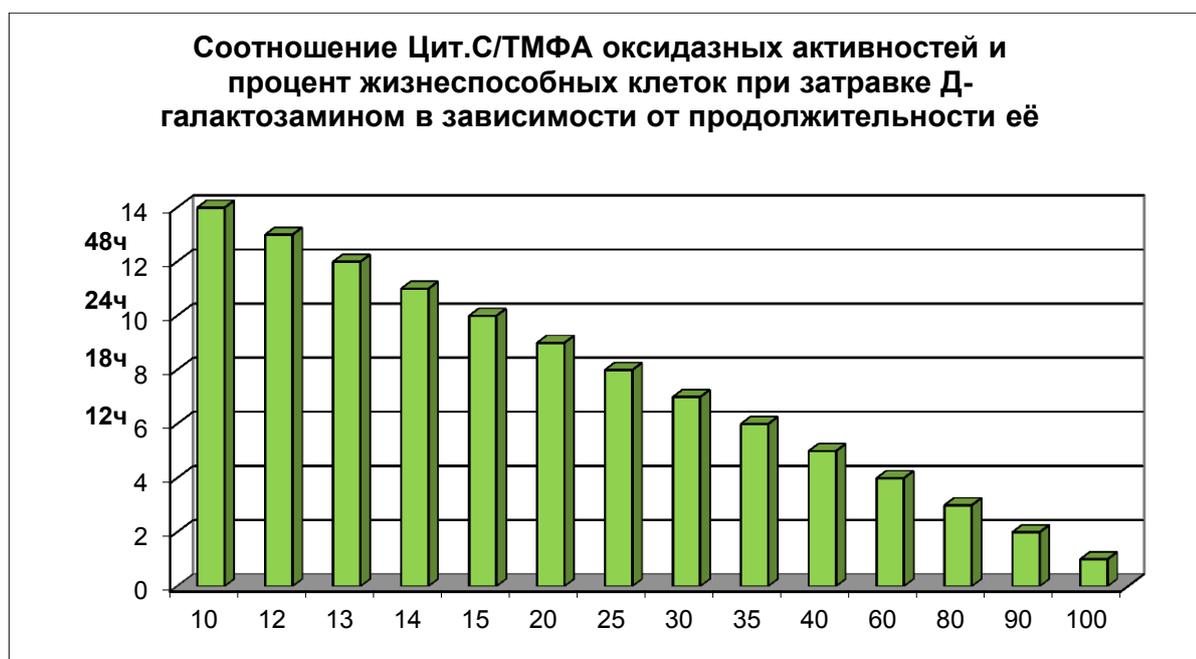


Рис.#3. Подсчёт количества жизнеспособных клеток печени после затравки DL-галактозамином (через 12,18,24 и 48 часов) и их соотношение с коэффициентом.

Наблюдения за этими животными показали, что тяжесть их клинического состояния увеличивается в зависимости от продолжительности времени после затравки. К 48 часам у животных отмечалась выраженная гиподинамия, кровоточивость, снижение болевой чувствительности с последующим наступлением гибели 100% животных.

У крыс, получавших CCL4, нами выявлена такая же динамика изменений скорости потребления O₂ в различных метаболических состояниях. Отличительной особенностью данной модели от галактозаминового, была резкая активация цитохром С-оксидазы (табл.1) (превышение на 162,4 и 136,2 % значений интактных крыс через 12 и 24 часа от затравки). В группе с отравлением CCL4 было определено (рис.#4), что через

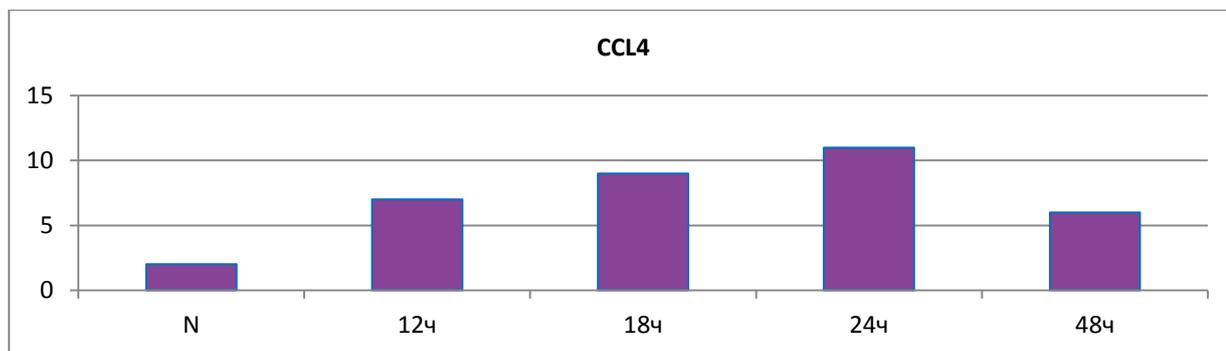


Рис.#4. Величина коэффициента после затравки CCL4 (через 12,18,24 и 48 часов).

