

Х.П. Монголов, А.Н. Плеханов

ВЗАИМОСВЯЗЬ АПОПТОЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**ГП РБ «Бурят-Фармация» (Улан-Удэ)
Бурятский филиал НЦРВХ СО РАМН (Улан-Удэ)**

В статье указаны механизмы взаимодействия регенераторных и апоптотических процессов печеночных клеток при недостаточности печени у экспериментальных животных. Доказано, что апоптоз, происходящий после резекции печени, является одним из механизмов гибели гепатоцитов при развитии печеночной недостаточности.

Ключевые слова: печень, апоптоз, регенерация, эксперимент

INTERRELATION OF APOPTOSIS AND HEPATIC REGENERATION AT HEPATIC INSUFFICIENCY AFTER PARTIAL HEPATECTOMY IN EXPERIMENT**H.P. Mongolov, A.N. Plekhanov****GP RB «Buryat-Pharmacy» (Ulan-Ude)
Buryat Branch SCRRS SB RAMS (Ulan-Ude)**

The article specifies the mechanism of interaction of regenerative and apoptosis processes of hepatic cells at hepatic insufficiency in experimental animals. It is proved, that apoptosis, occurring after resection of a liver, is one of mechanisms of destruction of hepatocytes at development of hepatic insufficiency.

Key words: liver, apoptosis, regeneration, experiment

Одним из свойств печени является ее способность регулировать свой собственный размер и рост [1, 3, 4]. Это свойство вытекает из основной роли печени в метаболической регуляции. Для реализации этих функций ткань печени отвечает на воздействие извне организма и на сигналы, и на метаболические команды, переданные посредством гормонов, цитокинов, факторов роста и нервной регуляции [5, 6].

Функциональный дефицит, обусловленный уменьшением количества ткани печени или гибелью клеток, вызывает пролиферативные процессы, которые в конечном счете приводят к восстановлению печеночных функций и архитектоники [2]. Это достигается только в условиях тонкой координации среди гепатоцитов, различных типов непаренхиматозных клеток и компонентов внеклеточного матрикса. Вместе эти элементы составляют то, что было названо Roijkind и Greenwell микроэкологией печени.

В эксперименте и клинике печень отвечает как на недостаточность, так и на избыточность ее объема. Свидетельством тому служит тот факт, что печень, пересаженная реципиенту в малом объеме, регенерирует, достигая оптимального для данного индивидуума объема [7]. Избыточное количество ткани печени вызывает адаптацию массы и функции органа. Печень, имеющая избыточный для реципиента объем, не будет увеличиваться и может даже уменьшиться в размерах вследствие апоптоза гепатоцитов.

Термин «апоптоз» (*apoptosis*) в переносном смысле означает «падение листьев». Это процесс, в результате которого поврежденные или старею-

щие клетки умирают [25]. Апоптоз был известен еще в прошлых десятилетиях, но его истинная значимость в физиологии и патологии человека стала широко признана только в последние годы [12].

Целью исследования явилось изучение патогенетических особенностей регенерации и апоптоза печени после ее обширной резекции в условиях печеночной недостаточности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 223 крысах самцов породы «Вистар» с массой животных 200 – 250 г. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующего нормативам ГОСТа. Острую печеночную недостаточность индуцировали резекцией печени в объеме 70 – 90 %.

Исследовали морфоструктуру печени с помощью световой микроскопии и иммуноморфологического исследования. Для исследования пролиферативной активности использовали готовое к применению моноклональное антитело Ki 67, клон MM1 (Novocastra Laboratories Ltd.). Для исследования апоптоза – поликлональное антитело Anti-Bax (BD Biosciences) в разведении 1 : 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При гистологическом исследовании структуры печени отмечали повреждения гепатоцитов: участки дискомплексации балочных структур и очаги некрозов. На 2 сутки определялись фокальные некрозы (гибель отдельных групп гепатоцитов внутри долек). На 5 – 11 сутки потеря клеточных элементов прогрессировала за счет присоедине-

ния ступенчатых некрозов (гибели гепатоцитов вокруг порталных трактов). В ходе эксперимента отмечались дистрофии гепатоцитов, расстройства кровообращения в виде кровенаполнения, как порталных трактов, так и собирательных вен.

Во все сроки на светооптическом уровне четко определялись апоптотические тельца. Были установлены признаки ишемического некроза гепатоцитов по линии резекции, полнокровие синусоидов. Наиболее выраженные изменения происходили при резекции 90 % объема печени.

Процесс апоптоза имеет свои характерные морфологические особенности. Так, клетки, подвергающиеся апоптозу, сокращаются и отсоединяются от общего пула клеток. При этом хроматин уплотняется вокруг мембраны ядра. В конечном счете, клетка распадается, формируются многократные мембранносвязанные апоптотические тела, которые быстро фагоцитируются [3].

Поскольку в основе апоптоза лежит физиологический механизм, который способствует «взаимозамене» клетки, некоторая часть клеток в печени постоянно подвергается этому процессу [3]. Его особенностью является то, что он редко верифицируется при обычных гистологических исследованиях. Так, эпителиальные клетки желчи редко визуализируются из-за их небольшого размера [21]. Ранее считалось, что любая гибель печеночной клетки — это некроз, но теперь очевидно ясно, что к гибели печеночной клетки приводит и другой патофизиологический процесс — апоптоз [17]. Основным морфологическим отличием некроза от апоптоза является то, что при некрозе разрушается мембрана ядра, а при апоптозе целостность мембраны сохраняется. Таким образом, повышение в сыворотке крови аминотрансфераз, как одного из факторов повреждения печени может отражать усиление апоптоза, так же как и некроза в печени.

Для верификации апоптоза в печени существует ряд методов. Самый простой из них заключается в подсчете апоптотических тел при морфологическом исследовании с окраской гематоксилином и эозином [21]. При этом эти тела находятся несколько обособленно от соседних клеток. Хотя их обнаружение утомительно, субъективно и трудоемко, выявление апоптотических тел таким методом остается допустимым для идентификации апоптоза в тканях [2].

Значимость этого сложного процесса при болезнях печени достаточно существенна. Так, ускоренный апоптоз может закончиться гибелью гепатоцитов, что приводит к нарушению функции печеночной ткани и ее атрофии. Принимая во внимание тот факт, что торможение апоптоза, стимулируют онкогены,

большинство болезней печени характеризуются чрезмерным торможением апоптоза [23].

Понимание роли апоптоза в патофизиологии болезней печени очень важно для клинициста. Так ускоренный апоптоз отмечается при алкогольном и вирусном гепатите (например, гепатит В, С и дельта), холестазах (например, первичный билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит), аутоиммунных заболеваниях (например, аутоиммунный гепатит), при использовании наркотиков и отравлениях токсинами, а также метаболических нарушениях (болезнь Вильсона-Коновалова) и гипоксии. Торможение апоптоза наблюдается при гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке.

Параллельно с гибелью гепатоцитов происходила регенерация печеночной паренхимы. При этом отмечалось увеличение массы печени к 11 суткам эксперимента, однако достоверных различий нами не отмечено. Более выраженные изменения были отмечены в изменении массы селезенки в ходе эксперимента. К 11 суткам ее вес увеличивался на 107 % по сравнению с исходной на 2 сутки. Имелись достоверные различия в приросте ее массы по суткам эксперимента.

Митотическая активность ядер гепатоцитов изменялась в различные сутки эксперимента. Митотическая активность ядер гепатоцитов изменялась в различные сутки эксперимента. В таблице 1 представлено количество митозов на 100 клеток в ходе эксперимента.

Митотическая активность достоверно увеличивалась между 2 сутками и 5 сутками после резекции печени. Митотический индекс на 2 сутки составил $0,375 \pm 0,085$ (ДИ $0,103 - 0,646$) на 5 сутки — $0,825 \pm 0,025$ (ДИ $0,745 - 0,904$) ($p_F = 0,018_{1-3}$). Достоверные отличия митотического индекса были также отмечены между 3 и 5 сутками эксперимента. Так на 3 сутки МИ составил $0,625 \pm 0,025$ (ДИ $0,545 - 0,704$), что имело различия с 5 сутками после резекции печени ($p_F = 0,016_{2-3}$).

При выполнении иммуноморфологического исследования отмечен дисбаланс между пролиферативной активностью гепатоцитов и их апоптозом.

При световой микроскопии нами наблюдались апоптотические тельца (рис. 1). С целью определения выраженности апоптоза в ходе эксперимента нами проведено иммуноморфологическое исследование. При этом были использованы моноклональное антитело — проапоптотический фактор Вах (ингибитор bcl-2).

При подсчете клеток отмечен дисбаланс между пролиферативной активностью гепатоцитов и их апоптозом (табл. 2).

Таблица 1

Митотическая активность гепатоцитов в ходе эксперимента

Сутки эксперимента	Митотический индекс	Достоверность различий
2 сутки	$0,375 \pm 0,085$	$p_F = 0,06_{1-2}$
3 сутки	$0,625 \pm 0,025$	$p_F = 0,016_{2-3}$
5 сутки	$0,825 \pm 0,025$	$p_F = 0,018_{1-3}$

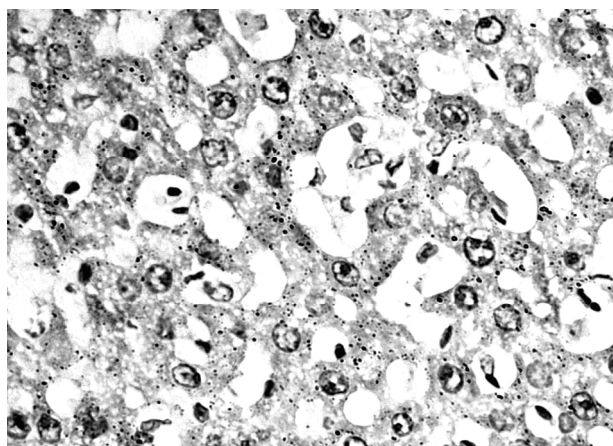


Рис. 1. Вах в цитоплазме гепатоцитов, $\times 630$. DAB с докраской гематоксилином.

Так, на 2 сутки Ki-67 составлял $26,5 \pm 2,5$ клетки (ДИ 18,4 – 34,5), на 5 сутки – $37,7 \pm 2,4$ клетки (ДИ 29,9 – 45,5). Различия показателя Ki-67 достоверны ($p_F = 0,02$). Кроме того, имелись достоверные различия этого показателя между 2, 5 сутками по отношению к норме ($p_F = 0,003$ и $p_F = 0,0004$ соответственно). Показатели Вах на 2 сутки составили $43,7 \pm 1,4$ клетки (ДИ 38,9 – 48,5) на 5-е $40,7 \pm 1,2$ (ДИ 36,7 – 44,7). Различия не статистически не достоверны ($p_F = 0,16$). Однако имелись достоверные различия этого показателя между 2, 5 сутками эксперимента по отношению к норме ($p_F = 0,00006$ и $p_F = 0,00008$ соответственно). После обширной резекции печени отмечалось прогрессивное увеличение пролиферативной активности гепатоцитов на 2 и 5 сутки эксперимента. Кроме того, резекция печени стимулирует проапоптотический фактор. На 2 сутки эксперимента апоптоз преобладал над пролиферацией ($p_F = 0,02$).

Аналогичные изменения были отмечены и на 5 сутки, однако пролиферативная активность на 5 сутки увеличивалась, а достоверные различия Вах между 2 и 5 сутками отсутствовали, в связи с чем различия соотношения Ki-67/Вах в эти сроки были недостоверны ($p_F = 0,3$).

Наиболее выраженным примером регенерации печени является модель ее вырастания после резекции [6, 7, 9, 10, 16]. Отмечено, что после 60–70 % резекции печени имеет место компенсаторная регенерация печени с образованием новых клеточных элементов путем митотического деления оставшихся [7]. То есть регенерация печени – это процесс компенсаторного роста, в котором

резецированная доля не вырастает, а происходит увеличение массы оставшейся доли как следствие пролиферации клеток.

Уровень пролиферативной активности гепатоцитов в определенной степени зависит от объема резекции: чем большая часть печени удалена во время операции, тем выше пролиферативный пул клеток. Однако хирургам-гепатологам хорошо известен тот предел резекции массы паренхимы печени, превышение которого приводит к необратимым изменениям функционального состояния органа и затем гибели организма. В условиях 80–95 % резекции массы печени наблюдается десинхронизация вступления клеток в митоз, а при удалении 90 % массы органа большая часть гепатоцитов оставшейся части печени уже неспособна синтезировать ДНК и делиться митозом [18].

Существующие факторы, регулирующие процесс регенерации, в настоящее время до конца остаются неясными. S.P. Tzung et al. (1997) доказали, что процесс апоптоза – это регулируемый процесс. На примере модели резекции печени они показали, что модуляция апоптоза очень важна в восстановлении как массы печени, так и ее функции [24]. Модуляция генов bcl-2, bcl-x, и Вах были идентифицированы в процессе регенерации [13]. При этом было отмечено, что проапоптотический фактор bcl-x и bcl-2 достигают максимума к 6 часам после резекции печени у экспериментальных животных, в то время как проапоптотический фактор Вах достигают максимума значительно позже [13]. Дальнейшие же исследования показали, что фактор некроза опухоли включенный в процесс регенерации печени, может задерживать апоптоз гепатоцитов с помощью определенных внутриклеточных связей [22].

Кроме того, индукция гена NF κ B может использоваться для предотвращения апоптоза, что и позволяет сохранить развитие печеночной клетки в процессе регенерации после резекции печени [11]. Таким образом, и быстрое увеличение печени, и апоптоз регулируются в процессе регенерации. Торможение же апоптоза способствует «переросту» ткани и усиленной регенерации в момент первичного ответа на повреждение, а его стимуляция позволяет удалить «лишние» клетки в ходе последующего процесса перемоделирования ткани.

Известно, что после 60–70 % резекции печени оставшаяся часть испытывает значительный энергетический недостаток, который сохраняется в течение 1-х суток. В дальнейшем происходит повышение энергетического статуса и приближение его

Таблица 2

Соотношение активности пролиферации и апоптоза

Сутки	Ki-67	Вах
2 сутки	$26,5 \pm 2,5$ клеток/1000*	$43,7 \pm 1,4$ клетки/1000
5 сутки	$37,7 \pm 2,4$ клетки/1000**	$40,7 \pm 1,2$ клеток/1000**
Норма	$6,5 \pm 0,6$ клеток/1000***	$10,0 \pm 0,9$ клеток/1000***

Примечание: * – p – достоверные различия между 2 и 5 сутками, *** – между 2 сутками и нормой, ** – между 5 сутками и нормой ($p_F < 0,05$).

к исходным величинам через 5–7 суток. Изменение энергетического состояния оставшейся части печени коррелирует во времени с митотической активностью гепатоцитов, которая отсутствует в первые сутки и проявляется на 2–3 сутки после операции [19]. После 80–85 % резекции печени отмечается удлинение периода между моментом операции и максимальной митотической активностью гепатоцитов [1].

Говоря об оценке регенеративной активности с современных позиций, следует иметь в виду критерии, обнаруживаемые при микроскопии, электронной микроскопии, автордиографии, гистохимических исследованиях.

Гомеостаз ткани печени зависит и от поддержания баланса между быстрым увеличением клетки и апоптозом. Разрушение гомеостатических механизмов равновесия между быстрым увеличением клетки и апоптозом может способствовать канцерогенному процессу [15]. В некоторых работах показано, что опухолевые клетки проявляются, как повышенной чувствительностью, так и сопротивлением процессу апоптоза, а эта изменчивость может стимулировать рост опухоли. Изменения регуляторов апоптоза, в частности гена Bcl-2 было отмечено как в гепатоцеллюлярном, так и холангиоцеллюлярном раке [5,8]. Многие из факторов, связанных с карциногенезом в печени, типа цитокинов, факторов роста, окиси азота также могут смоделировать апоптоз. Так, например, активация TGF-I-фактора приводит к апоптозу и дисрегуляции в печени в течение экспериментального гепатокарциногенеза [23]. Ряд химиотерапевтических препаратов, используемых в онкологической практике, могут стимулировать апоптоз в клетках опухоли. В этой связи терапевтические факторы, которые стимулируют апоптоз в злокачественных клетках, показали свою значимость в лечении рака печени.

Вирусный гепатит развивается в результате инфекционного поражения печени. Увеличенный апоптоз в печени пациентов с хроническим гепатитом В и С уже был описан в литературе [14]. Индукция апоптоза в инфицированных клетках может быть ведущим механизмом защиты, направленным на ограничение вирусного повреждения клеток печени и устранение инфицированных.

ВЫВОДЫ

Таким образом, апоптоз, происходящий после резекции печени, является одним из механизмов гибели гепатоцитов при развитии печеночной недостаточности. Сложные механизмы регенеративных процессов в печени, в результате которых она самостоятельно поддерживает баланс между стимуляторами и ингибиторами указывают на необходимость контроля и управления за происходящими в ней процессами, что позволит улучшить результаты хирургического лечения, особенно, при резекции обширных объемных образований печени.

Сведения об авторах:

Монголов Ханхай Пурбоевич – канд. фарм. наук, Генеральный директор ГП РБ «Бурят-Фармация». Тел. 8 (3012) 43-90-56.
Плеханов Александр Николаевич – д.м.н., профессор, главный хирург МЗ РБ, г. Улан-Удэ, Дом Правительства. Тел. 8 (3012) 21-49-20

ЛИТЕРАТУРА

1. Романова Л.К. Грушetskая О.О. // Материалы симпозиума: способы регенерации и клеточного деления. – М., 1979. – С. 54–58.
2. Ashkenazi A., Dixit V.M. // Science. – 1998. – Vol. 281. – P. 1305–1308.
3. Bursch W., Paffe S., Putz B. // Carcinogenesis. – 1990. – № 11. – P. 847–853.
4. Chari R.S., Baker M.E., Sue S.R. // Liver Transpl. Surg. – 1996. – Vol. 2. – № 3. – P. 233–234.
5. Charlotte F., L'Hermine A., Martin N. // Am. J. Pathol. – 1994. – Vol. 144. – P. 460–465.
6. Chen M.F., Hwang T.L., Hung C.F. // Ann. Surg. – 1991. – Vol. 213, N 3. – P. 227–229.
7. De Jong K.P., Brouwers M.A., Huls G.A., Dam A. // Anal. Quant Cytol. Histol. – 1998. – Vol. 20, N 1. – P. 59–68.
8. Harnois D.M., Que F.G., Celli A. // Hepatology. – 1997. – Vol. 26. – P. 884–890.
9. Hashimoto M., Kothary P.C., Eckhauser F.E. // Gastroenterol. Hepatol. – 1998. – Vol. 13. – N 12. – P. 1259–1265.
10. Jansen P.L., Chamuleau R.A., Van Leeuwen D.J. // Scand J. Gastroenterol. – 1990. – Vol. 25, N 2. – P. 112–118.
11. Jimuro Y., Nishiura T., Hellerbrand C. // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 101. – P. 802–811.
12. Kerr J.F. // J. Pathol. – 1971. – Vol. 105. – P. 13–20.
13. Kren B.T., Trembley J.H., Krajewski S. // Cell Growth Differ. – 1996. – N 7. – P. 1633–1642.
14. Lau J.Y., Xie X., Lai M.M. // Semin Liver Dis. – 1998. – Vol. 18. – P. 169–176.
15. Ledda-Columbano G.M., Coni P., Simbula G. // Environ Health Perspect. – 1993. – Vol. 101. – P. 163–168.
16. MacIntosh E.L., Gauthier T., Pettigrew N.M. // Hepatology. – 1993. – Vol. 17, N 2. – P. 307–309.
17. Patel T., Gores G.J. // Hepatology. – 1995. – Vol. 21. – P. 1725–1741.
18. Rabes H.M., Wirsching R., Tuzek H.V. // Cell Tissue Kinet. – 1979. – N 6. – P. 123–127.
19. Sato K., Tanaka M., Tanikawa K. // Hepatogastroenterology. – 1995. – Vol. 42, N 6. – P. 961–965.
20. Sato Y., Tsukada K., Hatakeyama K. // Surg. Today. – 1999. – Vol. 29, N 1. – P. 1–9.
21. Schulte-Hermann R., Bursch W., Kraupp-Gras B. // Environ Health Perspect. – 1993. – Vol. 101. – P. 87–90.
22. Takehara T., Hayashi N., Mita E. // Hepatology. – 1998. – Vol. 27. – P. 1643–1651.
23. Thorgeirsson S.S., Teramoto T., Factor V.M. // Semin. Liver Dis. – 1998. – Vol. 18. – P. 115–122.
24. Tzung S.P., Fausto N., Hockenbery D.M. // Am. J. Pathol. – 1997. – Vol. 105. – P. 1985–1995.
25. Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.H. // Int. Rev. Cytol. – 1980. – Vol. 68. – P. 251–306.