

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
УДК 616-091.8

Боташева Валентина Салиховна¹, Коготыжева Мадина Аслановна¹, Кубанова Альбина Борисовна¹, Эркенова Лариса Далхатовна¹

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ставрополь, Россия.

Автор, ответственный за переписку: Боташева Валентина Салиховна, Enver-V@list.ru

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТКАНИ ПЕЧЕНИ В ДИНАМИКЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ПЕРВИЧНОГО ГИПОТИРЕОЗА

Резюме. Получена экспериментальная модель первичного послеоперационного гипотиреоза на 92 белых крысах-самцах линии Вистар. Длительность эксперимента составила 60 суток. Животные выводились из эксперимента на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 45-е и 60-е сутки. Контрольную группу составили 23 крысы. Для проведения гистологического исследования отбирали кусочки печени с последующей фиксацией их в 10% забуференном нейтральном формалине. Приготовление микропрепаратов производили по стандартам. Окраску гистологических срезов проводили гематоксилином-эозином, толуидиновым синим, пикрофуксином по Ван Гизону, суданом-3. В основе иммуногистохимического исследования лежал пероксидазно-антипероксидазный метод с использованием маркера апоптоза каспазы-3 и антиапоптотического маркера Bcl-2, а также маркера пролиферативной клеточной активности Ki67. Гистологически в печени при послеоперационном гипотиреозе возникает венозная гиперемия, явления стаза с последующим сладжированием эритроцитов, диффузный отек. Для печеночных клеток характерна картина преобладающей гидropической, баллонной дистрофии, а также мелкокапельной жировой дистрофии. Характерны очаги цитолиза, фокусы колликативного некроза гепатоцитов. Появляются признаки минимально активного стеатогепатита. Повсеместно встречаются очаги регенерации, увеличивается число гепатоцитов с гиперхромными увеличенными ядрами. Отмечаются репаративные процессы. К концу опыта появляются участки пролиферации фибробластов, первые признаки формирования соединительнотканых септ, окрашиваемых в ярко красный цвет пикрофуксином по Ван Гизону. Иммуногистохимический метод выявил повышение позитивной экспрессии каспазы-3 на 21-28 сутки эксперимента и снижение экспрессии Bcl-2 начиная с 21 суток, увеличение индекса пролиферативной активности по данным экспрессии Ki67 на 28 сутки, с началом ее снижения к концу 45-х суток опыта.

Ключевые слова: гипотиреоз, печень, дистрофия, некроз, фиброз, гепатит.

Valentina S. Botasheva¹, Madina A. Kogotyzheva¹, Albina B. Kubanova¹, Larisa D. Erkenova¹

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Stavropol State Medical University" of the Ministry of Health of Russia, Stavropol, Russia Corresponding author: Botasheva Valentina Salikhovna, Enver-V@list.ru

PATHOMORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LIVER TISSUE IN DYNAMICS IN EXPERIMENTAL MODELING OF PRIMARY HYPOTHYROIDISM

Summary. An experimental model of primary postoperative hypothyroidism was obtained on 92 white Wistar male rats. The duration of the experiment was 60 days. Animals were withdrawn from the experiment on the 7th, 14th, 21st, 28th, 35th, 45th and 60th days. The control group consisted of 23 rats. For histological examination, pieces of the liver were taken, followed by their fixation in 10% buffered neutral formalin. Micropreparations were prepared according to recognized standards. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin, toluidine blue, picrofuchsin according to Van Gieson, Sudan-3. The immunohistochemical study was based on the peroxidase-antiperoxidase method using the apoptosis marker caspase-3 and the anti-apoptotic marker Bcl-2, as well as the marker of proliferative cell activity Ki67. Histologically, in the liver with postoperative hypothyroidism, there is venous hyperemia, stasis phenomena, followed by erythrocyte slugging, and diffuse edema. Hepatic cells are characterized by a pattern of predominant hydropic, balloon degeneration, as well as small droplet fatty degeneration. Characterized by foci of cytolysis, foci of colliquational necrosis of hepatocytes. There are signs of minimally active steatohepatitis. Foci of regeneration are found everywhere, the number of

hepatocytes with hyperchromic enlarged nuclei increases. Reparative processes are noted. By the end of the experiment, areas of fibroblast proliferation appear, the first signs of the formation of connective tissue septa, stained bright red with picrofuchsin according to Van Gieson. The immunohistochemical method revealed an increase in the positive expression of caspase-3 on the 21-28th day of the experiment and a decrease in the expression of Bcl-2 starting from the 21st day, an increase in the index of proliferative activity according to the expression of Ki67 on the 28th day, with the beginning of its decrease by the end of the 45th day of the experiment.

Key words: *hypothyroidism, liver, dystrophy, necrosis, fibrosis, hepatitis.*

Актуальность темы. Гормональная функция щитовидной железы жизненно необходима для поддержания гомеостаза всего организма. Следует отметить, что патология эндокринной системы занимает далеко не последнее место в статистике. Особенно актуально это для проблемы снижения функции щитовидной железы.

Гипотиреоз как синдром, носящий своего рода генерализованный характер в связи с теми последствиями для многих органов и систем, которые она вызывает, может скрываться под маской различных клинических проявлений и поражать в том числе органы гепатобилиарной системы. Ряд авторов отмечает влияние гипотиреоза на строение и функцию печени, формирование гепатомегалии, секрецию желчи, развитие дискинезии желчевыводящих путей и холестатической желтухи вследствие снижения экскреции билирубина и желчи [4,5]. По ряду литературных данных существует взаимосвязь развития неалкогольной жировой болезни печени со снижением функции щитовидной железы, но что именно первично в сложных патогенетических механизмах их взаимодействия является и в современном мире вопросом достаточно открытым и обсуждаемым. Это в свою очередь нацеливает и подталкивает к более детальному изучению данной проблемы, в том числе с точки зрения и патоморфологических изменений в органах гепатобилиарной системы, в частности, ткани печени. Эти сведения в последующем лягут в основу создания и разработки более детальных, перспективных методов исследования и созданию новых линий терапии патологии печени, связанных с поражением органов эндокринной системы.

Цель исследования: изучить патоморфологические и иммуногистохимические изменения в ткани печени в динамике при экспериментально смоделированном первичном гипотиреозе.

Материал и методы исследования. Эксперимент проводился на 92 отобранных половозрелых лабораторных животных (крысах-самцах линии Вистар) с массой от 250 до 300 грамм. Методом получения гипотиреоза явилась тотальная тиреоидэктомия с учетом рекомендаций Европейской конвенции по защите позво-

ночных животных. Непосредственному хирургическому вмешательству предшествовала так называемая премедикация с использованием препарата золител-100 в расчете 1,5 мг на 100 гр массы тела, в качестве миорелаксанта был выбран ксилазин гидрохлорид (3 мг на 1 кг массы тела). После предварительной обработки операционного поля производили послойный разрез мягких тканей в проекции срединной линии кожи шеи до трахеи, обнажали щитовидную железу и удаляли ее единым блоком. В дальнейшем проводили гемостатические мероприятия и ушивание раневого дефекта, обработку его краев метиленовым синим. На 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 45-е и 60-е сутки крыс выводили из эксперимента. Проводили морфометрические измерения ткани печени животных с измерением размеров в трех проекциях, определением массы органа, оценкой состояния капсулы органа, его консистенции, цвета, структуры на разрезе. В дальнейшем тканевые образцы печени помещались в забуференный 10% формалин на 10 суток, по истечению которых кусочки печени подвергали проводке через спирты, заливали в парафиновые блоки, готовили гистологические микропрепараты. Для окраски использовали следующие красители: гематоксилин-эозин, пикрофуксин по Ван Гизону, толуидиновый синий, судан-3, использовали ШИК-реакцию по Шабадашу. Иммуногистохимическое исследование проводили с целью изучения изменений пролиферативной клеточной активности на фоне процессов запрограммированной клеточной гибели и применяли при этом маркеры Ki 67, каспаза-3, Bcl-2, в том числе с использованием положительных и отрицательных контролей. Статистический анализ проводили с применением программ Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США), Statistica 6.0 (Statsoft Inc, США), использованием рангового однофакторного дисперсионного анализа Краснела-Уоллича, апостериорных критериев. Статистически значимыми изменениями считали те изменения, при которых $p < 0,05$.

Результаты исследования. В ходе эксперимента отмечались следующие морфометрические изменения ткани печени, представленные в таблице №1.

Таблица 1
Морфометрические показатели печени крыс при экспериментальном гипотиреозе в динамике

| Параметры | Сроки наблюдения в сутках | | | | | | | |
|-----------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | Контроль | 7-е | 14-е | 21-е | 28-е | 35-е | 45-е | 60-е |
| Масса | 5,4±0,31 | 5,3± 0,1 | 5,5±0,2 | 5,8±0,45 | 7,38± 0,02* | 8,48± 0,03* | 9,65±0,04* | 10,85± 0,02* |
| Длина | 4,1± 0,3 | 4,82±0,23 | 5,14±0,28 | 5,86±0,1 | 6,32± 0,04* | 6,83± 0,03 | 7,31± 0,01 | 7,82± 0,02 |
| Ширина | 2,52±0,23 | 2,75±0,26 | 3,09±0,2 | 3,25±0,08 | 3,12± 0,02* | 3,51± 0,03* | 3,7± 0,02* | 3,7± 0,01* |
| Толщина | 0,31±0,24 | 0,32±0,04 | 0,43±0,04 | 0,5±0,03 | 0,45± 0,02* | 0,62± 0,03* | 0,74± 0,02* | 0,74± 0,01* |

Примечание: статистическая значимость различий с контрольным материалом обозначена* - $p < 0,05$

При оценке полученных показателей было обнаружено, что масса печени крыс статистически значимо увеличилась к концу 60-х суток и достигала 10,85 г в сравнении с нормой — 5,4 г. Достоверно значимое увеличение длины печени наблюдалось на 28-е сутки, к концу же эксперимента печень достигла 7,82 см при норме 4,1 см. Аналогичного вида изменения произошли с такими параметрами, как толщина и ширина печени, которые к 60-м суткам составили 0,74 см и 3,7 см соответственно.

На 7-е сутки эксперимента основные гистологические изменения связаны с сосудистыми нарушениями, которые были представлены полнокровием центральных вен с явлениями эритростаза, картиной сладжирования эритроцитов, появлялись первые фокусы перивенулярного отека. Большая часть гепатоцитов в дольках имела классическое строение, дисконфлексии клеток в этот период не наблюдалось. Характерная дольковая структура органа сохранена. Встречались лишь единичные двуядерные гепатоциты.

К концу 14-х суток в связи с сохранением сосудистых нарушений отмечалось усиление отека с вовлечением централобулярных зон, с первыми очагами так называемого разволокнения периваскулярной ткани, без признаков метахромазии при окраске толуидиновым синим. Среди дистрофических изменений гепатоцитов можно выделить 2 основных вида белковой дистрофии - баллонная и гидропическая. Дистрофические изменения затрагивали группы гепатоцитов большинства перипортальных зон.

К 21-м суткам прогрессирующие местные гемодинамические нарушения способствуют диффузному распространению отечной жидкости с захватом перипортальной зоны. Конфигурация балок нарушается, они приобретают извитую форму за счет различного размера сдавленных гепатоцитов. Белковые дистрофические изменения последних усиливаются, появляются гепатоциты с баллонизацией цитопазмы, с кариопикнозом ядер. Эти изменения затрагивают преимущественно 2/3 зоны ацинусов. Среди гепатоцитов с баллонной дистрофией встречаются отдельные клетки с перинуклеарными отложениям

мелких капель липидов, которые окрашиваются суданом-3 в желтовато-оранжевый цвет. При иммуногистохимическом исследовании в этот период впервые было установлено повышение позитивной экспрессии каспазы-3, наряду со снижением экспрессии Bcl-2.

На 35-е сутки эксперимента определяются участки выраженного разволокнения соединительного каркаса печени с очагами деструкции коллагеновых волокон. Белковая и жировая дистрофия в виде гидропической и мелкокапельной жировой обнаруживается в большинстве гепатоцитов всех зон печеночных долек. Встречаются мелкие скопления лимфоцитов перипортально, одиночные лимфоциты - в перисинусоидальном пространстве.

К концу 45 суток дистрофические изменения усиливаются, развивается баллонная дистрофия гепатоцитов с распадом ядер и развитием колликвационного некроза. Жировые мелкокапельные цитоплазматические отложения встречаются в ряде гепатоцитов периферальной зоны, отек усиливается, появляются полости. Инфильтрация лимфоцитами, меньшим числом плазматических клеток встречается в виде мелких инфильтратов по всей поверхности среза.

На 60-е сутки в тканевых образцах печени обнаружены выраженные распространенные белково-жировые обменно-дистрофические, некротические изменения, затрагивающие большую часть экспериментального материала. Чаще встречаются постнекротические полостные структуры, окружающие их печеночные балки дезорганизованы, приобретают фестончатого типа очертания. Пролиферирующие сохраненные гепатоциты встречаются по всей поверхности препарата вокруг некротически измененных фокусов паренхимы. Сохраняется выраженная лобулярная и портальная инфильтрация лимфоцитами, плазматическими клетками. За счет усиления деления фибробластических клеток визуализируются очаги периферального, перисинусоидального фиброза.

Выводы. Анализ полученных экспериментальных результатов выявил, что при первичном гипотиреозе, связанном с хирургическим удалением ткани щитовидной железы, морфометрические изменения характеризовались увеличением веса и разме-

ров печени. В печени крыс преобладали полнокровие, генерализованный отек, белковая гидропическая дистрофии, жировая дистрофия, кариорексис и цитолиз гепатоцитов с чередованием фокусов их пролиферации. Наблюдалась воспалительная клеточная инфильтрация, структурная перестройка и начальные признаки фиброза органа. Данные изменения коррелируют с иммуногистохимическими показателями: отмечалось повышение экспрессии маркера каспазы-3 и снижение экспрессии маркера Bcl-2, что отображает состояние функционирования процессов запрограммированной клеточной гибели наряду с работой системы, предотвращающей апоптотические изменения в ткани печени. Это подтвердилось также изменением индекса пролиферативной клеточной активности.

Список источников

1. Боташева В.С., Коготыжева М.А., Кубанова А.Б. Анализ патогистологических, гистохимических, иммуногистохимических изменений в печени крыс в динамике при экспериментально воспроизведенной модели первичного гипотиреоза // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2021. №4. С. 12-15.
2. Коровкина Е.В., Ахмадуллина Г.И., Шкляев А.Е. Патогенетические аспекты комплексной терапии первичного гипотиреоза и сопутствующей неалкогольной жировой болезни печени // Медицинский альманах. 2018. №6 (57). С. 148-152.
3. Суслина А.А. Состояние печени и липидного обмена при сочетании сахарного диабета 2-го типа с гипотиреозом // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016. №3 (127). С. 67.
4. Эрkenова Л.Д., Мозеров С.А., Долгашова М.А. Патоморфологические изменения в печени при экспериментальном гипотиреозе // Волгоградский

научно-медицинский журнал. 2020. №1. С. 31-35.

5. Prisyazhnyuk V.P., Voloshyn O.I., Pashkovska N.V. Peculiarities of biochemical blood parameters and cytokine profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease depending on the form of hypothyroidism // Международный эндокринологический журнал. 2017. №3. С. 115-120.

References

1. Botasheva V.S., Kogotyzheva M.A., Kubanova A.B. Analysis of histological, histochemical, immunohistochemical changes in rat liver in dynamics with an experimentally reproduced model of primary hypothyroidism // Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Volgograd scientific medical journal. 2021. No. 4. pp. 12-15.
2. Korovkina E.V., Akhmadullina G.I., Shklyayev A.E. Pathogenetic aspects of complex therapy of primary hypothyroidism and concomitant non-alcoholic fatty liver disease // Meditsinskiy al'manakh = Medical almanac. 2018. No.6 (57). pp. 148-152.
3. Suslina A.A. The state of the liver and lipid metabolism in the combination of type 2 diabetes mellitus with hypothyroidism // Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and clinical gastroenterology. 2016. No.3 (127). p. 67.
4. Erkenova L.D., Mozerov S.A., Dolgashova M.A. Pathomorphological changes in the liver in experimental hypothyroidism // Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Volgograd scientific journal. 2020. No. 1. pp. 31-35.
5. Prisyazhnyuk V.P., Voloshin O.I., Pashkovskaya N.V. Features of biochemical parameters of blood and cytokine profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease depending on the form of hypothyroidism // International Endocrinological Journal. 2017. No. 3. pp. 115-120.

Информация об авторах

В.С. Боташева – доктор медицинских наук, профессор;
М.А. Коготыжева – аспирант кафедры патологической анатомии;
А.Б. Кубанова – кандидат медицинских наук;
Л.Д. Эрkenова – кандидат медицинских наук.

Статья поступила в редакцию 28.04.2022;
 одобрена после рецензирования 19.07.2022;
 принята к публикации 28.07.2022.

Information about the authors

Valentina S. Botasheva – Grand PhD in Medical sciences, Professor;
Madina A. Kogotyzheva – PhD student;
Albina B. Kubanova – PhD in Medical sciences;
Larisa D. Erkenova – PhD in Medical sciences.

The article was submitted on 28.04.2022;
 approved after reviewing 19.07.2022;
 accepted for publication 28.07.2022.