12 часов после затравки величина коэффициента возрастает до 7,2 , а через 24 часа, когда наблюдалась гибель 50% животных – до 10,9. У выживших крыс в последующем через 36 и 48 часов величина коэффициента снижалась соответственно до 7,0 и 6,0.

Морфологические исследования ткани печени показали, что через 12 часов после затравки CCL4 (рис.#5) встречаются участки некрозов, мелкокапельная вакуолизация гепатоцитов, ожирение клеток по периферии долек.

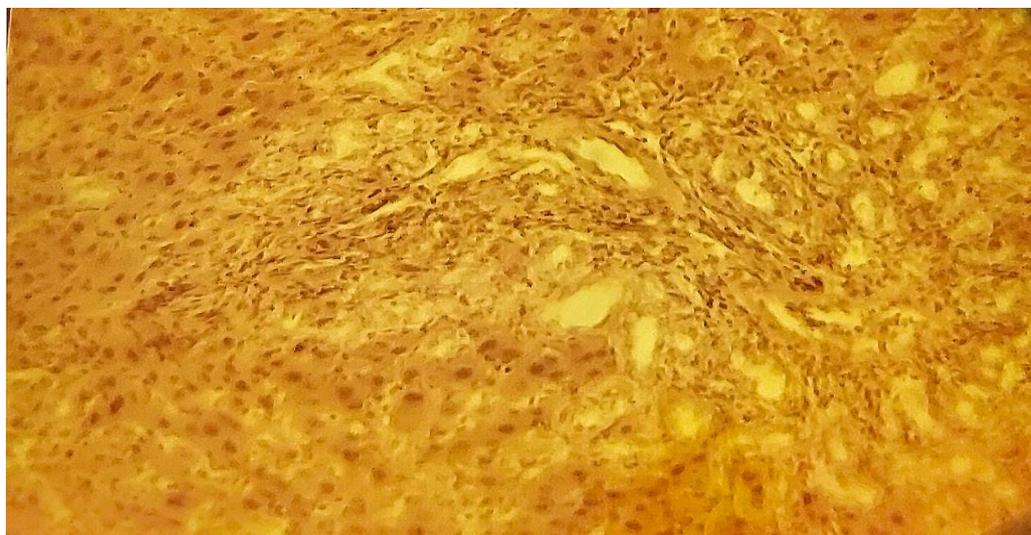


Рис.#5. Встречаются участки некрозов, мелкокапельная вакуолизация гепатоцитов, ожирение клеток по периферии долек через 12 часов после затравки CCL4 . Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200.

К 24 часам (рис.#6) эти изменения усугубляются и отражают наиболее тяжёлые повреждения: тотальные некробиотические изменения гепатоцитов.

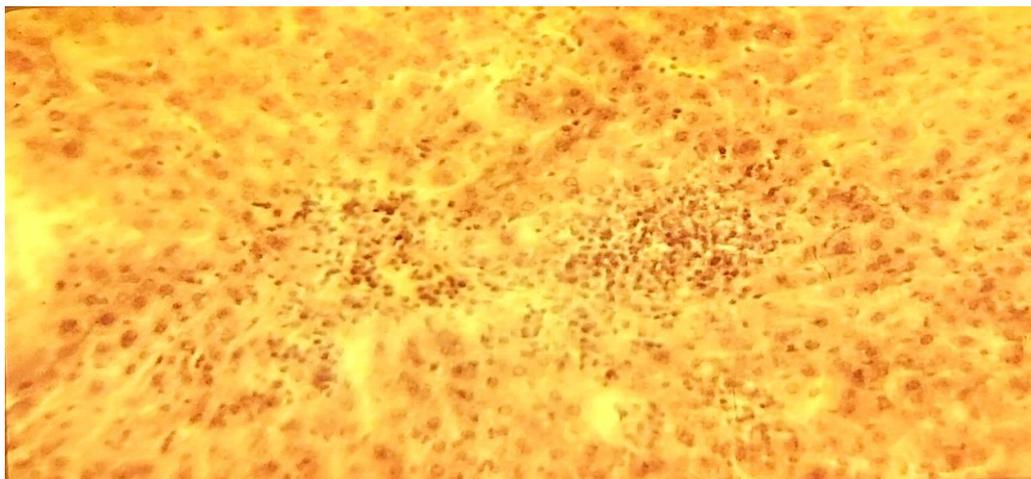


Рис.#6. тотальные некробиотические изменения гепатоцитов через 24 часов после затравки CCL4 . Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200.

А на 36 и 48 часу, в сохранившихся участках паренхимы некробиотические изменения гепатоцитов несколько уменьшаются, что соответствует уменьшению коэффициента и наблюдается некоторое улучшение состояния животных (активность, аппетит, опрятность..)

Подсчёт количества жизнеспособных клеток показал (рис.#7) , что через 12 часов после затравки сохраняется 30% интактных клеток, /коэффициент 7,2/ ,а через 24 часа---15% / коэф.-10,9/.



Рис.#7. Подсчёт количества жизнеспособных клеток печени после затравки CCL4 (через 12 и 24 часа) и их соотношение с коэффициентом.

Клиническое состояние крыс постепенно ухудшается и к 24 часу достигает своего пика, когда отмечается гибель 50% животных. У выживших к 48 часу частично восстанавливается подвижность, активизируются рефлексy, появляется аппетит, уменьшается кровоточивость, а также несколько увеличивается количество жизнеспособных клеток.

Таким образом, результаты данной серии опытов показали, что используемый нами метод позволяет количественно оценить степень повреждения печёночной паренхимы при отравлении DL-галактозамином, и CCL4. Причём, наибольшая величина коэффициента соответствует наиболее выраженным морфологическим изменениям, количеству жизнеспособных клеток и тяжёлому клиническому состоянию животных.

ВЫВОДЫ:

1.Использование данного теста может служить методом диагностики повреждения печени.

2. Позволит количественно оценить сохранность паренхимы.
3. Создает предпосылки для выбора диагностической, лечебной тактики в плане характера и обширности оперативного вмешательства и терапевтических методов коррекции.
4. Определить дальнейшее течение и прогноз данного заболевания у больных.

Литература.

- [1]. Плеханов А.Н., Товаршинов А.И. Современные подходы к диагностике и лечению печёночной недостаточности (Обзор литературы). Бюллетень ВСНЦСО РАМН, 2016, Том 1, №4(110), с.151-161.
- [2]. Черний В.И., Тюменцева С.Г., Шраменко Е.К. Фульминантная печёночная недостаточность. - Донецк, 2010. - 197 с.
- [3]. Kumarasena RS, Niriella MA, Ranawaka CK (2016). Predicting acute liver failure in denque infection. Ceylon. Med. J., 61 (1), 35-36.
- [4]. Mochida S, Takikawa Y, Nakayama N (2011). Diagnostic criteria of acute liver failure. Hepatol. Res., 41 (9), 805-812.
- [5]. Isolation of a Bone Marrow-Derived Stem Cell Line with High Proliferation Potential and Its Application for Preventing Acute Fatal Liver Failure / M. Masa-hiro [et al.] // STEM. CELLS. - 2007. - Vol. 25. - P. 2855-2863.
- [6]. Уразметова М. Д., Хаджибаев Ф. А., Мирзакулов А. Г., Б.Б.Акилов. Методы формирования острой печеночной недостаточности в эксперименте (обзор литературы и собственные исследования) ЖУРНАЛ Вестник экстренной медицины. 2018, Т.11, №4, с.66-71.
- [7]. Weber L.W. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model / L.W. Weber, M. Boll, A. Stampfl // Grit. Rev. Toxicol. - 2003. - Vol. 33. - P. 5-36.

[8]. Медведева С.Ю., Сенцов В.Г., Гетте И.Ф., Данилова И.Г. Особенности регуляторных механизмов компенсации диффузного поражения печени при токсическом воздействии четырёххлористого углерода и полигексаметиленгуанидингидрохлорида . Том 15, Клиническая токсикология , 3 мая 2014

[9]. Трушанов А.А. Изготовление в лабораторных условиях закрытого полярографического электрода Кларка. //В кн. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., Наука, 1973.- С.78-79.

[10]. Earl.E.Jacobs.- Phosphorylation coupled to electron transport initiated by substituted phenylenediamines. Biochem. Biophys. Res.Commun.3, №5,536-539,1960.

[11]. Ozawa Kazue/ Adaptive response of the liver mitochondrial and its relation to hepatic functional reserve. Evaluation by cytochrome a (+ a 3) assay and glucosae intolerance "Asian Med J", 1980,23 №7, P.499-528.

[12]. Berry M., Friend D. High-yield preparation of isolated parenchimal cells from rat liver // J. Cell. Biol.- 1969.- V. 43,- P. 506- 520.

[13]. Монцевичюте-Эрингене Е.В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1964. — № 4. — С. 71-78.

[[14] Zaccherini G., Weiss E., Moreau R. Acute-on-chronic liver failure: Definitions, pathophysiology and principles of treatment. JHEP Rep. 2020 Sep 2;3(1):100176.