

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У КРЫС



В. П. Андреев, В. М. Цыркунов, И. А. Кондратович

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Тиоацетамид (ТАА) – индуцированный фиброз печени (ФП) признается классической моделью токсического поражения печени, однако для данной модели в литературе отсутствует описание последовательных стадий гистологических и ультраструктурных изменений разных клеточных популяций, принимающих участие в фиброзообразовании.

Цель исследования. Провести морфологический мониторинг фиброзообразования в печени у крыс на ТАА-модели ФП по гистологическим и ультраструктурным изменениям гепатоцитов и перисинусоидальных липоцитов (HSC).

Материал и методы. Эксперимент выполнен на 18 половозрелых крысах-самцах. Моделирование ФП проводилось путем внутрибрюшинного введения 2% раствора ТАА в дозе 10 мл/кг через день. Выполнялась световая микроскопия полутонких срезов печени, а также электронная микроскопия ультратонких срезов.

Результаты. Исследование полутонких срезов ткани печени животных контрольной группы показало нормальную архитектуру паренхимы, большое количество HSC, содержащих крупные липидные капли («покоящийся» фенотип), очень малое количество цитоплазматического матрикса, бедного мембранными органеллами. У животных, получивших ТАА в течение 4 недель, зафиксирован мезенхимально-эпителиальный переход HSC из «покоящегося» типа в фиброгенное состояние (фиброгенный фенотип), что сопровождалось постепенным уменьшением числа ретинолсодержащих капель и появлением у HSC признаков фибробластоподобной клетки (ФК). У животных, получивших ТАА в течение 12 недель, в печени увеличивался пул фиброгенных клеток, происходил мезотелиально-мезенхимальный переход, при котором мезотелиальные клетки мигрируют вглубь паренхимы и приобретают мезенхимальный фенотип. Липидсодержащие активированные ФК обнаруживались и в фиброзной ткани вокруг центральной вены. Значительно чаще встречались очаги деструкции печеночной ткани, обусловленные некрозом и апоптозом гепатоцитов.

Выводы. Введение ТАА индуцирует фиброзообразование в печени, а гистологический и ультраструктурный мониторинг состояния гепатоцитов и HSC позволяет мониторировать все стадии фиброзообразования, уточнить механизмы поражения внутриклеточных органелл и варианты гибели гепатоцитов. Данная модель ФП у крыс может быть применена при апробации новых антифиброзных лекарственных средств.

Ключевые слова: крысы, печень, фиброз, перисинусоидальные липоциты.

MORPHOLOGICAL MONITORING OF EXPERIMENTAL LIVER FIBROSIS IN RATS

V. P. Andreev, V. M. Tsyркunov, I. A. Kondratovich

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Background. Though thioacetamide (TAA)-induced liver fibrosis (LF) is recognized as a classical model of toxic liver damage, there is no literature data on the description of its successive stages of histological and ultrastructural changes in various cell populations involved in fibrosis.

Objective. To conduct morphological monitoring of fibrosis formation in the liver of rats using the TAA model of LF based on histological and ultrastructural changes in hepatocytes and perisinusoidal lipocytes (HSC).

Material and methods. The experiment was carried out on 18 sexually mature male rats. LF was modeled by intraperitoneal injection of 2% TAA solution at a dose of 10 ml / kg every other day. Light microscopy of semi-thin sections of the liver was performed, as well as electron microscopy of ultrathin sections.

Results. The study of semi-thin sections of rat liver tissue from the control group showed a normal architecture of the parenchyma, a large number of HSCs containing large lipid droplets ("resting" phenotype), a very small amount of cytoplasmic matrix poor in membrane organelles. In the animals that were receiving TAA for 4 weeks, a mesenchymal-epithelial transition of HSCs from the "resting" type to a fibrogenic state (fibrogenic phenotype) was recorded, that was accompanied by a gradual decrease in the number of retinol-containing drops and the appearance of fibroblast-like cells (FLC) in HSCs. In the animals, that were receiving TAA for 12 weeks, the pool of fibrogenic cells in the liver increased, a mesothelial-mesenchymal transition occurred, characterized by the mesothelial cell migration deeper into the parenchyma and their acquisition of a mesenchymal phenotype. Lipid-containing activated FLC were also found in fibrous tissue around the central vein. Foci of hepatic tissue destruction caused by necrosis and apoptosis of hepatocytes were much more common.

Conclusions. Administration of TAA induces liver fibrosis while histological and ultrastructural monitoring of the state of hepatocytes and HSCs allows to monitor all stages of fibrosis, clarifying the mechanisms of damage to intracellular organelles and variants of hepatocyte death. This model of LF in rats can be used to test new antifibrotic drugs.

Keywords: rats, liver, fibrosis, perisinusoidal lipocytes.

Автор, ответственный за переписку

Андреев Виктор Павлович, канд. биол. наук, профессор;
Гродненский государственный медицинский университет;
e-mail: andrvp@yandex.ru

Corresponding author:

Andreev Viktor, PhD (Biology), Professor; Grodno State
Medical University;
e-mail: andrvp@yandex.ru

Для цитирования: Андреев, В. П. Морфологический мониторинг экспериментального фиброза печени у крыс / В. П. Андреев, В. М. Цыркунов, И. А. Кондратович // Гепатология и гастроэнтерология. 2021. Т. 5, № 2. С. 150-160. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2021-5-2-150-160>

For citation: Andreev VP, Tsyркunov VM, Kondratovich IA. Morphological monitoring of experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology and Gastroenterology*. 2021;5(2):150-160. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2021-5-2-150-160>

Введение

Хроническое воздействие на печень токсических веществ – классический способ формирования фиброза печени (ФП) у лабораторных животных. Среди многих представителей профиброгенных гепатотоксинов (четырёххлористый углерод, диметилнитрозамин, диэтилнитрозамин и другие), тиацетамид (ТАА)-индуцированный ФП у грызунов – распространенная модель, поскольку действие токсина приводит к морфологическим и биохимическим изменениям, параметры которых аналогичны характеристикам при циррозе печени человека [1, 2, 3].

ТАА метаболизируется в микросомах цитролюбулярных гепатоцитов печёночным цитохромом (Cytochrome P450, CYP) до сульфина, а затем до сульфена [4]. Сульфен отвечает за увеличение ядрышек, увеличение объема ядра и внутриклеточной концентрации Ca^{++} , изменение проницаемости клеток и подавление митохондриальной активности. Сульфен регулирует высвобождение синтазы оксида азота (NO-synthase, NOS) и активность индуцированного стимулом ядерного фактора- jB (NF- jB), центрального медиатора воспалительных реакций и иммунной функции, вызывая центрилобулярный некроз, денатурацию белков и перекисное окисление липидов [5]. Кроме того, ТАА нарушает цикл мочевины и активность орнитинаминотрансферазы [6].

ТАА-индуцированный ФП признается классической моделью токсического поражения печени из-за хорошей растворимости данного токсина в воде и длительного периода повреждения и восстановления. Использование модели токсического повреждения печени, индуцированного ТАА, позволяет констатировать развитие воспаления и фиброза, в результате которых активированные миофибробласты в печени секретируют белки внеклеточного матрикса (ECM), основным источником которых выступают резидентные звездчатые клетки печени (Hepatic Stellate Cell, HSC, Cell of Ito) или перисинусоидальные липоциты (ПСЛ) [7]. Однако в литературе отсутствует описание последовательных стадий гистологических и ультраструктурных изменений ПСЛ при экспериментальном ТАА-индуцированном ФП, что важно для доклинических исследований при

апробации новых антифиброзных лекарственных средств.

Цель исследования – провести морфологический мониторинг фиброзообразования в печени у крыс на ТТА-модели ФП по гистологическим и ультраструктурным изменениям гепатоцитов и ПСЛ.

Материал и методы

Эксперимент выполнен на 18 половозрелых крысах-самцах, которые были разделены на 3 группы.

В 1-й группе (контроль, $n=6$) вводился 0,9% раствор NaCl внутривентрально в дозе 10 мл/кг через день в течение 12 недель. Во 2-й группе ($n=6$) вводился 2% раствор ТАА внутривентрально в дозе 10 мл/кг через день в течение 4-х недель. В 3-й группе ($n=6$) вводился 2% раствор ТАА внутривентрально в дозе 10 мл/кг через день в течение 12 недель. Раствор ТАА готовили ежедневно [8].

Изучению ультратонких срезов предшествовало исследование в световом микроскопе полутонких срезов (1мкм). Для лучшего выявления на полутонких срезах внутриклеточных структур (органелл, включений) и межклеточного вещества ткань биоптата сначала фиксировали по методике Sato-Taizan, а затем 1% четырехокисью осмия на фосфатном буфере Зеренсена pH 7,4 с добавлением дихромата калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) или кристаллов хромового ангидрида. Полутонкие срезы, приготовленные из блоков ткани, предназначенных для изучения в электронном микроскопе, окрашивали красителями азур II и основным фуксином.

Для ультраструктурного исследования тонкие кусочки размером 1мм³ фиксировали методом двойной фиксации: вначале фиксировали по методике Sato Taizan [9], затем после промывки в 0,1 М фосфатном буфере Зеренсена (pH 7,4) образцы ткани в течение 1 часа дополнительно фиксировались в 1% осмиевом фиксаторе, приготовленном на том же буфере. После дегидратации образцов в серии спиртовых растворов возрастающей концентрации и ацетоне они помещались в преполимеризованную смесь бутилового метакрилата и стирола, полимеризовались при 60° Цельсия. Ультратонкие срезы тол-

щиной 35-45 нм получали на ультрамикротоме фирмы Лейка, контрастировали 2% раствором уранилацетата в 70° этаноле и цитратом свинца. Контрастированные срезы изучались в электронном микроскопе JEM-1011 (JO, Япония).

Эксперимент проведен в соответствии с правилами и нормами гуманного обращения с животными и одобрен комитетом по биомедицинской этике УО «ГрГМУ».

Результаты и обсуждение

Светооптическое исследование полутонких срезов ткани печени животных контрольной группы показало нормальную архитектуру паренхимы и небольшое количество соединительной ткани в области портальной зоны и центральной вены (рис. 1, 2).

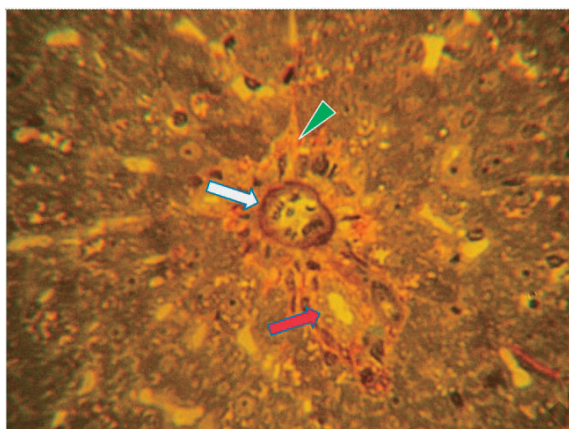


Рисунок 1. – 1-я группа (контроль): область портальной зоны; вена (белая стрелка); желчный проток (красная стрелка); артериола (наконечник стрелки) соединительная ткань (красная стрелка). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×400
Figure 1. – 1st group (control): area of the portal area; vein (white arrow); bile duct (red arrow); arterioles (arrow tip) connective tissue (red arrow). Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. ×400

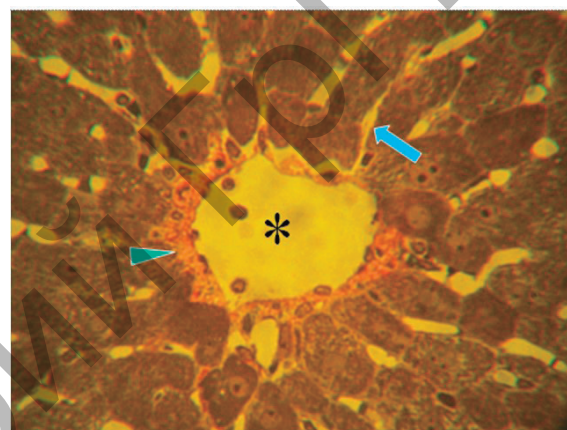


Рисунок 2. – 1-я группа (контроль): паренхима ткани печени в области центролобулярной вены (звездочка); синусоид (синяя стрелка), соединительная ткань (наконечник стрелки). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×400
Figure 2. – 1st group (control): liver tissue parenchyma in the area of the centrilobular vein (asterisk); sinusoid (blue arrow), connective tissue (arrow tip). Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. ×400

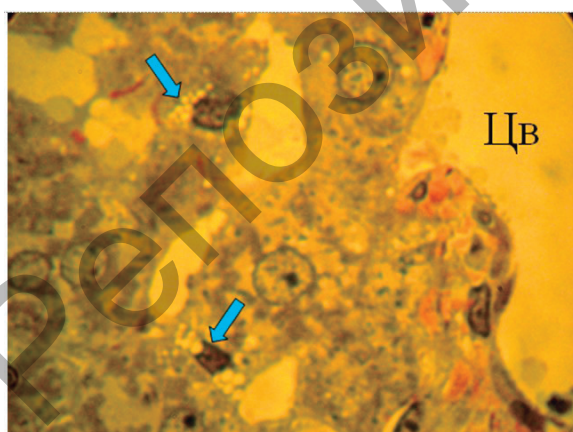


Рисунок 3. – 1-я группа: покоящиеся ПСЛ с большим количеством ретинолсодержащих капель (стрелки), расположенные вблизи центральной вены (Цв). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1000
Figure 3. – 1st group: resting HSC with a large number of retinol-containing drops (arrows) located near the central vein (Цв). Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. ×1000

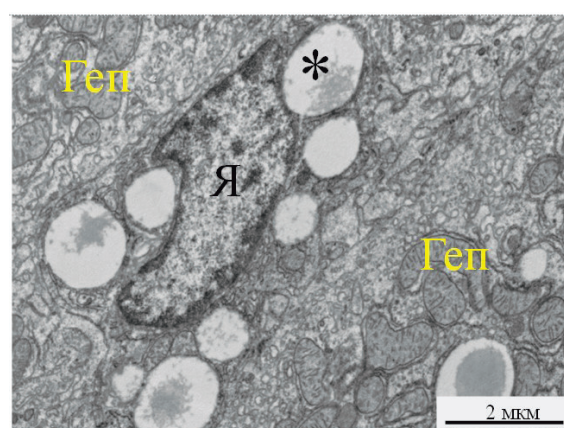


Рисунок 4. – 1-я группа: ультраструктурный фенотип «покоящегося» ПСЛ, с ядром (Я) неправильной формы, окруженном липидными каплями (звездочка), с небольшим объемом цитоплазмы, слаборазвитой эндоплазматической сетью, небольшим количеством мелких митохондрий. Геп – гепатоцит
Figure 4. – 1st group: ultrastructural phenotype of the "resting" HSC, with an irregular nucleus (Я) surrounded by lipid drops (asterisk), with a small cytoplasm volume, an underdeveloped endoplasmic network, a small number of small mitochondria. Геп – hepatocyte

Мезенхимально-эпителиальный переход (трансдифференцировка) ПСЛ из «покоящегося» в фиброгенное состояние (фиброгенный фенотип) сопровождался постепенным уменьшением числа ретинолсодержащих капель. В связи с этим истинное количество ПСЛ в паренхиме печени можно было определить, используя комплексное электронно-микроскопическое и светооптическое исследование полутонких срезов, приготовленных из блоков ткани, залитой в смолу.

Данный (переходный) фенотип ПСЛ выявлен при изучении ткани печени животных 2-й группы, которым ТАА вводили в течение 4 недель. Ультраструктура многих ПСЛ характеризовалась появлением у них признаков фибробластоподобной клетки (ФК) – увеличение области эухроматина (в ней находятся транскрипционно-активные гены), уменьшение количества липидных включений и перераспределение их по полюсам ПСЛ (рис. 5).

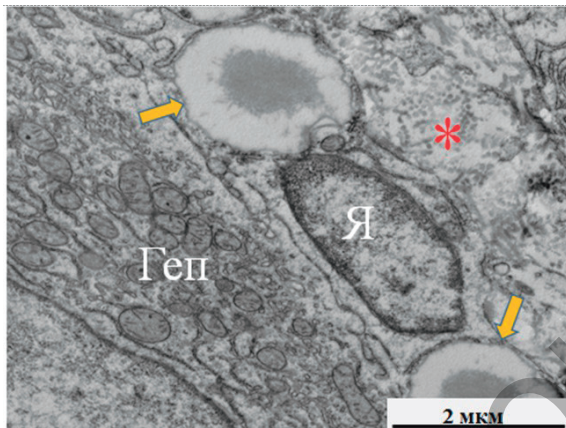


Рисунок 5. – 2-я группа: тесный контакт гепатоцита (Геп) с ФК, сохранившей липидные капли на полюсах (стрелки), небольшой ободок гетерохроматина и обширную область эухроматина в овальном ядре (Я). В тесном контакте с ФК пучок коллагеновых волокон (звездочка)
Figure 5. – 2nd group: close contact of hepatocyte (Gen) with FC, which retained lipid drops at the poles (arrows), a small rim of heterochromatin and a vast area of euchromatin in the oval nucleus (Я). In close contact with FC, a bundle of collagen fibers (asterisk)

ФК способны синтезировать ЕСМ, о чем свидетельствуют пучки коллагеновых волокон, расположенные рядом с ними (рис. 6-8).

При светооптическом изучении изменений в паренхиме печени крыс, получавших в течение 4 недель ТАА, были обнаружены следующие изменения: признаки раннего стеатогепатита в виде мелкокапельной жировой инфильтрации гепатоцитов (рис. 7), гепатомегалоцитоза (рис. 8), образование соединительнотканых септ (рис. 9), разрастание желчных протоков (рис. 10), набухшая цитоплазма гепатоцитов и облитерирование синусоидов (рис. 11), утолщение в отдельных участках капсулы вследствие пролиферации фиброзной ткани и внедрение от нее, вглубь паренхимы, тонких фиброзных септ (перегородок), рядом с которыми обнаруживались гепатомегалоциты (рис. 12).

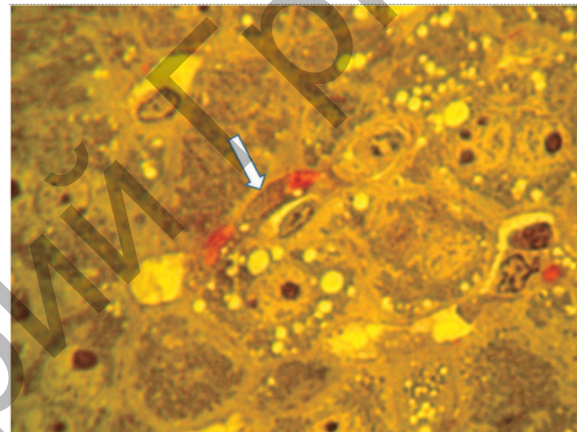


Рисунок 6. – 2-я группа: в центрлобулярной зоне печени активированная ФК (стрелка), содержащая на полюсах мелкие липидные капли, приступившая к синтезу коллагена, который окрашен основным фуксином в красный цвет. Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1000
Figure 6. – 2nd group: in the centrolobular zone of the liver, activated FC (arrow) containing small lipid drops at the poles, which began to synthesize collagen, colored red with the basic magenta. Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. ×1000

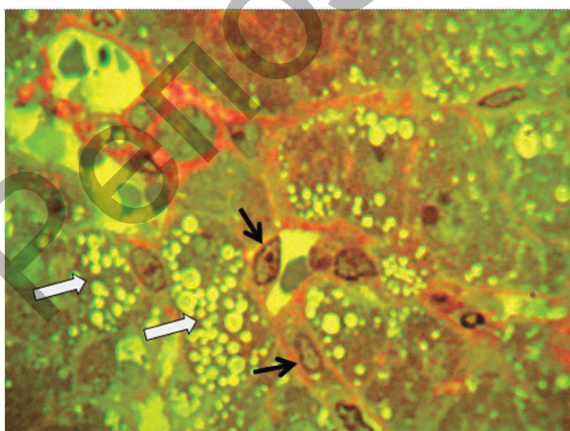


Рисунок 7. – 2-я группа: липидные капли разной величины в гепатоцитах (белые стрелки) вблизи портального тракта; ФК с единичными липидными каплями (черные стрелки). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1000
Figure 7. – 2nd group: lipid droplets of different sizes in hepatocytes (white arrows) near the portal tract; FC with single lipid drops (black arrows). Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. ×1000

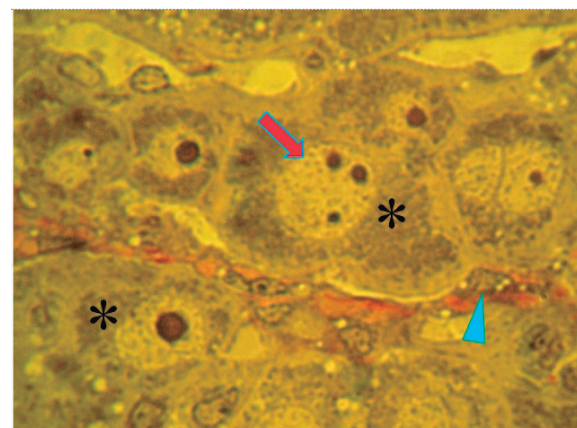


Рисунок 8. – 2-я группа: гепатомегалоциты (звездочки), контактирующие с формирующейся септой. Ядро обозначено стрелкой, ФК – наконечником стрелки. Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1000
Figure 8. – 2nd group: hepatomegalocytes (asterisks) in contact with the forming septum. The core is indicated by an arrow, FC - by an arrow tip. Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. ×1000

Известно, что воздействие ТАА сопровождается образованием активных форм кислорода, которые ингибируют транспорт липидов, процесс бета-окисления жирных кислот в митохондриях, приводя к цитоплазматическому накоплению липидов в гладкой эндоплазматической сети гепатоцитов, образованию липидных капель и, следовательно, к ожирению печени или стеатогепатиту [10].

Важно заметить, что на гистологических препаратах жировые капли экстрагируются из ткани при проводке через жирорастворимые жидкости, поэтому образовавшиеся вакуоли воспринимаются нередко как гидропическая дистрофия клеток.

Электронно-микроскопическое изучение печени животных 2-й группы выявило широкий

спектр субклеточных аномалий в ультраструктуре ядер и органелл цитоплазмы гепатоцитов, которые отражали цитопатические эффекты токсического действия ТАА. Ядра в гепатоцитах, находящихся вблизи фиброзных септ, были увеличены, в них наблюдалась потеря конденсированного хроматина вблизи ядерной мембраны и центральной области ядра; кариоплазма была светлой (признаки кариолизиса), в ней нередко находились вакуоли, содержащие цитоплазматические органеллы и липидные капли (рис. 13, 14). Ядрышки в этих гепатоцитах были гомогенными, плотными, нередко увеличенными; в них невозможно было различить фибриллярные центры, фибриллярный и гранулярный компоненты.

Наше исследование выявило значительную реконструкцию эндоплазматической сети,

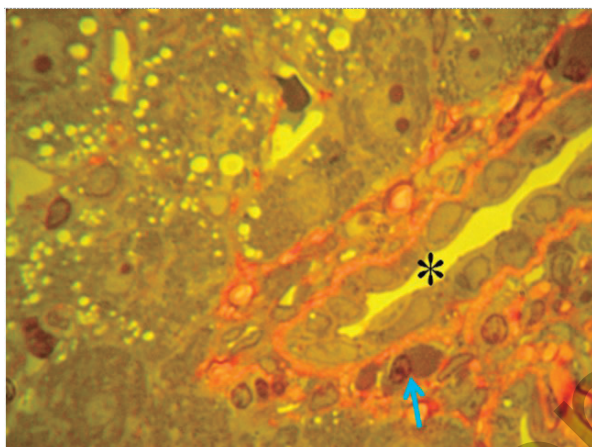


Рисунок 9. – 2-я группа: фрагмент формирующейся соединительнотканной септы с участием ФК (стрелки), в цитоплазме единичные липидные капли. Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 9. – 2nd group: fragment of forming connective tissue septum with the participation of FC (arrow), single lipid drops in the cytoplasm. Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

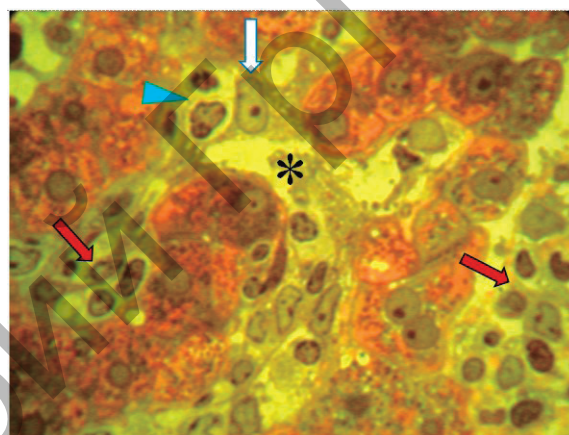


Рисунок 10. – 2-я группа: пролиферация эпителия желчного протока (звездочка) вглубь паренхимы, сопровождающаяся разрастанием соединительной ткани (перидуктулярный фиброз). Полиморфизм ядер эпителиальных клеток протока. Плазматическая клетка (стрелка). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 10. – 2nd group: proliferation of bile duct epithelium (asterisk) deep into the parenchyma, accompanied by growth of connective tissue (periductular fibrosis). Polymorphism of ductal epithelial cell nuclei. Plasma cell (arrow). Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

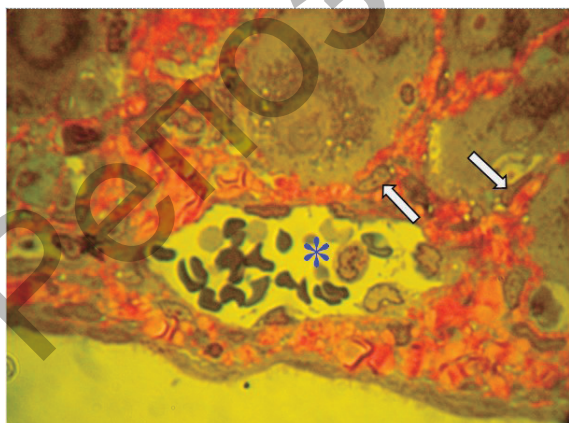


Рисунок 11. – 2-я группа: инфильтрация синусоидов (звездочка) мононуклеарными воспалительными клетками (красная стрелка). Макрофаг/клетка Купфера (белая стрелка) в контакте с лимфоцитами (наконечник стрелки). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 11. – 2nd group: sinusoid infiltration (asterisk) by mononuclear inflammatory cells (red arrow). Macrophage/Kupfer cell (white arrow) in contact with lymphocytes (arrow tip). Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

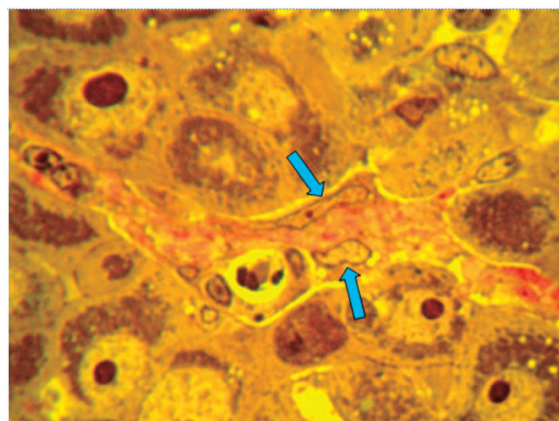


Рисунок 12. – 2-я группа: утолщение капсулы в отдельных участках, разрастание фиброзной ткани вокруг гепатоцитов. Кровеносный сосуд обозначен звездочкой, ФК – стрелкой. Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 12. – 2nd group: thickening of the capsule in separate areas, growth of fibrous tissue around hepatocytes. The blood vessel is indicated by an asterisk, FC by an arrow. Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

закрывающуюся в значительном разрастании двойных мембран – фагофор, которые участвуют в образовании аутофагосом. Фагофоры окружали отдельные митохондрии (реже – несколько органелл), пероксисомы, элементы гладкой эндоплазматической сети (рис. 15, 16).

При светооптическом изучении изменений в паренхиме печени крыс в 3-й группе, получавших ТАА в течение 12 недель, установлено расширение масштабов деструкции печёночной ткани, выражающейся в интенсивном разрастании фиброзной ткани на большем протяжении капсулы, в связи с этим она становилась неровной, с выбуханиями в тех участках, где фиброз был менее выражен. Соединительнотканые септы, разрастаясь от капсулы, порталных зон и центральных вен, разделяли паренхиму на мелкие

и крупные ложные дольки (рис. 17). В интенсивно разросшихся желчных протоках наблюдались дезорганизация и тесный контакт нейтрофилов с эпителием (рис. 18). Следует отметить, что в изучаемый период количество нейтрофилов в ткани значительно увеличивалось, что объясняется увеличением некрозов гепатоцитов в паренхиме.

Возрастало также количество гепатомегалоцитов и гепатоцитов с гомогенными пикнотическими ядрышками, нередко очень крупными, занимающими значительный объем ядра. Возможно, это связано с тем, что околядрышковый, и рядом находящийся гетерохроматин объединялись с материалом ядрышка (рис. 19). Подобная ультраструктура ядрышка указывала на полное ингибирование синтеза рибосомной РНК и формирование субъединиц рибосом.

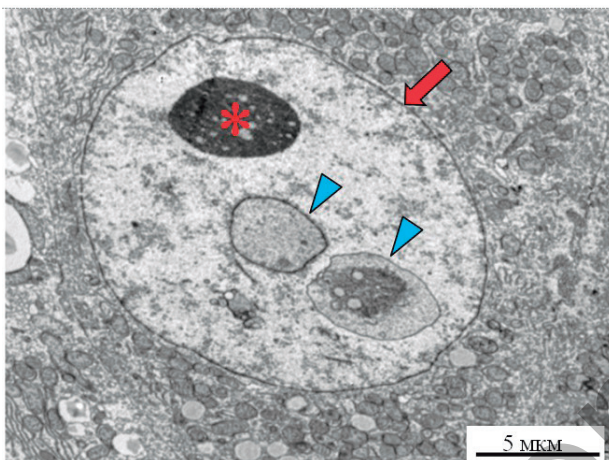


Рисунок 13. – 2-я группа: электронограмма ядра (стрелка) гепатоцита, в котором наблюдаются гомогенное осмиофильное пикнотическое ядрышко (звездочка) и вакуоли (наконечники стрелок), содержащие элементы цитоплазмы
Figure 13. – 2nd group: electron micrograph of the nucleus (arrow) of hepatocyte in which homogeneous osmiophilic pycnotic nucleus (asterisk) and vacuoles (arrow tips) containing cytoplasm elements are observed

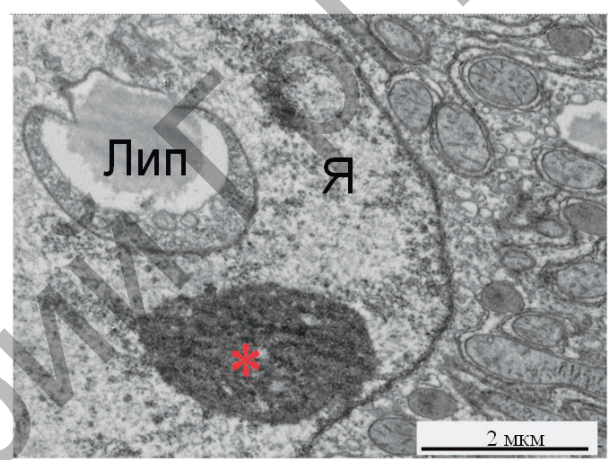


Рисунок 14. – 2-я группа: электронограмма ядра (Я) с нарушенной ультраструктурой ядрышка (звездочка) и вакуолю, ограниченной ядерной оболочкой, содержащей липидную каплю (Лип) и элементы цитоплазмы
Figure 14. – 2nd group: electron micrograph of nucleus (Я) with disturbed ultrastructure of nucleus (asterisk) and vacuum limited by nuclear envelope containing lipid drop (Лип) and cytoplasm elements

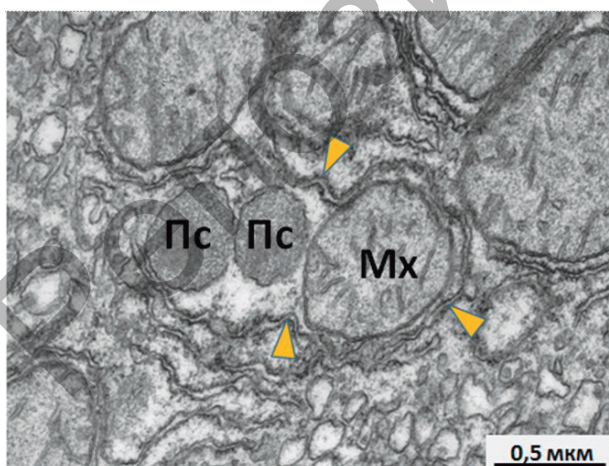


Рисунок 15. – 2-я группа: электронограмма фрагмента гепатоцита. В формирующейся аутофагосоме (фагофора обозначена наконечником стрелки) находятся митохондрия (Мх) и пероксисомы (Пс) с разрушающимися мембранами
Figure 15. – 2nd group: electron micrograph of a hepatocyte fragment. In the forming autophagosome (phagophora indicated by the tip of the arrow) is mitochondria (Mx) and peroxisomes (Пс) with collapsing membranes

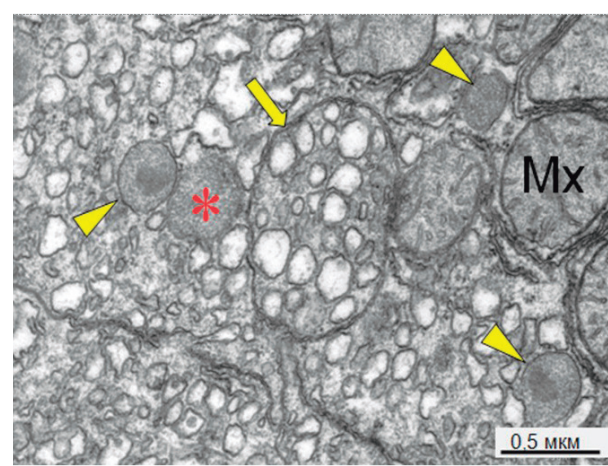


Рисунок 16. – 2-я группа: электронограмма фрагмента цитоплазмы гепатоцита. Фагофора, окружающая элементы гладкой эндоплазматической сети (стрелка), «Мх» – митохондрия, пероксисомы – наконечник стрелки, разрушающаяся пероксисома – звездочка
Figure 16. – electron micrograph of a hepatocyte cytoplasm fragment. Phagophora, surrounding elements of a smooth endoplasmic network (arrow), "Мх" - mitochondria, peroxisomes - tip of the arrow, collapsing peroxisome - asterisk

Увеличение объема цитоплазмы гепатомегалоцитов можно объяснить отеком, возникающим вследствие нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях и, как следствие, дефицита АТФ, необходимого для нормальной работы $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, локализованной в плазматической мембране и откачивающей ионы Na^+ из клетки.

Пул фиброгенных клеток дополнительно увеличивается за счет перехода эпителиальных клеток капсулы в мезенхимальные клетки (так называемый мезотелиально-мезенхимальный переход, или трансформация, ММТ), при кото-

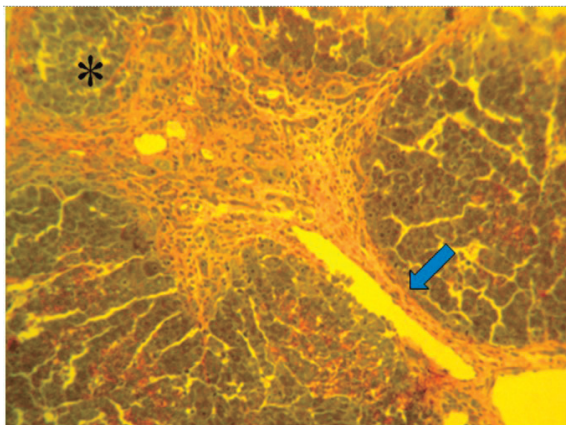


Рисунок 17. — 3-я группа: интенсивное разрастание фиброзной ткани во всех направлениях вблизи фиброзной капсулы и разделение паренхимы на ложные дольки. Звездочка — небольшая ложная долька, стрелка — продольный срез центральной вены. Полутонкий срез. Окраска: азур II — осн. фуксин. $\times 200$
Figure 17. — 3rd group: intense expansion of fibrous tissue in all directions near the fibrous capsule and separation of parenchyma into false lobules. An asterisk is a small false lobule, the arrow is a longitudinal section of the central vein. Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 200$

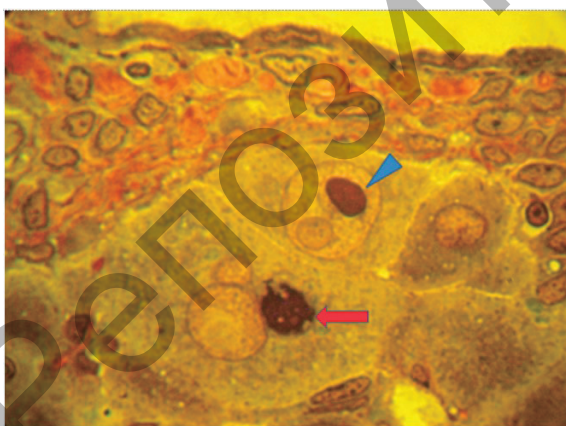


Рисунок 19. — 3-я группа: разрастание фиброзной ткани под капсулой; в верхнем левом гепатоците гипертрофированное ядро, содержащее крупное гомогенное темное ядрышко (наконечник стрелки) и вакуоль; в центре — мегалогепатоцит, в цитоплазме которого находится тельце (стрелка), напоминающее ядро в состоянии апоптоза. Окраска: азур II — осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 19. — 3rd group: growth of fibrous tissue under the capsule; in the upper left hepatocyte, a hypertrophied nucleus containing a large homogeneous dark nucleolus (arrow tip) and vacuole; in the center is a megalohepatocyte, in the cytoplasm of which there is a body (arrow) resembling a nucleus in a state of apoptosis. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

ром мезотелиальные клетки мигрируют вглубь паренхимы и приобретают мезенхимальный фенотип (рис. 20) [11]. В разрастающейся от капсулы фиброзной ткани наблюдалось незначительное количество ФК с сохранившимися липидными каплями, однако в фиброзных септах (перегородках), расположенных глубже, количество липидсодержащих клеток значительно возросло (рис. 21).

Сама капсула на значительном протяжении значительно утолщалась за счет фиброзной ткани. Вблизи капсулы нередко встречались гепатоциты в состоянии апоптоза и микроузлы печеночной ткани (рис. 22, 23).

Липидсодержащие активированные ФК обнаруживались и в фиброзной ткани, разрастающейся вокруг центральной вены (рис. 24, 25).

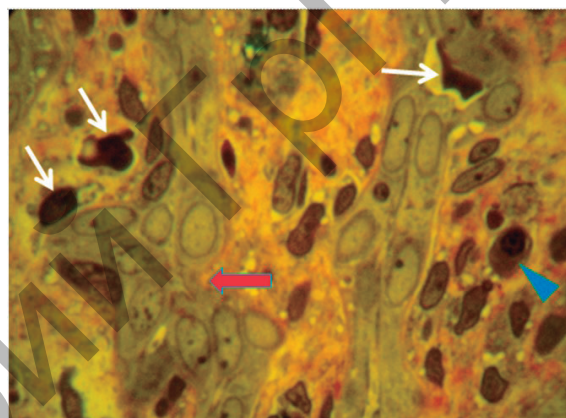


Рисунок 18. — 3-я группа: нарушение ультраструктуры разросшихся желчных протоков (красная стрелка), окруженных фиброзной тканью и мононуклеарными клетками с нейтрофилами (белые стрелки). Наконечником стрелки обозначена плазматическая клетка. Полутонкий срез. Окраска: азур II — осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 18. — 3rd group: disturbance of the ultrastructure of sprawling bile ducts (red arrow) surrounded by fibrous tissue and mononuclear cells with neutrophils (white arrows). The tip of the arrow indicates a plasma cell. Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

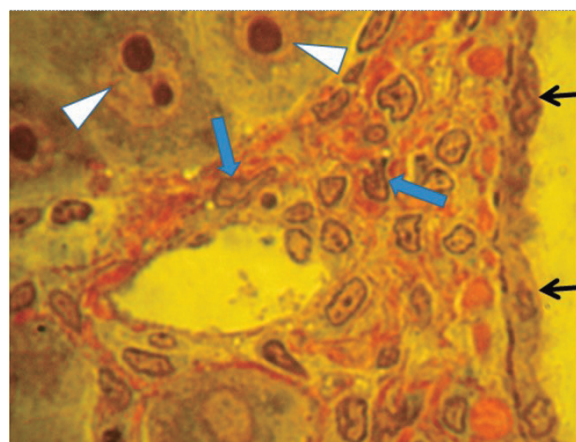


Рисунок 20. — 3-я группа: слой мезотелиальных клеток (черные стрелки); среди фиброзной ткани видны активные ФК (синие стрелки) с липидными каплями в цитоплазме. Ядра гепатомегалоцитов обозначены наконечниками стрелок. Окраска: азур II — осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 20. — 3rd group: mesothelial cell layer (black arrows); active FC (blue arrows) with lipid droplets in the cytoplasm are visible among fibrous tissue. Hepatomegalocyte nuclei are indicated by arrowheads. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

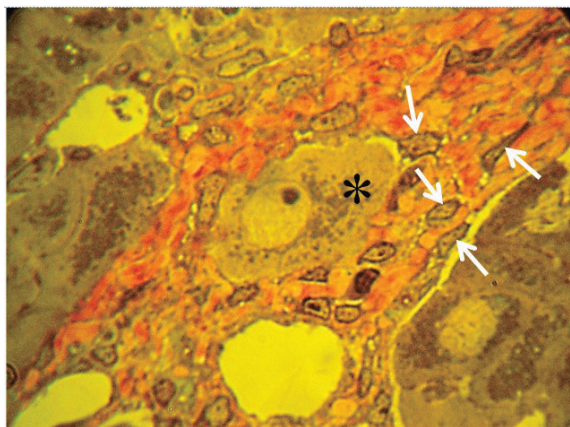


Рисунок 21. – 3-я группа: фрагмент формирующейся соединительнотканной септы с участием ФК (стрелки), содержащих в цитоплазме немногочисленные липидные капли; гепатоцит, окруженный фиброзной тканью (звездочка). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1000
Figure 21. – 3rd group: a fragment of forming connective tissue septum involving FC (arrows) containing few lipid droplets in the cytoplasm; hepatocyte surrounded by fibrous tissue (asterisk). Semi-thin section. Azure II-basic fuchsin stain. ×1000



Рисунок 22. – 3-я группа: гепатоцит (стрелка) вблизи капсулы в состоянии раннего апоптоза; гепатоциты с гипертрофированными ядрышками обозначены накопниками стрелок. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1000
Figure 22. – 3rd group: hepatocyte (arrow) near the capsule in an early apoptosis state; hepatocytes with hypertrophied nuclei indicated by arrowheads. Azure II-basic fuchsin stain. ×1000

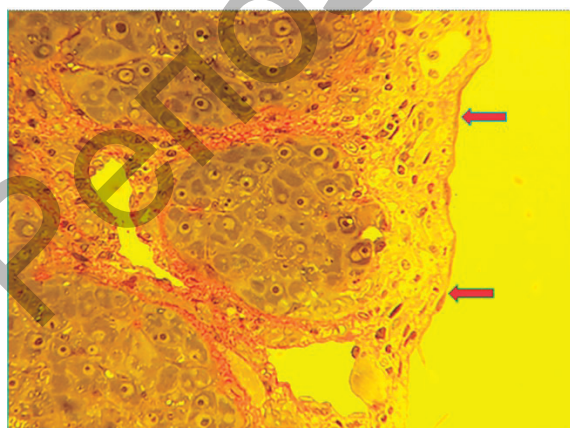


Рисунок 23. – 3-я группа: микроузел (ложная долька), образованный разрастающейся от капсулы, (стрелки) вглубь паренхимы, фиброзной тканью; некоторые ядра гепатоцитов содержат крупные ядрышки. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×400
Figure 23. – 3rd group: micronode (false lobule) formed by fibrous tissue growing from the capsule, (arrows) deep into the parenchyma; some hepatocyte nuclei contain large nuclei. Azure II-basic fuchsin stain. ×400

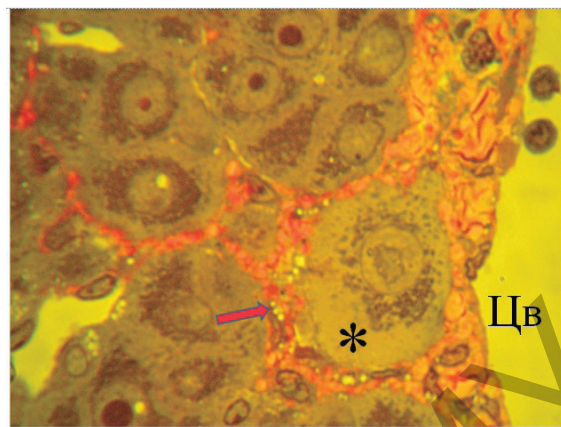


Рисунок 24. – 3-я группа: гепатоцит (звездочка) в состоянии дистрофии, окруженный фиброзной тканью (стрелка). Центральная вена (Цв). Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1000
Figure 24. – 3rd group: hepatocyte (asterisk) in a state of dystrophy surrounded by fibrous tissue (arrow). Central vein (Цв) Azure II-basic fuchsin stain. ×1000

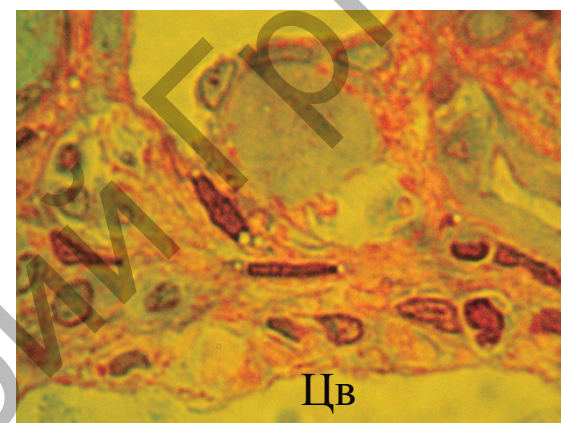


Рисунок 25. – 3-я группа: формирование фиброзной ткани вблизи центральной вены (Цв) с участием липидсодержащих ФК. Окраска: азур II – осн. фуксин. ×1200
Figure 25. – 3rd group: formation of fibrous tissue near the central vein (Цв) involving lipid-containing FC. Azure II-basic fuchsin stain. ×1200

Данное наблюдение может служить косвенным доказательством того, что в глубине паренхимы в организации фиброзной ткани в большей степени задействованы ПСЛ.

Характерен тот факт, что небольшие очаги деструкции печёночной ткани с инфильтрацией воспалительными клетками, захватывающие отдельные синусоиды, крайне редко встречались у животных 2-й и почти не встречались в 3-й группе (рис. 26, 27).

Значительно чаще встречались очаги деструкции печёночной ткани, обусловленные некрозом и апоптотической гибелью гепатоцитов (рис. 28, 29).

Спорадическая одноклеточная гибель стареющих гепатоцитов в виде дистрофии встречалась у опытных животных значительно чаще, чем в контрольной группе. Известно, что устойчивость к развитию ТАА-индуцированному фиброзу в печени животных зависит от скорости выведения некротических масс: некротические массы быстро очищаются у устойчивых к фибро-

зу особой линии FVB, но сохраняются у чувствительных к фиброзу линейных животных BALB. Основными клетками, ответственными за распознавание и удаление мертвых клеток *in vivo*, являются макрофаги [12]. В нашем исследовании участие в эффероцитозе (процессе поглощения и удаления некротических клеток) макрофагов наблюдалось довольно редко, особенно у животных в 3-й группе.

Со стороны митохондриального комплекса гепатоцитов наблюдались более выраженные изменения деструктивного характера, выражающиеся в лизисе крист, неправильной, отростчатой, нередко кольцевой форме. Следует отметить отсутствие мегамитохондрий в гепатоцитах этой экспериментальной модели. Часто встречались клетки, у которых большое количество митохондрий находилось на одном полюсе в непосредственной близости от ядра (рис. 30). В этих

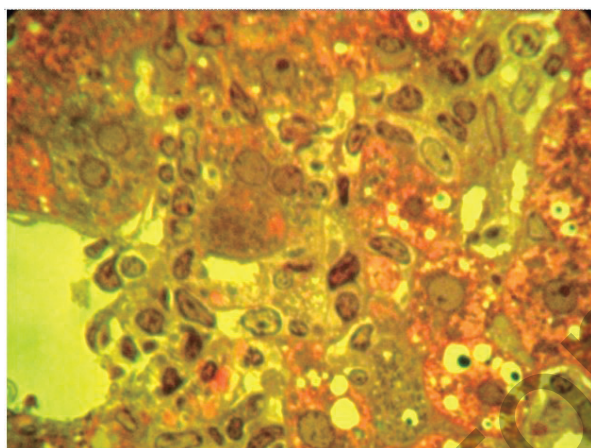


Рисунок 26. – 3-я группа: разрушение гепатоцитов и инфильтрация воспалительными клетками. Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 26. – 3rd group: hepatocyte destruction and infiltration with inflammatory cells. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

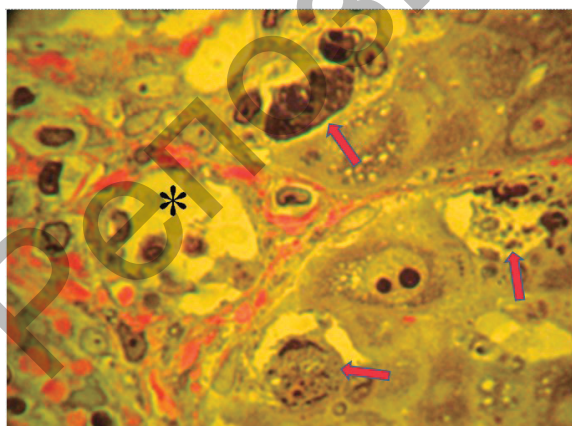


Рисунок 28. – 3-я группа: очаги деструкции гепатоцитов (стрелки) вблизи центральной вены (звездочка). Верхней стрелкой обозначен гепатоцит в состоянии позднего апоптоза. Соединительная ткань – красного цвета. Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 28. – 3rd group: foci of hepatocyte destruction (arrow) near the central vein (asterisk). The upper arrow indicates a hepatocyte in a state of late apoptosis. The connective tissue is stained in red. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

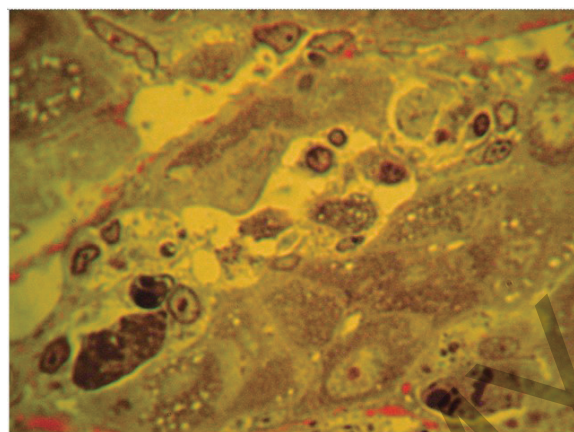


Рисунок 27. – 3-я группа: цепочка разрушающихся гепатоцитов. Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 27. – 3rd group: chain of collapsing hepatocytes. Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

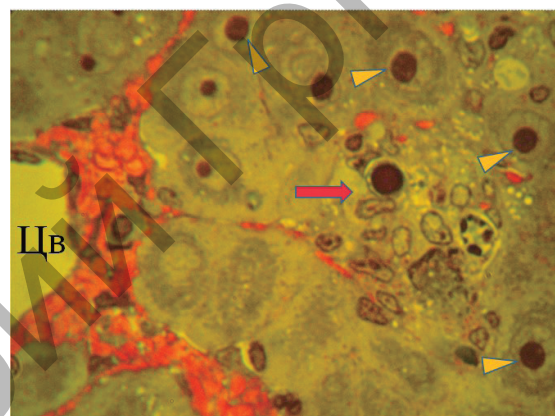


Рисунок 29. – 3-я группа: очаг деструкции гепатоцита с крупным гомогенным ядрышком (стрелка); кластер гепатоцитов с гипертрофированными ядрышками (наконечники стрелок). Разрастание соединительной ткани вокруг центральной вены (Цв). Окраска: азур II – осн. фуксин. $\times 1000$
Figure 29. – 3rd group: hepatocyte degradation focus with large homogeneous nucleus (arrow); a cluster of hepatocytes with hypertrophied nuclei (arrow tips). Growth of connective tissue around the central vein (Цв). Azure II-basic fuchsin stain. $\times 1000$

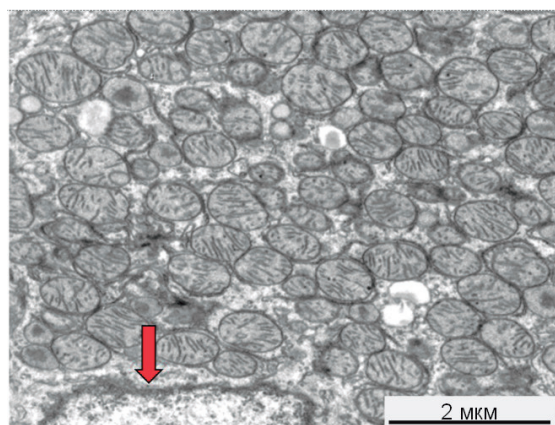


Рисунок 30. – 3-я группа: электронограмма фрагмента цитоплазмы гепатоцита, у которого митохондрии расположены плотно друг к другу у одного полюса ядра (стрелка), претерпевшего кариолизис
Figure 30. – 3rd group: electron micrograph of a hepatocyte cytoplasm fragment, in which mitochondria are located tightly to each other at one pole of the nucleus (arrow), which has undergone karyolysis

гепатоцитах элементы гранулярной эндоплазматической сети были представлены небольшими фрагментами, а гладкая эндоплазматическая сеть находилась на периферии клетки.

Такое состояние органелл объясняется разрушением микротрубочек и, возможно, других структур цитоскелета клетки. В подобных клетках часто обнаруживались разной величины парциальные некрозы цитоплазмы (рис. 31). Не исключается также, что это продукт фагоцитоза фрагмента цитоплазмы соседней клетки, претерпевшей апоптоз.

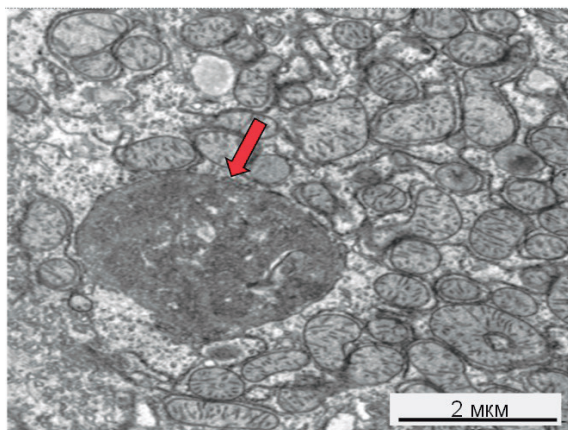


Рисунок 31. – 3-я группа: электронограмма фрагмента цитоплазмы гепатоцита, в цитоплазме которого очаг (стрелка) парциального некроза цитоплазмы
Figure 31. – 3rd group: electron micrograph of a hepatocyte cytoplasm fragment, in the cytoplasm of which the focus (arrow) of cytoplasm partial necrosis

Выводы

1. Введение ТАА лабораторным животным (крысам) в течение 8 и 12 недель позволяет индуцировать процесс фиброобразования в печени от начальных (жировая инфильтрация), промежуточных (стеатоз/стеатогепатит) и конечных стадий ФП (цирроз) с доказательством всех морфологических стадий токсического поражения печени в динамике.

2. Гистологический и ультраструктурный мониторинг состояния гепатоцитов при формировании ТАА-модели ФП у крыс позволяет уточнить механизмы поражения внутриклеточных органелл и варианты гибели гепатоцитов.

3. Гистологическая и ультраструктурная оценка функционального состояния ПСЛ в печени в динамике ТАА-модели ФП у крыс позволяет мониторировать все стадии фиброобразования, связанные с активацией ПСЛ, трансдифференцировкой их в миофибробласты и оценкой ЕСМ.

4. ТАА-модель ФП у крыс и характер токсического воздействия на печень сходна по морфологическим изменениям с аналогичными стадиями ФП у человека, что свидетельствует о возможном использовании данной модели при апробации новых лекарственных средств, обладающих антифиброзным действием [13].

References

- Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol*. 2015;3(1):53-66. doi: 10.14218/JCTH.2014.00035.
- Stärkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):319-33. doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.004.
- Hoffmann C, Djerir NEH, Danckaert A, Fernandes J, Roux P, Charrueau C, Lachagès AM, Charlotte F, Brocheriou I, Clément K, Aron-Wisniewsky J, Foulfelle F, Ratzu V, Hainque B, Bonnefont-Rousselot D, Bigey P, Escriviou V. Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):3850. doi: 10.1038/s41598-020-60615-0.
- Porter WR, Gudzinowicz MJ, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979;208(3):386-91.
- Gilmore TD, Wolenski FS. NF-κB: where did it come from and why? *Immunol Rev*. 2012;246(1):14-35. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01096.x.
- Akhtar T, Sheikh N. An overview of thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Toxin Reviews*. 2013;32(3):43-46. doi: 10.3109/15569543.2013.805144.
- Tsykunov V, Andreev V, Kravchuk R, Kondratovich I. Ito stellate cells (hepatic stellate cells) in diagnosis of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol Open Access*. 2019;10(4):213-219.
- Novogrodskaya Ya, Ostrovskaya O, Kravchuk R, Doroshenko Ye, Huljai I, Aleschuk A, Shelesnaya S, Kurbat M. Sposob modelirovaniya jeksperimentalnogo tioacetamidnogo porazheniya pecheni u kryss [The method of modelling of experimental thioacetamide liver damage in rats]. *Gepatologija i gastrojenterologija* [Hepatology and Gastroenterology]. 2020;4(1):90-95. doi: 10.25298/2616-5546-2020-4-1-90-95. (Russian).
- Sato T, Takagi I. An electron microscopic study of specimens fixed for longer periods in phosphate buffered formalin. *J Electron Microsc*. 1982;31(4):423-8.
- Lee YH, Son JY, Kim KS, Park YJ, Kim HR, Park JH, Kim KB, Lee KY, Kang KW, Kim IS, Kacew S, Lee BM, Kim HS. Estrogen Deficiency Potentiates Thioacetamide-Induced Hepatic Fibrosis in Sprague-Dawley Rats. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3709. doi: 10.3390/ijms20153709.
- Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6(1):19. doi: 10.1186/1755-1536-6-19.
- An P, Wei LL, Zhao S, Sverdlov DY, Vaid KA, Miyamoto M, Kuramitsu K, Lai M, Popov YV. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis. *Nat Commun*. 2020;11(1):2362. doi: 10.1038/s41467-020-16092-0.
- Tsykunov V, Chernyak S, Prokopchik N, Andreev V, Shulika V. Vliyanie bakterialnogo lipopolisaharida – pirogenala na regress fibroza v pecheni pri hronicheskom gepatite C [Impact of bacterial lipopolysaccharide – pyrogenal on a regression of liver fibrosis in chronic hepatitis C]. *Recept [Recipe]*. 2015;6:45-53. (Russian).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Андреев Виктор Павлович, канд. биол. наук, профессор; Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: andrvp@yandex.ru

Цыркунов Владимир Максимович, д-р мед. наук, профессор; Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: tvn111@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9366-6789

Кондратович Ирина Анатольевна, Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: iriskak22@mail.ru, ORCID: 0000-0002-7310-5204

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Financing. The study was performed without external funding.
Conformity with principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Information about the authors

Andreev Viktor, PhD (Biology), Professor; Grodno State Medical University; e-mail: andrvp@yandex.ru

Tsyrukunov Vladimir, PhD, MD (Medicine), Professor; Grodno State Medical University; e-mail: tvn111@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9366-6789

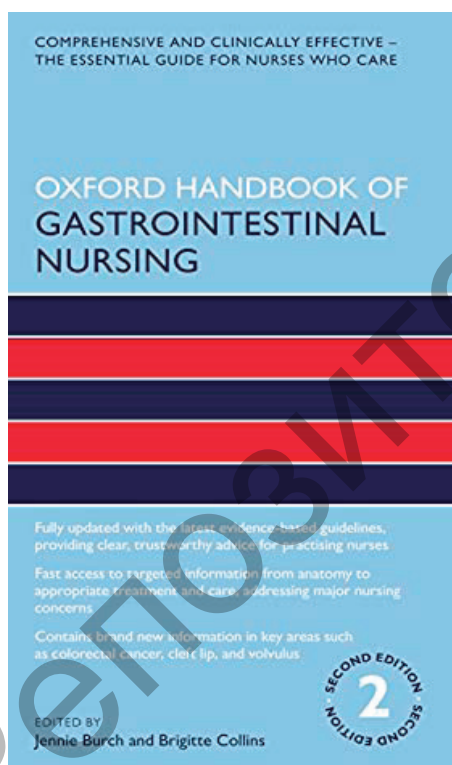
Kondratovich Iryna, Grodno State Medical University; e-mail: iriskak22@mail.ru, ORCID: 0000-0002-7310-5204

Поступила: 25.10.2021

Принята к печати: 29.10.2021

Received: 25.10.2021

Accepted: 29.10.2021



Burch, J. Oxford Handbook of Gastrointestinal Nursing / J. Burch, B. Collins. – 2nd ed. – Oxford : Oxford University Press, 2021. – 554 p. – ISBN 9780198833178.

Nurses must deliver up-to-date, clinically effective, evidence-based care across a range of settings and develop nursing services to meet changing demands. The thoroughly revised and restructured Oxford Handbook of Gastrointestinal Nursing 2nd edition is tailored to provide the essential knowledge nurses need; at their fingertips when they need it.

This handbook will guide the reader through the care of patients with a wide range of conditions of the gastrointestinal tract. Each chapter is written in a consistent structure for ease-of-use, including symptoms, causes, investigations, and treatments. Key information is provided clearly and succinctly with tables and bullet points. Chapters cover everything from anatomy to the appropriate treatment or nursing care. It now includes new conditions including colorectal cancer, anal warts, cleft lip, and volvulus, as well as the enhanced recovery after surgery pathway. Providing key summaries of common problems and essential issues, it will provide both an invaluable reference for gastrointestinal nurses, as well as a precise, targeted guide for nurses from other specialties caring for patients with GI problems.