УДК [611.36+616.36]:572.785:613.81

Е. И. ЛЕБЕДЕВА, О. Д. МЯДЕЛЕЦ

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ В НОРМЕ И ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь,
e-mail: Lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Проведено морфофункциональное исследование печени пациентов на различных стадиях ее алкогольного поражения. Установлено снижение средней площади гепатоцитов и их ядер на стадии гепатита и увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения у пациентов с циррозом. Токсическое поражение печени пациентов приводит к накоплению в данном органе пигмента липофусцина и к снижению активности ферментов сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Биохимическое исследование сыворотки крови пациентов выявило увеличение активности аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы, общего билирубина и снижение уровня общего холестерола.

Ключевые слова: печень, алкоголь, морфология, биохимия.

E. I. LEBEDEVA, O. D. MYADELETS

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF THE LIVER OF PATIENTS IN NORMAL AND AT DIFFERENT STAGES OF ALCOHOL LESION

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus,
e-mail: Lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

A morphology and function examination of the liver of patients at different stages of alcoholic lesions was carried out. A reduction in the average area of hepatocytes and their nuclei at the stage of hepatitis and an increased nuclear-cytoplasmic ratio in patients with cirrhosis were established. A toxic liver disease leads to the accumulation in this organ of pigment lipofuscin and the reduction of the enzyme activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase. The biochemical study of blood serum of patients showed an increase in the activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamyl transpeptidase, total bilirubin and a decrease in the level of total cholesterol.

Keywords: liver, alcohol, morphology, biochemistry.

Введение. В последние годы все более прочное место в структуре смертности занимают заболевания печени у лиц наиболее активного возраста. Алкогольная болезнь не имеет географических границ. Во всем мире люди продолжают употреблять алкоголь, нанося непоправимый вред своему здоровью [1–5]. Помимо высокой заболеваемости и смертности, хронические заболевания печени приводят к существенным экономическим потерям, связанным с лечением, реабилитацией и поддерживающей терапией данной категории пациентов [6].

Анализ литературных источников свидетельствует о том, что данные о нарушениях энергетического обмена при алкогольном поражении печени изучены недостаточно, а порой носят противоречивый характер. Мало сведений и о динамике цитоморфометрических показателей гепатоцитов при данной патологии. Остаются нерешенными вопросы о прогрессировании фиброза как прогностического маркера фатальных осложнений и о методах коррекции подобных нарушений [7]. Нет единого мнения о том, какой метод следует использовать при оценке динамики развития фиброза на фоне хронических заболеваний печени [8]. Многие исследователи, изучавшие течение фиброза печени на фоне различных схем лечения, считают, что система Knodell в качестве теста, позволяющего оценить развитие процесса в динамике, малоинформативна [9, 10].

© Лебедева Е. И., Мяделец О. Д., 2015

В то же время количественная морфометрия с применением специфических методов окраски препаратов ткани печени на волокна, входящие в состав фиброзной ткани, имеет более высокую чувствительность и лучше отражает происходящие изменения до и после лечения [8].

Цель настоящего исследования – изучение морфофункциональной характеристики печени пациентов в норме и при различных стадиях алкогольного поражения.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на материале прижизненных пункционных биопсий печени пациентов с клинико-лабораторными и морфологическими признаками хронической гепатопатии, находившихся в УЗ «Витебская областная клиническая больница». Всем пациентам проводили чрескожные трепанобиопсии печени натощак (всегда в одно и то же время суток – с 10^{00} до 11^{00}), под УЗ-контролем с помощью аппаратов SDU-500A фирмы Shimadzu, оснащенных линейными и конвексными датчиками с частотой 3,5–5,0 Мгц. Для получения «столбиков» печени длиной до 21 мм использовали иглы Quick-Cut 14-16G и автоматическое устройство Bard 14G. Кроме того, был изучен секционный материал от пациентов с хронической алкогольной интоксикацией. Размер и фиксацию изъятых фрагментов печени определяли в соответствии с Правилами УЗ «Витебского областного клинического патологоанатомического бюро» (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 111 от 17.06.1993 г.). Критериями отбора пациентов в группу злоупотребляющих алкоголем являлись указание в анамнезе на регулярное употребление ими спиртных напитков и данные клинических и биохимических исследований. В стационаре больницы у пациентов был проведен биохимический анализ крови, включающий определение аланинаминотрансферазы (АЛТ, Е/л), аспартатаминотрансферазы (АСТ, Е/л), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП, Е/л), общего холестерола (ммоль/л) и общего билирубина (мкмоль/л). В качестве контроля использовали материал печени относительно здоровых людей (биоптаты печени лиц, направленных военкоматами для исключения патологии, и лиц, умерших от причин, непосредственно не связанных с патологией печени), в котором отсутствовали морфологические, клинические и биохимические признаки поражения печени.

Пациенты были разделены на 4 группы: 1-я – лица с относительно нормальными показателями (n = 11, 6 мужчин и 5 женщин); 2-я – пациенты с алкогольным стеатозом (n = 12, 7 мужчин и 5 женщин); 3-я – лица с алкогольным гепатитом (n = 12, 6 мужчин и 6 женщин); 4-я – пациенты с алкогольным циррозом (n = 15, 5 мужчин и 10 женщин). Всего исследован материал от 24 мужчин и 26 женщин в возрасте от 22 до 65 лет. На выполнение данных исследований получено разрешение комитета по этике клинических испытаний Витебского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 09.01.2013 г.).

Для морфологических исследований использовали следующие методы:

1. Общегистологические: окраска гематоксилином и эозином [11].

2. Гистохимические методы. В нефиксированных срезах печени толщиной около 10 мкм, приготовленных на микротоме-криостате HM525 (Германия) из замороженного в жидком азоте материала, изучали активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ; КФ 1.3.99.1) по методу Нахласа с нитро-СТ и цитохромоксидазы (ЦХО; КФ 1.9.3.1) по методу Берстона. Приготовление красителей, буферных растворов и окраску препаратов осуществляли в соответствии с прописями, приведенными в руководстве [12]. Проведение гистоэнзимологических реакций для контроля специфичности гистохимического обнаружения ферментов осуществляли с помощью контролей, включавших инактивацию ферментов высокой температурой (+80 ºС) и проведение реакций без субстратов. В обоих контролях в клетках, обладающих соответствующей ферментативной активностью, наблюдалась отрицательная реакция. Липофусцин выявляли в залитых в парафин образцах печени [13].

3. Специальный метод выявления соединительной ткани по Маллори в собственной модификации [14].

Для морфометрической оценки содержания СДГ, ЦХО, липофусцина и соединительной ткани использовали метод полуколичественного компьютерного анализа результатов. С помощью программного обеспечения анализа изображений Image Scope Color высчитывали процент площади от общей площади среза, занимаемой соответственно СДГ, ЦХО, липофусцином и соединительной тканью. С этой целью производили микрофотосъемку случайных полей зрения

гистологических препаратов цифровой камерой OLYMPUS XC 30 на базе микроскопа OLYMPUS BX 51 (Япония) при 200-кратном увеличении не менее чем в 10 полях зрения в каждом гистологическом срезе. Определяли среднюю площадь гепатоцитов ($S_г$, мкм^2) и их ядер ($S_я$, мкм^2). Путем определения разности между $S_г$ и $S_я$ получали площадь цитоплазмы клеток, после чего вычисляли ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦО). Цитоморфометрию проводили при 600-кратном увеличении.

Статистическую обработку данных и построение диаграмм проводили с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 Advanced (русская версия). Так как количество пациентов в группах не превышало 50, для выявления нормальности частотного распределения использовали критерий Шапиро–Уилка [15], данные которого соответствовали результатам критерия Лиллиефорса. Изучение влияния стадии алкогольного поражения печени и пола пациентов на рассматриваемый признак проводили с помощью параметрического двухфакторного дисперсионного анализа [16]. При обработке данных с помощью параметрической статистики о достоверности различий судили по *t*-критерию Стьюдента, а статистические данные представлены в виде средних и соответствующих им доверительных интервалов (M (95 % ДИ: j–q)). При обработке данных с помощью непараметрической статистики использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы и значения 15–85-го процентиля (Me (15 %; 85 %)). Различия считали статистически достоверными при $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. *Морфологические и биохимические особенности печени пациентов в норме.* Печень – паренхиматозный дольчатый орган. Ее строма представлена капсулой Глиссона и прослойками рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани (РВНСТ), которые делят орган на дольки. В норме у человека междольковая РВНСТ выражена слабо, в результате чего дольки определяются неотчетливо. Непосредственно под капсулой располагается слой гепатоцитов, образующих наружную пограничную пластинку. От ворот печени этот слой гепатоцитов, погружаясь в глубь ее, сопровождает ветвящиеся воротную вену и печеночную артерию и располагается между соединительной тканью портальных трактов и паренхимой, образуя внутреннюю пограничную пластинку из одного ряда гепатоцитов. Структурной единицей печени является долька.

В настоящее время рассматриваются три модели структурных единиц печени: классическая, портальная дольки и ацинус. Эти модели не исключают одна другую, а отражают лишь различные стороны строения и функции печени. Классическая долька на гистологических препаратах имеет вид шестиугольника (гексогональная долька), в центре которого расположена центральная вена, а по углам – портальные тракты, которые содержат ветви воротной вены, печеночной артерии и желчный проток, а также нервы и лимфатические сосуды. Гепатоциты – основной вид клеток печени, выполняющий ее основные функции. Они организованы в печеночные балки, исходящие радиально от центральной вены. Гепатоцит содержит множество органелл: гранулярную и агранулярную эндоплазматические сети, митохондрии, комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы и центриоли. В печеночной клетке в зависимости от суточного ритма, функционального состояния и характера питания обнаруживаются включения гликогена и липидов. Кроме гепатоцитов в печени есть другие клетки: эндотелиоциты, печеночные макрофаги, липоциты (клетки Ито), Pit-клетки [17, 18].

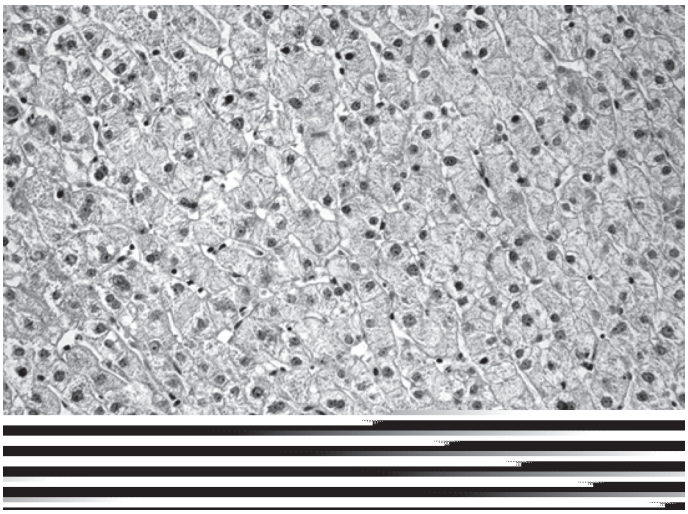

Рис. 1. Срез печени пациентов контрольной группы (биопсийный материал). Окраска гематоксилином и эозином. ×400

Результаты данного исследования показали, что гистологическая картина печени пациентов 1-й группы в целом соответствует критериям нормы (рис. 1).

Следует отметить, что у пациентов 4-й группы этот показатель был резко и достоверно увеличен по сравнению с таковым в 3-й группе (p = 0,000). На гистологических препаратах, полученных из секционного материала, встречались широкие поля соединительной ткани, занимающие до 50 % от общей площади среза (рис. 6).

Согласно литературным данным, период трансформации хронического гепатита в цирроз – процесс, растянутый во времени [20]. Патогенез фиброза печени рассматривается как эволюционный процесс, который включает взаимодействие клеток портального континуума и представляет собой последовательную цепь событий: повреждение, активацию продуцирующих коллагеновые волокна клеток, эндотелиальную дисфункцию, развитие внутрипеченочной (синусоидальной) портальной гипертензии, стимуляцию ангиогенеза и последующее накопление соединительной ткани в органе. В соответствии с этим предикторами активного фиброгенеза будут являться не только факторы, стимулирующие рост соединительной ткани, но и причины, усугубляющие вышеописанные факторы этого многоуровневого процесса. Комплексная терапия фиброза и снижение темпов его прогрессирования при хронических заболеваниях печени

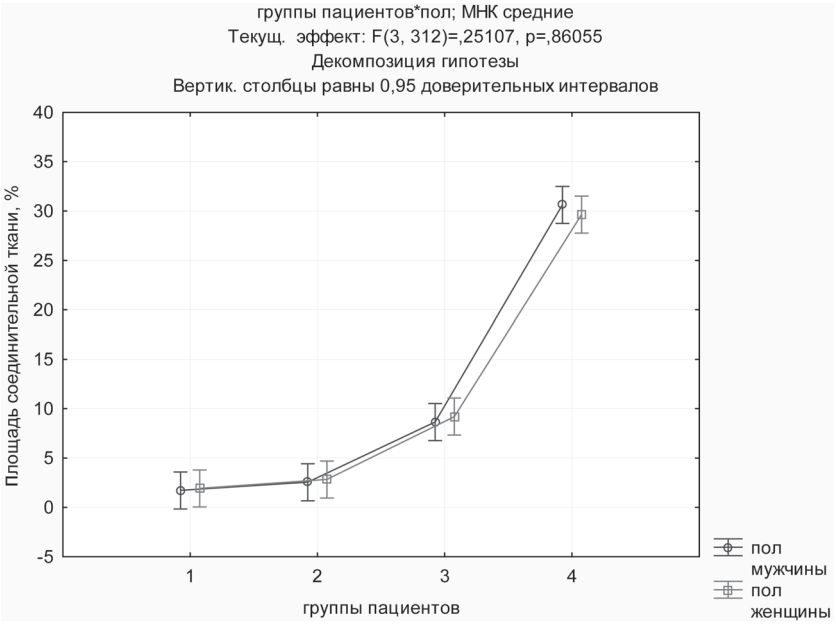

Рис. 5. Площадь соединительной ткани (в % к общей площади среза) при различных стадиях алкогольного поражения печени

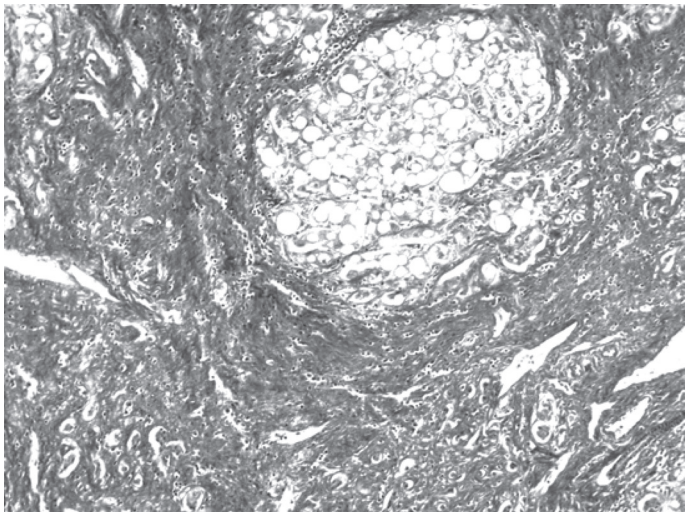

Рис. 6. Соединительная ткань печени пациентов при алкогольном циррозе (секционный материал). Окраска по Маллори в собственной модификации. ×200

остается сложной, но жизненно необходимой задачей с целью предотвращения фатальных полиорганных нарушений [7, 21, 22].

В ходе исследования выявлено, что токсическое поражение печени пациентов приводит к накоплению в данном органе липофусцина (рис. 7). Его содержание у пациентов 4-й группы было выше по сравнению с таковым во 2-й ($p = 0{,}000$) и 3-й ($p = 0{,}000$) группах, но достоверных отличий между 2-й и 3-й группами не выявлено ($p = 0{,}329$). Пигмент определялся в клетках в виде зерен сине-зеленого, зелено-желтого, темно-синего цвета. Согласно литературным данным, различная окраска пигмента связана с тем, что гранулы находятся на разных стадиях формирования [23]. При поражениях печени с преобладанием тотальной крупнокапельной жировой дистрофии пигмент чаще локализовался вокруг крупных капель жира в виде гранул (рис. 8).

Необходимо отметить, что если цирроз печени у людей сопровождался выраженным разрастанием соединительной ткани, то зерна и гранулы липофусцина формировали неправильной формы конгломераты с четкими контурами. На гистологических препаратах пациентов 1-й группы пигмент не выявлялся.

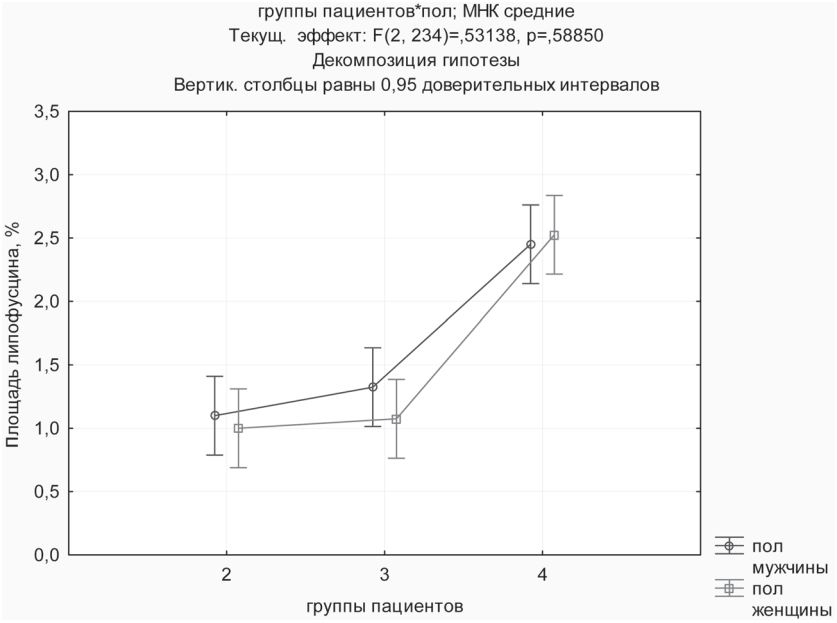

Рис. 7. Площадь липофусцина (в % к общей площади среза) при различных стадиях алкогольного поражения печени

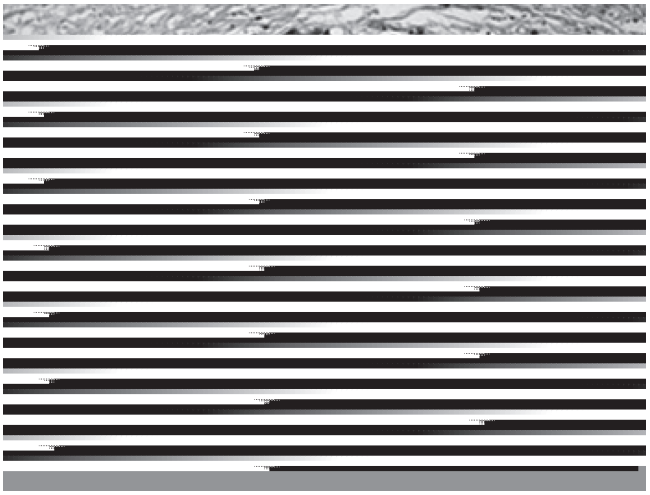

Рис. 8. Резко выраженная тотальная жировая дистрофия печени пациентов при алкогольном циррозе (секционный материал): *а* – отложения липофусцина в виде зерен; *б* – скопление конгломератов пигмента вокруг жировых кист. Окраска на липофусцин. ×400

На гистохимических препаратах отчетливо выделялись три группы клеток: с высокой, средней и низкой активностью. Снижение активности СДГ можно рассматривать как стадию истощения адаптивной реакции системы энергопродукции.

Важное место в энергетическом обеспечении клетки принадлежит цитохромоксидазе – конечному ферменту дыхательной цепи, который обеспечивает перенос электронов от цитохрома на кислород [26]. Проведенное исследование по изучению активности ЦХО указало на снижение активности фермента у пациентов 4-й группы по сравнении со 2-й (p = 0,000) и 3-й (p = 0,000) группами (рис. 11, 12). Между 2-й и 3-й группами достоверных отличий не выявлено (p = 0,206).

Снижение уровня гистохимической реакции ферментов свидетельствует о нарушении процессов энергообеспечения гепатоцитов при развитии цирротического процесса.

Изменение биохимических показателей сыворотки крови пациентов при различных стадиях алкогольного поражения печени. К непрямым маркерам фиброза относят показатели АЛТ и АСТ. Это традиционные сывороточные маркеры, т. е. молекулы, высвобождаемые в кровь

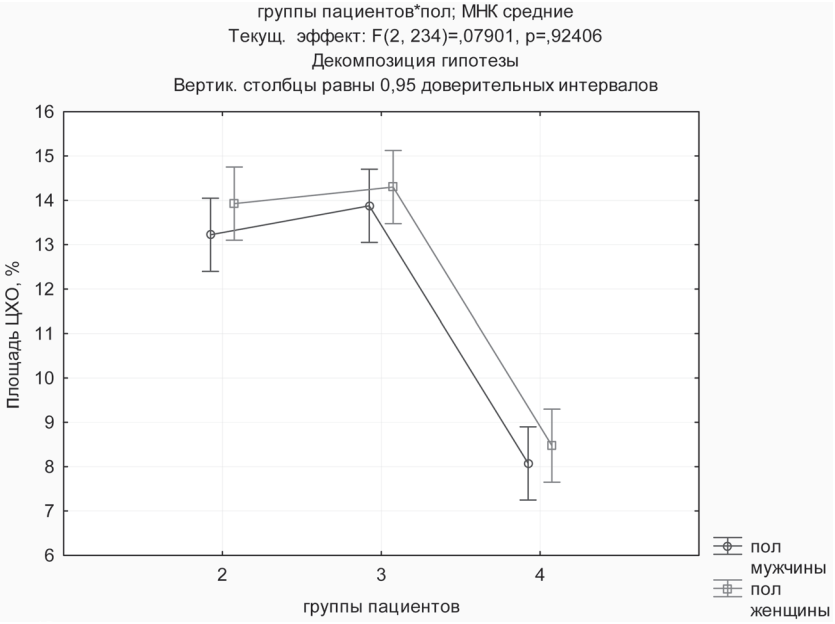

Рис. 11. Площадь цитохромоксидазы (в % к общей площади среза) при различных стадиях алкогольного поражения печени

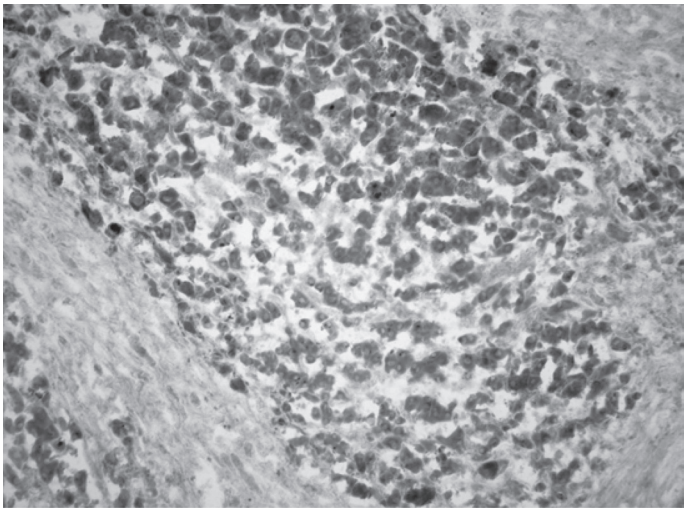

Рис. 12. Активность ЦХО в печени пациентов при алкогольном циррозе (секционный материал). Окраска по Берстону. ×200

из-за воспалительного процесса, осуществляющегося в печени. АЛТ – наиболее чувствительный и специфичный индикатор гепатоцеллюлярного повреждения [3]. Предположение о том, что АСТ служит в основном показателем некроза сердечной мышцы («сердечная трансаминаза»), а АЛТ – показателем цитолиза гепатоцитов («печеночная трансаминаза»), находит все меньше сторонников [27]. При анализе активности трансаминаз в сыворотке крови пациентов с патологией печени было установлено их увеличение (по сравнению с группой контроля) на стадиях гепатита (p = 0,000) и цирроза (p = 0,000) (рис. 13, 14). Это свидетельствует о нарушении целостности плазмолеммы гепатоцитов и является патофизиологической основой синдрома цитолиза. У пациентов 4-й группы наблюдалось преимущественное повышение АСТ. Ситуация, когда АСТ преобладает над АЛТ, является грозным сигналом осложнения хронического поражения печени [28].

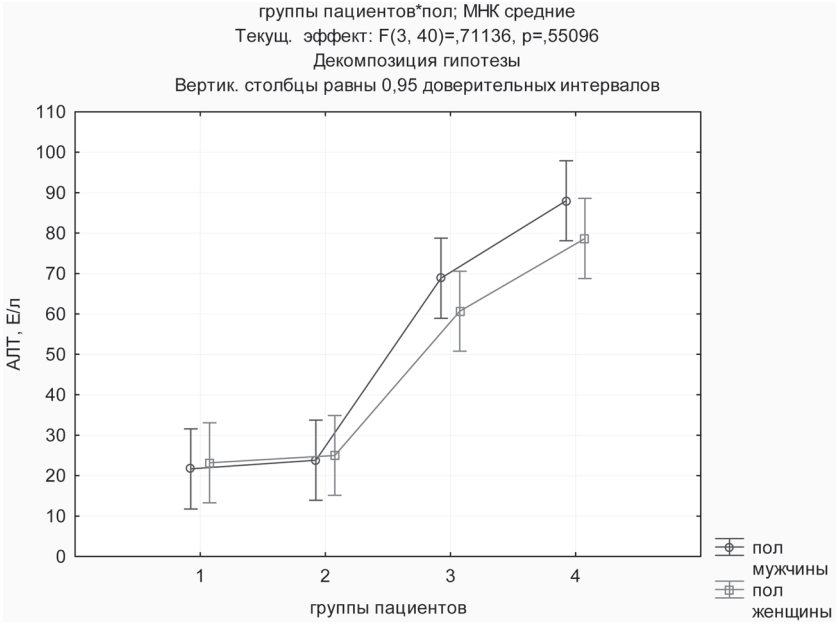

Рис. 13. Изменение показателя активности аланинаминотрансферазы при различных стадиях алкогольного поражения печени

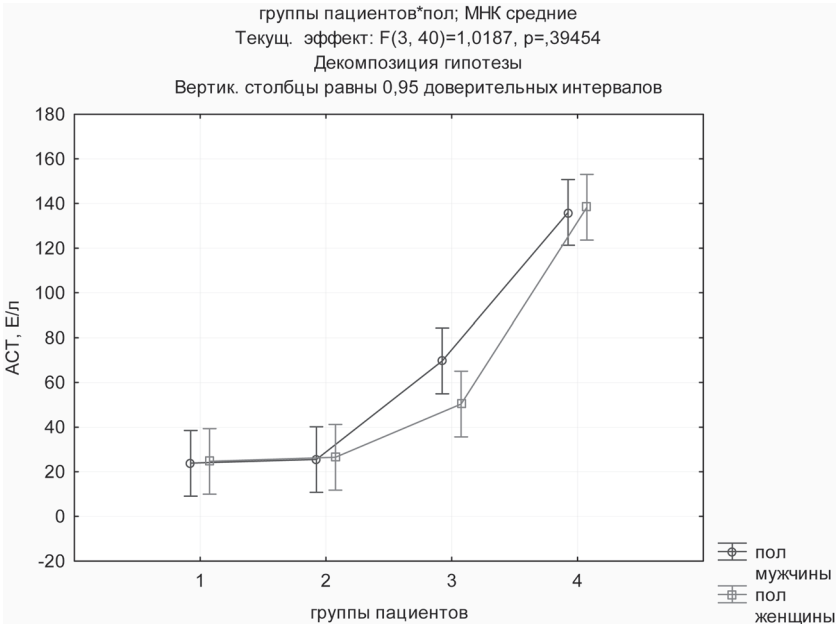

Рис. 14. Изменение показателя активности аспартатаминотрансферазы при различных стадиях алкогольного поражения печени

По сравнению с контрольной группой активность ГГТП была увеличена у всех пациентов с патологией печени (p = 0,000) (рис. 15).

Повышение уровня ГГТП указывает на стимуляцию активности микросомальных ферментов. ГГТП многозначна в диагностическом отношении. Известно 5 патологических процессов, способствующих повышению ее активности: цитолиз, холестаз, интоксикация алкоголем, опухолевый рост в печени, воздействие гепатотоксичных препаратов (лекарственный гепатит) [7].

Для диагностики нарушения пигментного обмена печени в сыворотке крови пациентов определяли уровень общего билирубина. Известно, что при острых заболеваниях печени содержание в сыворотке общего билирубина может превышать норму в 20 раз и более, а при хронических – в 2–10 раз [28]. У пациентов 3-й (p = 0,000) и 4-й (p = 0,000) групп содержание этого показателя было выше по сравнению с таковым в 1-й группе (рис. 16). По-видимому, нарушению обмена

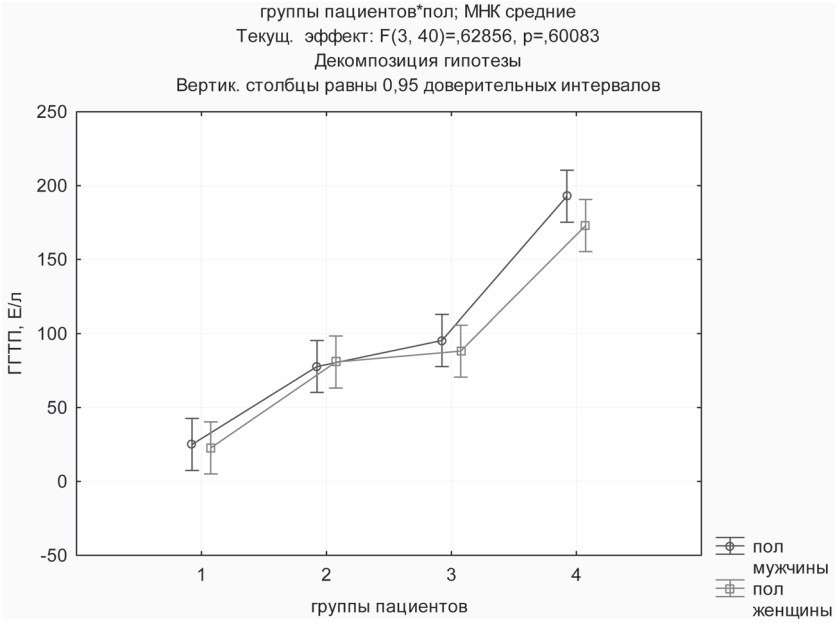

Рис. 15. Изменение показателя гамма-глутамилтранспептидазы при различных стадиях алкогольного поражения печени

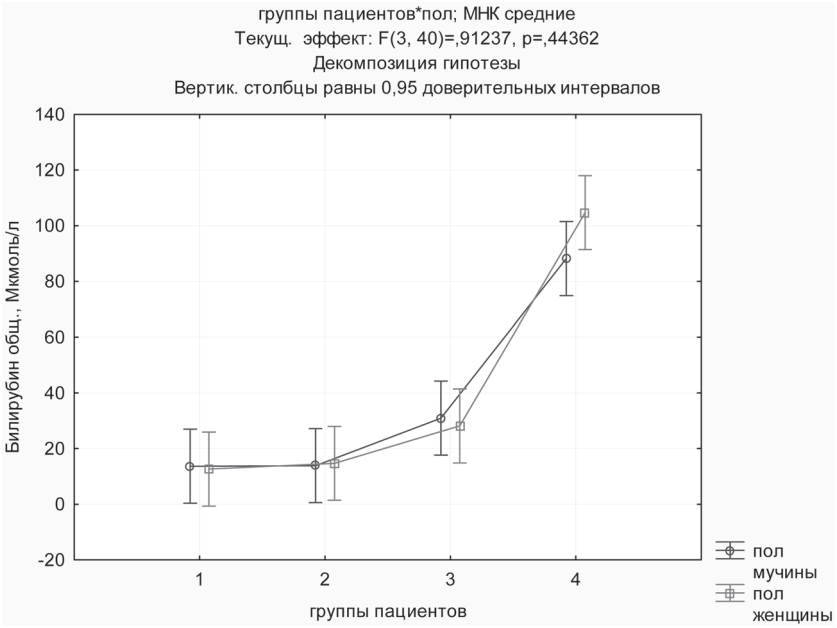

Рис. 16. Изменение показателя общего билирубина при различных стадиях алкогольного поражения печени

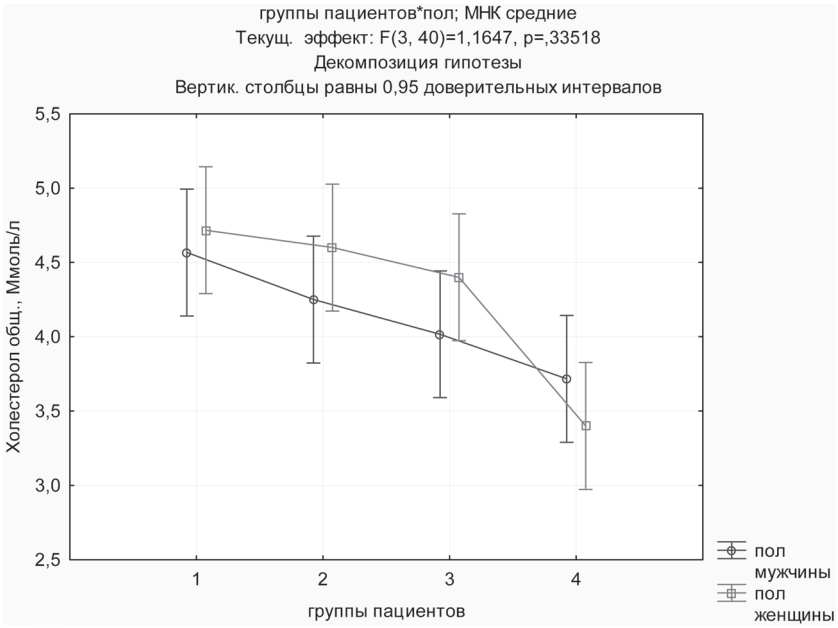

Рис. 17. Изменение показателя общего холестерола при различных стадиях алкогольного поражения печени

этого вещества способствует резкое ослабление метаболических процессов в пораженных гепатоцитах, которые теряют способность нормально выполнять различные биохимические и физиологические процессы.

Печень является основным органом, осуществляющим метаболизм липидов в организме, следовательно, любой патологический процесс, ведущий к нарушению ее функции, сказывается на обмене липидов. В работе показано, что уровень холестерола у пациентов 3-й (p = 0,003) и 4-й (p = 0,000) групп был снижен по сравнению с таковым в 1-й группе (рис. 17). Полученные результаты подтверждают нарушение обмена липидов при токсическом циррозе.

Заключение. Полученные данные о характере патологических изменений при развитии токсического цирроза печени у пациентов при различных стадиях алкогольного поражения могут быть использованы при поиске путей их коррекции.

Автор выражает благодарность заведующему отделением ультразвуковой диагностики УЗ «Витебская областная клиническая больница» канд. мед. наук А. В. Шиленку и заведующему отделением общей патологии УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро» П. П. Лакисову за предоставление материала для гистологического исследования.

Список использованной литературы

1. Pharmacotherapy of acute alcoholic hepatitis in clinical practice / L. Abenavoli [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, N 9. – P. 2159–2167.

2. Перспективы противофиброзной терапии хронических заболеваний печени / В. Буко [и др.] // Наука и инновации. – 2013. – Т. 12, № 6. – С. 56–60.

3. Морфофункциональные изменения внутренних органов и некоторых биохимических показателей в динамике острой алкогольной интоксикации / Ф. В. Алябьев [и др.] // Сибир. мед. журн. – 2012. – Т. 27, № 3. – С. 127–130.

4. Hepatic steatosis, fibrosis, and cancer in elderiy cadafers / K. M. Mak [et al.] // Anat. Rec (Hoboken). – 2012. – Vol. 295, N 1. – P. 40–50.

5. *Абдурахманов,* Д. Т. Алкогольный гепатит / Д. Т. Абдурахманов // Клин. фармакология и терапия. – 2009. – Т. 18, № 1. – С. 12–16.

6. *Разводовский, Ю. Е.* Экономическая доступность алкоголя и связанная с алкоголем смертность в Беларуси / Ю. Е. Разводовский // Вопр. организации и информатизации здравоохранения. – 2013. – № 1. – С. 48–52.

7. Современные представления о фиброзе печени и методах его коррекции / С. Н. Мехтиев [и др.] // Фарматека. – 2014. – № 6. – С. 80–87.

8. Возможности обратимости цирроза печени / Ч. С. Павлов [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол, колопроктол. – 2006. – № 1. – С. 20–29.

9. Evaluation of liver morphology in management and etiology in chronic hepatitis / S. Maeyama [et al.] // Minorphager Med. Rev. – 1998. – Vol. 43. – P. 27–35.

10. *Chrostek, L.* Liver fibrosis markers in alcoholic liver disease / L. Chrostek, A. Panasiuk // World J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, N 25. – P. 8018–8023.

11. *Роскин, Г. И.* Микроскопическая техника / Г. И. Роскин. – М. : Совет. наука, 1951. – 447 с.

12. *Лилли, Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. М. Лилли. – М. : Мир, 1969. – 645 с.

13. *Вайль, С. С.* Руководство по патолого-гистологической технике / С. С. Вайль. – Л.: Медгиз, 1947. – 263 с.

14. *Лебедева, Е. И.* Модификация метода окрашивания соединительной ткани в печени при ее фиброзах // Инновации в медицине и фармации – 2014: материалы дистанцион. науч.-практ. конф. / Е. И. Лебедева ; Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. В. Сикорский [и др.]. – Минск, 2014. – С. 389–394.

15. *Океанов, А. Е.* Применение статистических методов в биомедицинских исследованиях / А. Е. Океанов, И. В. Дардынская. – М. : Междунар. экол. ун-т, 2011. – 82 с.

16. *Реброва, О. Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.

17. *Серов, В. В.* Морфологическая диагностика заболеваний печени / В. В. Серов, К. Лапиш. – М. : Медицина, 1989. – 336 с.

18. *Логинов, А. С.* Клиническая морфология печени / А. С. Логинов, Л. И. Аруин. – М. : Медицина, 1985. – 240 с.

19. *Захараш, А. Д.* Компьютерная морфометрия в диагностике хронического гепатита / А. Д. Захараш // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол, колопроктол. – 2005. – Т. XV, № 1. – С. 65.

20. Predicting cirrhosis risk based on the lever of circulating hepatitis B viral load / U. Iloeje [et al.] // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 130. – P. 678–686.

21. *Gao, B.* Innate immunity and alcoholic liver fibrosis / B. Gao // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2008. – Vol. 23. – P. 112–118.

22. From fatty liver to fibrosis : a tale of “second hit” / M. Basaranoglu [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2013. – Vol. 19, N 8. – P. 1158–1165.

23. Накопление липофусциновых гранул в зоне экспериментального инфаркта миокарда молодых животных / А. Б. Татарюнас [и др.] // Архив патологии. – 1980. – № 8. – С. 42–47.

24. *Ефимов, А. А.* О роли липофусцина в инволютивных и патологических процессах / А. А. Ефимов, Г. Н. Маслякова // Саратов. науч.-мед. журн. – 2009. – Т. 5, № 2. – С. 111–115.

25. *Lancu, T. C.* What is a name? – “Lipolysosome”: ultrastructural features of a lipid –containing organelle / T. C. Lancu [et al.] // Ultrastruct. Pathol. – 2013. – Vol. 37, N 5. – P. 293–303.

26. Показатели системы оксида азота и морфофункционального состояния печени при экспериментальном циррозе / А. М. Олещук [и др.] // Медицина и образование Сибири. – 2013. – № 2. – С. 26–30.

27. *Хазанов, А. И.* Функциональная диагностика болезней печени / А. И. Хазанов. – М. : Медицина, 1988. – 304 с.

28. *Камышников, В. С.* Клинико-лабораторная диагностика заболеваний печени / В. С. Камышников. – М. : МЕДпресс-информ, 2013. – 96 с.

Поступила в редакцию 13.05.2015