

УДК 616.36-092.9:615.212

## ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ПАРАЦЕТАМОЛОМ

Р.И. Кравчук, к.б.н.; М.В. Горелдая, к.б.н.;

М.И. Бушма, проф., д.м.н.; В.М. Шейбак, д.м.н.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Электронно-микроскопическое исследование показало, что парацетамол, вводимый в дозе 750 мг/кг в течение 5 дней животным, вызывает деструктивные изменения печени. В ответ на воздействие парацетамола в ткани печени активируются биосинтетические и репаративные процессы, более выраженные в перипортальной и интермедиальной зонах долек печени. В гепатоцитах центролобулярной зоны наряду с активацией биосинтеза белка отмечено усиление процессов, связанных с детоксикацией и формированием вторичных образований.*

**Ключевые слова:** парацетамол, печень, гепатоцит, ультраструктура

*Electron microscopic investigation has shown that paracetamol (750 mg/kg per day, during 5 days) induces the destructive changes in rat liver. In response to hepatotoxin, the biosynthetic and repairing processes are activated in hepatic tissue, mostly marked in the periportal and intermedial zones of hepatic lobes. In the hepatocytes of the centrolobular zone the enhanced processes of detoxication and tissue remodelling are observed in addition to the more active biosynthesis.*

**Key words:** paracetamol, liver, hepatocyte, ultrastructure

### Введение

Благодаря тесной связи с желудочно-кишечным трактом и насыщенности метаболическими путями, печень является основным органом-мишенью лекарственных средств. После метаболических превращений в органе некоторые из них становятся токсичными. Так, парацетамол превращается в гепатотоксичный N-ацетил-p-бензохинонимин ферментами микросомального окисления [4]. Несмотря на это, он до сих пор широко используется в клинической практике. У человека тяжелое поражение печени развивается в случае приема парацетамола в дозах от 10 до 30 г. Это соответствует, в среднем, дозам 150-500 мг/кг массы тела [4,5]. У 8-10% больных после интоксикации парацетамолом развивается тяжелая форма печеночной недостаточности. У 1% интоксикация протекает молниеносно и заканчивается летальным исходом. Хроническое поражение печени развивается при ежедневном приеме парацетамола в течение от 3 недель до 1 года в дозах 3-5 г/сутки. Вышеизложенные факты свидетельствуют об актуальности проведения многоплановых исследований по выявлению токсических механизмов развития гепатотоксического действия парацетамола, а также поиску путей и средств защиты от его неблагоприятного действия на печень.

Целью работы явилось определение изменений ультраструктуры печени крыс после интоксикации парацетамолом.

### Материалы и методы

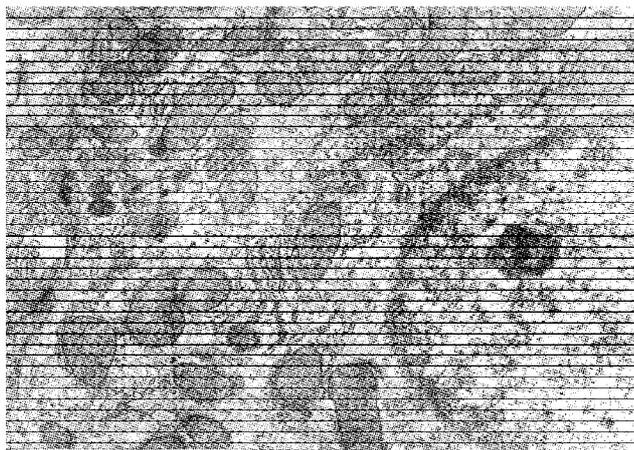
Эксперименты выполнены на 20 белых крысах-самках породы Вистар массой 170-200 г. Парацетамол вводили в желудок в виде взвеси в слизи крахмала 1 раз в день ежедневно в течение 5 дней в дозе 750 мг/кг массы тела. Через 24 ч после

последнего введения животных декапитировали.

Электронно-микроскопическое изучение проводили в образцах печени от трех особей из каждой экспериментальной группы животных, фиксированных 1% раствором четырехоксида осмия на 0.1 М буфере Миллонига, pH 7.4 при +4°C в течение 2 часов [6]. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в смесь эпон – аралдит. Из полученных блоков на ультрамикротоме MT-7000 ULTRA (USA) готовили полутонкие срезы, которые окрашивали метиленовым синим. Препараты просматривали в световом микроскопе и выбирали участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений (для соблюдения стандартности при окончательной заточке образца печени отбирали однотипные участки печеночной дольки). Затем изготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали 2% раствором уранилацетата на 50% метаноле [8] и цитратом свинца по E.S. Reynolds [7]. Препараты изучали в электронных микроскопах ПЭМ-100 (Украина) и JEM-100 CX (Япония) при увеличениях X 7000 – 24000.

### Результаты и обсуждение

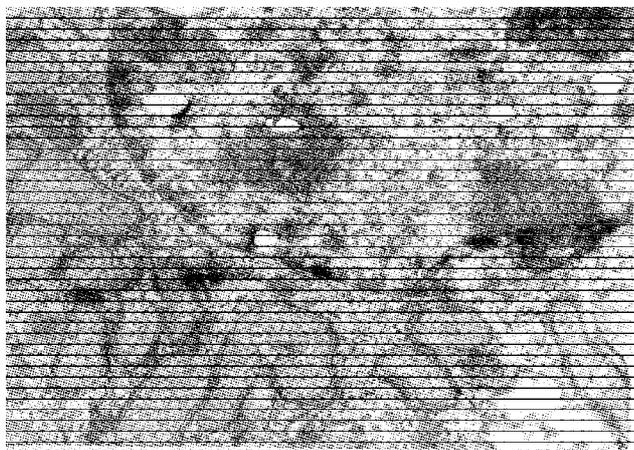
Печень животных контрольной группы характеризовалась нормопластическим вариантом строения (рис. 1). Ядра гепатоцитов преимущественно овальной формы, с мелкозернистым хроматином, неравномерно распределенным в кариоплазме, компактным ядрышком, занимающим либо центральное, либо эксцентричное положение в ядре. В цитоплазме гепатоцитов регистрировалось умеренное число митохондрий, имеющих преимущественно овальную форму, матрикс средней электронной плотности и немногочисленные кристы. Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС) уме-



*Рис.1. Контроль. Фрагмент ядра и цитоплазмы гепатоцита. Ув. 36000*

ренно развита, с цистернами которой ассоциировались многочисленные рибосомы. Между цистернами ГрЭС выявлялись свободные рибосомы и полисомы, а также аморфное содержимое умеренной электронной плотности. Обнаруживались единичные первичные лизосомы и мелкие липидные включения. Желчные капилляры имели типичное строение.

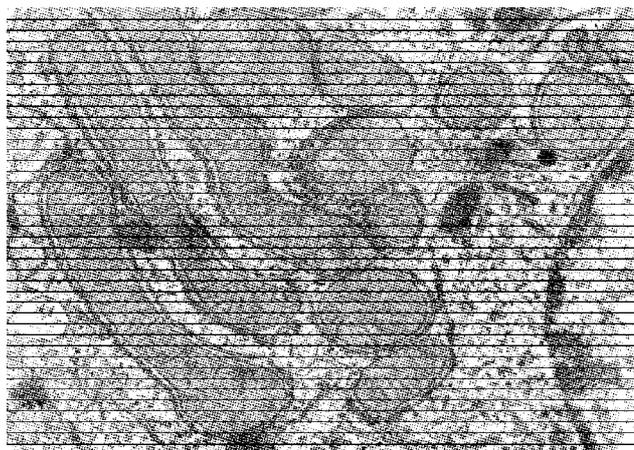
В гепатоцитах всех зон долек печени животных опытной группы, которым вводили парацетамол, наблюдалось усиление активности ядерного аппарата, морфологическим подтверждением которого являлось увеличение размеров ядер, а также размера и количества ядрышек, часто тесно контактирующих с кариолеммой и содержащих преимущественно гранулярный компонент (рис. 2). В ядерной оболочке определялись широкие отчетливые поры. В цитоплазме гепатоцитов перипортальной и интермедиальной зон долек наблюдалась умеренно развитая гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), с цистернами которой ассоциировались многочисленные рибосомы. Обнаруживалось множество свободных рибосом. Это свидетельствует об усилении биосинтеза белка как для нужд своих клеток, так и на экспорт. На возрастание биосинтетической активности клетки указы-



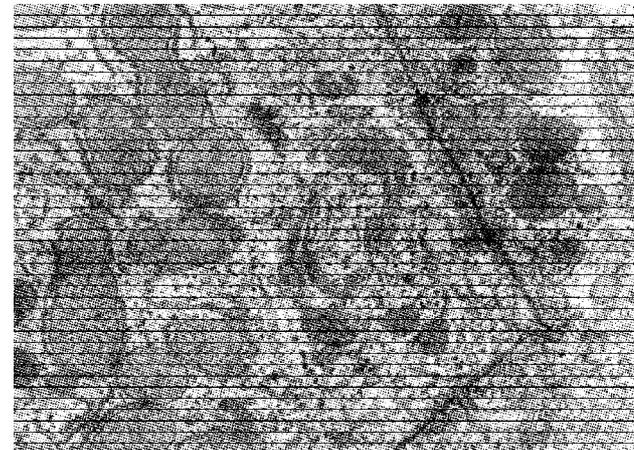
*Рис.2. Парацетамол. Крупные ядрышки с преимущественно гранулярным компонентом и эксцентричным положением в ядре. Ув.36000*

вает также гиперплазия и гипертрофия митохондрий, многие из которых отличались удлинненной формой, большим числом крист, матриксом умеренной электронной плотности и тесной топографической связью с цистернами ГрЭС (рис. 3). Практически в каждом гепатоците выявлялись хорошо развитые компоненты комплекса Гольджи, при этом имела место транслокация комплекса из типичного окооядерного расположения в зону билиарного полюса (рис. 4). Во многих гепатоцитах регистрировались единичные мелкие липидные включения, отличавшиеся полигональной формой, и единичные первичные лизосомы. На васкулярном полюсе гепатоцитов наблюдались многочисленные удлиненные микроворсинки.

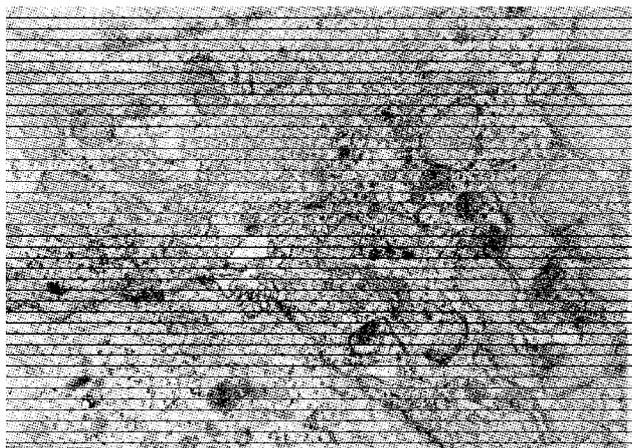
В центрлобулярной зоне дольки печени отчетливо прослеживалась гетерогенность гепатоцитов как по плотности цитоплазматического матрикса, так и по структуре и количеству органелл (рис. 5). Так, наряду с популяцией гепатоцитов с неизменной ультраструктурой и гепатоцитов, отличавшихся активацией биосинтетических процессов, обнаруживались гепатоциты с реактивными изменениями, что проявлялось в формировании различной величины гранул конденсированного хрома-



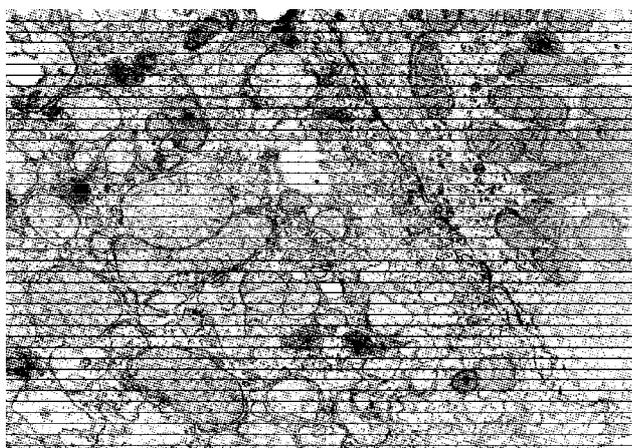
*Рис.3. Парацетамол. Гипертрофия и гиперплазия митохондрий, многочисленные кристы, тесная топографическая связь с ГрЭС. Ув. 360000*



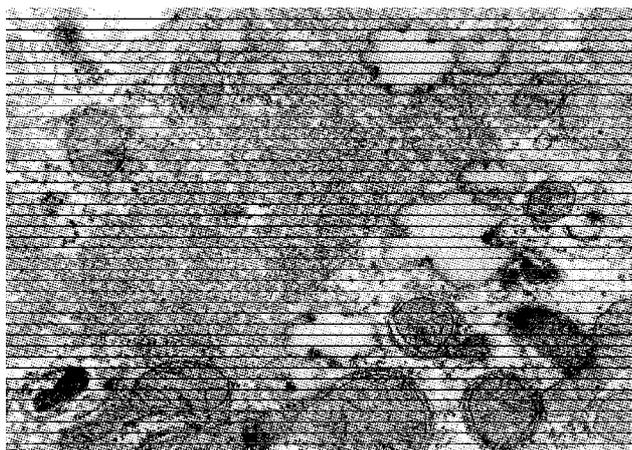
*Рис.4. Парацетамол. Компоненты комплекса Гольджи в зоне билиарного полюса гепатоцита. Ув. 360000*



**Рис.5. Парацетамол. Неравномерные изменения органелл в цитоплазме 3-х гепатоцитов. Ув. 26000**



**Рис.6. Парацетамол. Гетерогенность гепатоцитов, набухание митохондрий с просветлением матрикса в гепатоците, который находится в левой части рисунка. Ув. 26000.**

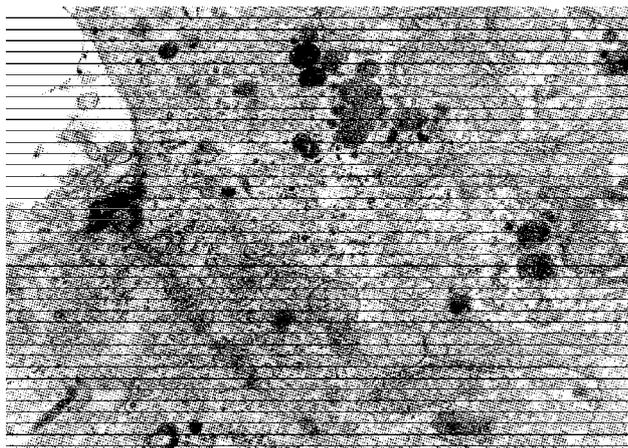


**Рис.7. Парацетамол. Обширная зона ГлЭС и липидные включения полигональной формы в цитоплазме гепатоцита на васкулярном полюсе клетки. Ув. 36000**

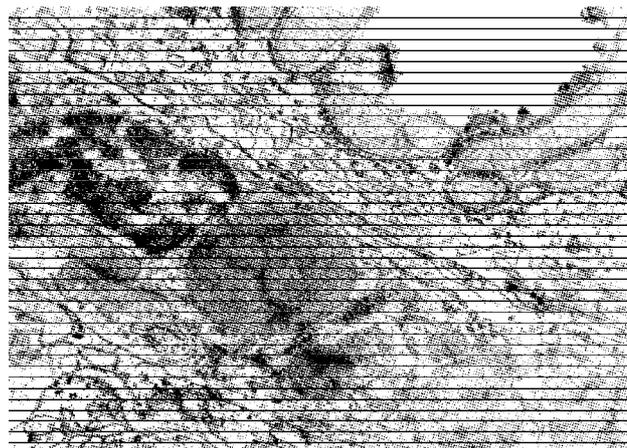
тина в ядрах, а также микровакуолизации кариоплазмы отдельных гепатоцитов. Многочисленные митохондрии отличались набухшим матриксом, резко выраженным полиморфизмом, уменьшением количества крист (рис. 6), т.е. наблюдались признаки, которые указывают на снижение их энергетического потенциала. В цитоплазме гепатоцитов возросло число профилей мембран гладкой эн-

доплазматической сети (ГлЭС) (рис. 7), что свидетельствует о токсическом поражении печени. Обнаруживались липидные включения, отличающиеся более крупными размерами, полигональной формой и электронно-плотным окаймлением (рис. 7). Увеличивалось число первичных лизосом, в местах их скопления наблюдались деструктивные изменения со стороны митохондрий, при этом органеллы принимали атипичную форму, местами отмечалось частичное нарушение целостности наружной мембраны митохондрий (рис. 8). Желчные капилляры отличались большей разнородностью по конфигурации просвета, количеству и расположению микроворсинок, местами желчные капилляры приобретали нерегулярную форму, с крайне неравномерным расположением микроворсинок и отложением электронно-плотных масс на мембранах (рис. 9). На васкулярном полюсе гепатоцитов регистрировалось обилие длинных микроворсинок, аналогично наблюдаемому в перипортальной и интермедиальной зонах дольки. Последнее свидетельствует об усиленном межтканевом обмене. В просветах синусоидных капилляров обнаруживались звездчатые клетки Купфера, (рис. 10), которые, являясь органоспецифическим компонентом макрофагальной системы и при физиологических условиях играющие ключевую роль в регуляции гомеостаза, значительно активировались: размеры их увеличивались, в цитоплазме выявлялись многочисленные полиморфные гранулы различной электронной плотности. В цитоплазме соседних гепатоцитов отмечалось локальное разрежение цитоплазмы, вплоть до «опустошения» (частичный цитолиз), обнаруживались пищеварительные вакуоли, плотно окруженные первичными лизосомами (рис. 11). Некоторые исследователи резидентным макрофагам отводят ведущую роль в реализации механизма активации ядерного аппарата [2], что мы и наблюдали со стороны ядерного аппарата в ответ на введение парацетамола.

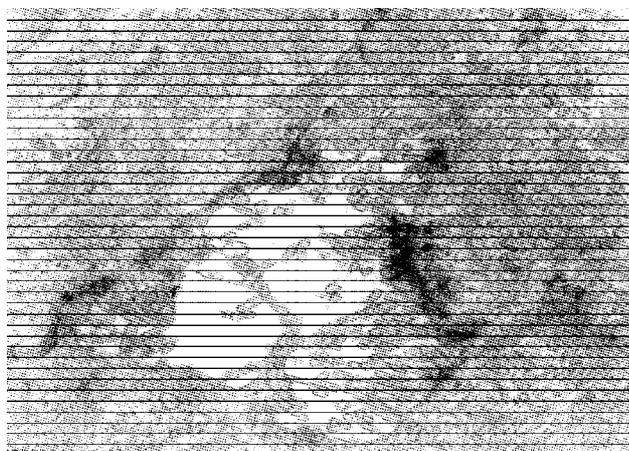
Ранее нами был показан зональный характер проявления токсического действия тетрахлорметана в ткани печени и почках животных. При этом, так же, как и в случае интоксикации парацетамолом, более выраженные деструктивные явления наблюдались в центрлобулярной зоне долек печени, а биосинтетические процессы более отчетливо проявлялись в перипортальной зоне [3]. Согласно известной концепции о структурно-функциональной единице печени (ацинусе), «перипортальная» зона соответствует ацинарной зоне 1. В синусоидах только этой зоны осуществляется процесс смешивания артериальной и портальной крови при помощи системы артериолопортальных анастомозов. Зона 2 простого ацинуса топографически занимает промежуточное положение (интермедиальная зона), в то время как клетки зоны 3 располагаются наиболее далеко от приносящих терминальных сосудистых ветвей. