

Romak O. I., Sadovska Yu., Goryuk I. Liver morphological changes and proinflammatory cytokines in experimental animals in case of cirrhosis. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(3):690-699. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.804170>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4516>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 27.03.2017. Revised 28.03.2017. Accepted: 29.03.2017.

UDC 616.36-004-091:577.112]-092.9

LIVER MORPHOLOGICAL CHANGES AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN EXPERIMENTAL ANIMALS IN CASE OF CIRRHOSIS

O. I. Romak, Yu. Sadovska, I. Goryuk

Odessa National Medical University, Odessa

Summary

Liver cirrhosis is one of the acute problems of modern hepatology that develops in case of long-term chronic hepatitis. It is known that cytokines play an important role in controlling an adaptive response to chronic toxic damage.

After the morphological examination of the hepatic tissue and of the proinflammatory cytokine system in case of experimental cirrhosis it was established the prominent immune response to acute inflammation at early stage as well as pro-inflammatory interleukins level significant increase. The further pathomorphological examination showed a minor involution of the pathological process, the immune response was also slightly inhibited in comparison to the previous period.

Key words: liver cirrhosis; experimental animals; proinflammatory cytokines; morphology

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗВЕНА СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ У ЖИВОТНЫХ

О. И. Ромак, Ю. Садовская, И. Горюк

Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

Резюме

Одной из актуальных проблем современной гепатологии является цирроз, который часто развивается вследствие длительного процесса хронического гепатита. Известно, что важной составляющей контроля протекания процессов адаптивного ответа на хроническое токсическое поражение является система цитокинов.

В результате исследования морфологии ткани печени и провоспалительного звена системы цитокинов при экспериментальном циррозе было выявлено, что на начальной стадии цирроза в крови экспериментальных животных наблюдалась картина активного иммунного ответа на воспаление – существенное повышение уровней провоспалительных цитокинов. В последующем наблюдалась незначительная инволюция процесса, вместе с тем иммунный ответ несколько угнетался в сравнении с предыдущим сроком наблюдения.

Ключевые слова: цирроз печени; экспериментальные животные; провоспалительные цитокины; морфология.

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ТА ПРОЗАПАЛЬНОЇ ЛАНКИ СИСТЕМИ ЦИТОКІНІВ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ЗА УМОВ ЦИРОЗУ

О. І. Ромак, Ю. Садовська, І. Горюк

Одеський національний медичний університет, м. Одеса

Резюме

Актуальною проблемою сучасної гепатології є цироз, якому зазвичай передують тривалий процес хронічного гепатиту. Відомо, що важливою складовою контролю протікання процесів адаптивної відповіді на хронічне токсичне ураження є система цитокінів.

В результаті дослідження морфології тканини печінки та прозапальної ланки системи цитокінів при експериментальному цирозі було з'ясовано, що на початковій стадії цирозу в крові експериментальних тварин спостерігалась картина активної імунної відповіді на запалення – суттєве підвищення рівнів прозапальних цитокінів. У наступний термін спостерігалась незначна інволюція процесу, разом з тим імунна відповідь дещо пригнічувалась у порівнянні з попереднім терміном.

Ключові слова: цироз печінки; експериментальні тварини; прозапальні цитокіни; морфологія.

Однією з актуальних проблем сучасної гепатології є цироз, якому зазвичай передують тривалий процес хронічного гепатиту [1]. Характерними морфологічними ознаками цирозу є утворення псевдо часточок, розділених сполучнотканинними прошарками, виразна лімфо-макрофагальна інфільтрація, жирова дистрофія гепатоцитів [2, 3].

Активну участь у формуванні фіброзних тяжів беруть зірчасті клітини печінки (ЗКП), портальні фібробласти, фіброцити та епітеліальні клітини, які підлягли епітелій-мезенхімальному перетворенню [4]. Також відбувається підсилення колагеногенезу, експресії матриксних металопротеїназ та їх тканинних інгібіторів [5].

Серед причин, що призводять до розвитку цирозу печінки розрізняють: інфекційні (вірусний гепатит, паразитарні захворювання печінки, інфекції жовчних шляхів); токсичні та токсико-алергічні (вживання алкоголю, промислові та харчові

отрути, лікарські речовини, алергени), біліарні (холангіт, холестаза різноманітної етіології); метаболічні (недостатність білків, вітамінів, ліпотропних факторів, цирози накопичення при спадкових порушеннях метаболізму); циркуляторні (хронічний венозний застій у печінці); криптогенні цирози. [3, 6].

За останні 20 років було доведено, ЗКП являються ключовими клітинами у формуванні ФП [7, 8], а мікрооточення відіграє головну роль в активації ЗКП [9]. Клітини Купфера беруть важливу участь в модуляції запалення при розвитку ФП [10, 11]. Припускають, що у випадку ФП клітини Купфера продукують велику кількість прозапальних цитокінів: фактор некрозу пухлини α (ФНП- α), інтерлейкін 1β (ІЛ- 1β), макрофагальний запальний протеїн 1 (МЗП-1); вони стимулюють ЗКП і роблять свій внесок у пошкодження печінки. Запалення вважають мостом між пошкодженням печінки та розвитком фіброзу [12].

Беручи до уваги той факт, що складовою контролю протікання процесів адаптивної відповіді на хронічне токсичне ураження є система цитокінів, метою нашого дослідження стало вивчення динаміки змін її прозапальної ланки у самців та самок експериментальних тварин під впливом чотири хлористого вуглецю.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено на статевозрілих самцях щурів Wistar. Для моделювання цирозу печінки перорально протягом 3 місяців вводили розчин чотирихлористого вуглецю концентрацією 50 % у дозі 0,4 мл. Замість води для пиття тварини отримували розчин етилового спирту концентрацією 10 %.

Тварин розподілили на 2 групи: I група – тварини з модельованим токсичним гепатитом; II група – інтактний контроль. Початком експерименту вважали перший день після припинення ведення чотирихлористого вуглецю. Проводили патоморфологічне дослідження печінки з забарвленням за стандартними методиками [13]; вимірювання вмісту цитокінів здійснювали шляхом імуноферментного аналізу (ІФА) з застосуванням стандартних наборів для кількісного виявлення інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) ELISA (виробник Bender MedSystems).

Виведення тварин з експерименту відбувалося на 14-у та 35-у добу від останнього дня застосування патологічних чинників.

Підготування тварин до експерименту, всі інвазивні втручання, знеболювання та виведення з експерименту проводили згідно Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 27, ст.230 від 2006 р., із змінами, внесеними відповідно Закону № 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009, ВВР, 2010, № 9, ст.76.

Результати досліджень та їх обговорення. При патоморфологічному дослідженні групи тварин з модельованим цирозом на 14-у добу макроскопічно печінка бліда, місцями насиченого бурого кольору, спостерігаються дрібновузлові новоутворення. Мікроскопічно виявляється чітко виражені ознаки цирозу із значним розростанням сполучнотканинних тяжів та утворенням хибних часточок (рис.1). Скрізь наявні осередки скупчень гепатоцитів без ядер з вакуолями у цитоплазмі, а також осередки балонної дистрофії (рис.2). Відзначається розширення портальних трактів, фіброзування судинних стінок із вогнищевими явищами їх гіалінозу та значною периваскулярною лімфогістіоцитарною та макрофагальною інфільтрацією.

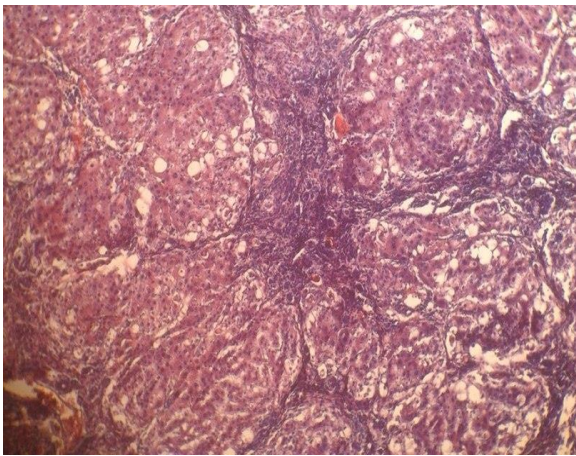


Рис. 1. Печінка щурів з експериментальним цирозом на 14-у добу експерименту: розростання сполучнотканинних тяжів з утворенням хибних часточок, виражена лімфогістіоцитарна інфільтрація, жирова дистрофія. Забарвлення гематоксилін-еозин, збільшення x100.

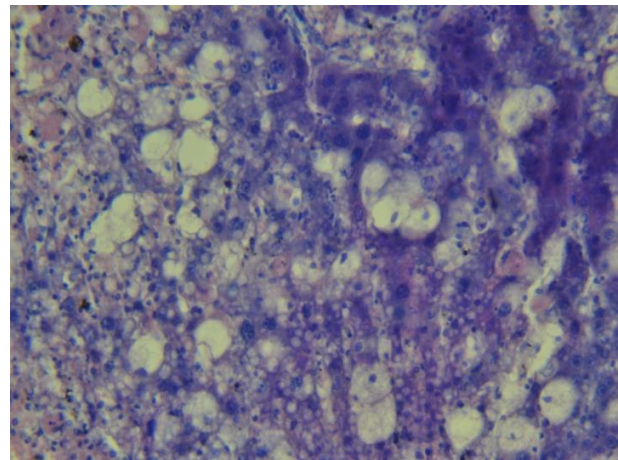


Рис. 2. Печінка щурів з експериментальним цирозом на 14-у добу експерименту: виражена балонна та жирова дистрофія. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x200.

При патоморфологічному дослідженні тварин с індукованим ураженням печінки на 35-у добу експерименту переважна площа печінки темно-бурого кольору, зменшена у розмірі. Мікроскопічно подекуди виявляється порушення структури печінкових часточок за рахунок формування сполучнотканинних тяжів (рис. 3). У гепатоцитах наявні дистрофічні зміни: клітини набряклі, подекуди спостерігаються дрібні спустошені вакуолі з дислокованим ядром до периферії, осередки помутніння цитоплазми (рис. 4). Судини повнокровні. Відмічаються явища діapedезних крововиливів.

Вміст ІЛ-2 та ІЛ-6 стрімко зростає на 14-у добу експерименту, в той час як на 35-у добу їх рівень дещо знижувався у порівнянні з контрольною групою, у якої рівні ІЛ-2 та ІЛ-6 сягали 16,7 пкмоль/мл та 75,3 пкмоль/мл відповідно (рис. 5).

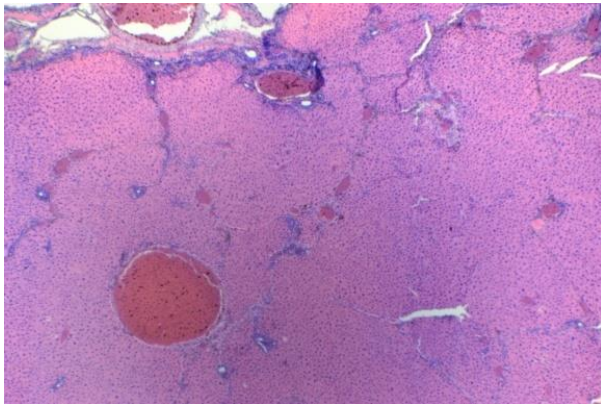


Рис. 3. Печінка щурів з експериментальним цирозом на 35-у добу експерименту: сформовані сполучнотканинні тяжі, повнокров'я судин. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення $\times 40$.

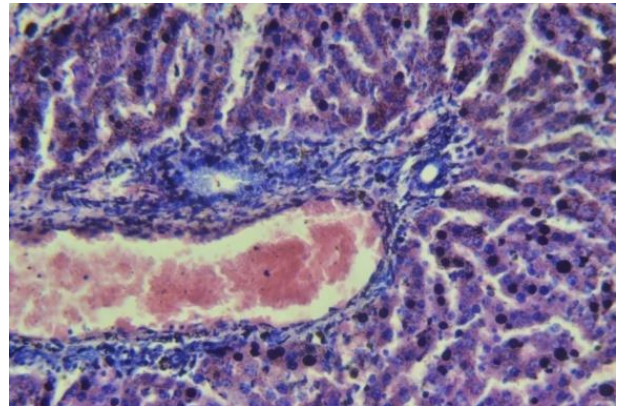


Рис. 4. Печінка щурів з експериментальним цирозом на 35-у добу експерименту: периваскулярна лімфогістіоцитарна інфільтрація, білкова дистрофія гепатоцитів. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення $\times 100$.

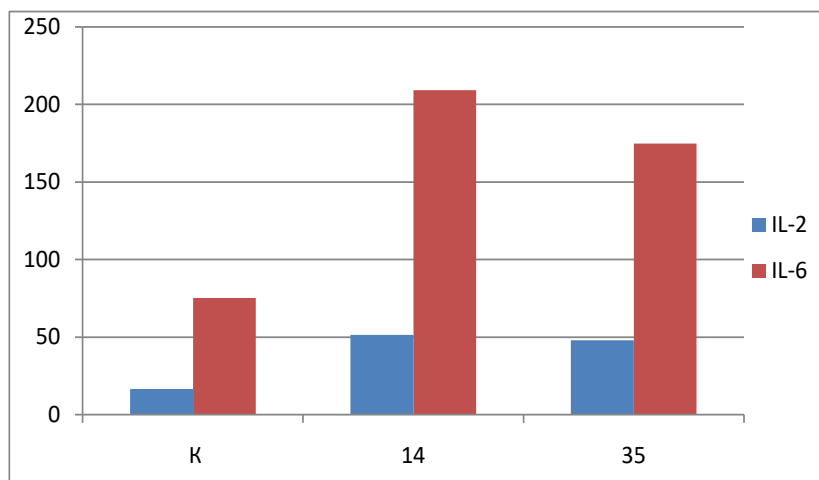


Рис. 5. Динаміка вмісту прозапальних цитокінів у щурів із модельованим цирозом печінки на 14-у та 35-у добу від початку експерименту

Примітка: * - результати достовірні по відношенню до контролю ($p < 0,05$)

- — результати достовірні по відношенню до попередніх термінів

Ці дані дають уявлення щодо реакції прозапальної ланки системи цитокінів при цирозі, оскільки саме ІЛ-2 та ІЛ-6 беруть активну участь в регуляції процесів неоангіогенезу та утворення колагену фібробластами.

Рівень ІЛ-2 на 35-у добу експерименту перевищував значення контрольної групи на 62,3 %, та був на 21,8 % нижчим у порівнянні з попереднім терміном. Відомо, що збільшення в крові вмісту ІЛ-2 є характерним для запальних процесів травного тракту, але тривала дія патогенних чинників призводить до виснаження імунної відповіді, що ми й спостерігали в нашому дослідженні [14].

На 14-у добу експерименту спостерігалось збільшення рівня ІЛ-6 на 144 % у порівнянні з контрольною групою, але вже наприкінці експерименту його значення були менші на 24 % від значень попереднього терміну, та все ще перевищує значення контрольного показника на 86,2 % ($p < 0,05$).

ІЛ-6 має властивість стимулювання та регуляції імунної відповіді та процесів запалення. Також відомо, що у певних випадках він може чинити як про- так і протизапальний вплив [15]. Саме такою особливістю ІЛ-6 можна пояснити пригнічення його синтезу на 35-у добу експерименту – результат виснаження первинної імунної відповіді на гостре ураження.

Отримані внаслідок виконаного експерименту дані свідчать про наявність певних етапних змін та закономірностей перебігу циротичного ураження печінки. На першому етапі перебігу модельованого цирозу печінки виявлялися чисельні хибні часточки та вогнища некрозів, жирова та білкова дистрофія гепатоцитів, явища гіалінозу судин із яскраво вираженою лімфогістіоцитарною інфільтрацією. У крові експериментальних тварин у цей час спостерігалась картина активної імунної відповіді – значне підвищення рівнів прозапальних інтерлейкінів. У наступний термін при морфологічному дослідженні спостерігалась незначна інволюція процесу: помірне розростання сполучної тканини з порушенням часточкової структури печінки, вакуольна дистрофія гепатоцитів, діapedезні крововиливи. У той самий час імунна відповідь дещо пригнічувалась у порівнянні з попереднім терміном, що свідчить про певне виснаження адаптивних можливостей і подальшу хронізацію патологічного процесу.

Висновки. Перебіг експериментального цирозу печінки відзначається не тільки радикальною зміною будови органу, виникненням значних епітеліо-мезенхімальних перетворень, але й викликає значні зрушення в прозапальній ланці системи цитокінів, і ці процеси мають певну етапність перебігу.

Література

1. Rosen H.R. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection. / H.R. Rosen // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364, N 25. – P. 2429-2438.
2. Hernandez-Gea V. Pathogenesis of liver fibrosis / V. Hernandez-Gea, S.L. Friedman // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. - 2011. – Vol. 6. – P. 425-456.
3. Murphy F.R. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis / F. R. Murphy, R. Issa, X. Zhou [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 77. – P. 11069-11076.
4. Povero D. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process / D. Povero, C. Busletta, E. Novo [et al.] // Histol. Histopathol. – 2010. – Vol.25. – P. 1075-1091.
5. Струков А.И. Патологическая анатомия / А.И. Струков, В.В. Серов. - М : Медицина, 1995. – 389 с.
6. Underwood J.C.E. General and systematic pathology / J.C.E. Underwood, S.S. Cross. – NY : Elsevier Limited, 2009. – 857 p.
7. Geerts A. Sho-Saiko-To: The Right Blend of Traditional Oriental Medicine and Liver Cell Biology / A. Geerts, V. Rogiers // Hepatology. – 1999. – Vol. 29, N 1. – P. 282-284.
8. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease / S. Klein, B. Mittendorfer, J. C. Eagon [et al.] // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 130. – P.1564-1572.
9. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro / A. Galli, D.W. Crabb, E. Ceni [et al.] // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 122. – P. 1924-1940.
10. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo / S.D. Minics, E. Seki, H. Uchinami [et al.] // Gastroenterology. – 2007. – Vol. 132. – P.1937–1946.
11. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair / J.S. Duffield, S.J. Forbes, C.M. Constandinou [et al.] // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 115. – P. 56-65.
12. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats / C. Liu, Q. Tao, M. Sun [et al.] // Lab. Invest. – 2010. – Vol. 90. – P. 1805-1816.

13. Методики морфологічних досліджень / М.М. Багрій, В.А. Діброва, О.Г. Попадинець, М.І. Гришук. – Вінниця : Нова Книга, 2016. – 328 с.
14. Царегородцева Т.М. Цитокины в гастроэнтерологии / Т.М. Царегородцева. – М : Анахарсис, 2003. – 96 с.
15. Хаитов Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. – М : Медицина, 2000. – 432 с.

References

1. Rosen H.R. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection. / H.R. Rosen // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364, N 25. – P. 2429-2438.
2. Hernandez-Gea V. Pathogenesis of liver fibrosis / V. Hernandez-Gea, S.L. Friedman // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. - 2011. – Vol. 6. – P. 425-456.
3. Murphy F.R. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis / F. R. Murphy, R. Issa, X. Zhou [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 77. – P. 11069-11076.
4. Povero D. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process / D. Povero, C. Busletta, E. Novo [et al.] // Histol. Histopathol. – 2010. – Vol.25. – P. 1075-1091.
5. Strukov A.I. Pathological Anatomy / A.I. Strukov, V.V. Serov. - М : Medicine, 1995. – 389 p. (In Russian).
6. Underwood J.C.E. General and systematic pathology / J.C.E. Underwood, S.S. Cross. – NY : Elsevier Limited, 2009. – 857 p.
7. Geerts A. Sho-Saiko-To: The Right Blend of Traditional Oriental Medicine and Liver Cell Biology / A. Geerts, V. Rogiers // Hepatology. – 1999. – Vol. 29, N 1. – P. 282-284.
8. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease / S. Klein, B. Mittendorfer, J. C. Eagon [et al.] // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 130. – P.1564-1572.
9. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro / A. Galli, D.W. Crabb, E. Ceni [et al.] // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 122. – P. 1924-1940.
10. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo / S.D. Minics, E. Seki, H. Uchinami [et al.] // Gastroenterology. – 2007. – Vol. 132. – P.1937–1946.

11. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair / J.S. Duffield, S.J. Forbes, C.M. Constandinou [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 56-65.
12. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats / C. Liu, Q. Tao, M. Sun [et al.] // *Lab. Invest.* – 2010. – Vol. 90. – P. 1805-1816.
13. Methodology morphological studies / M.M. Bagriy, V.A. Dibrova, O.G. Popadinets, M.I. Grishchuk. – Vinnytsia : Nova Knyha, 2016. – 328 p. (In Ukrainian).
14. Tsaregorodseva T.M. Cytokines in gastroenterology / T.M. Tsaregorodseva. – M : Anacharsis, 2003. – 96 p. (In Russian).
15. Khaitov R.M. Immunology / R.M. Khaitov, G.A. Ignatieva, I.G. Sidorovich. – M : Medicine, 2000. – 432 p. (In Russian).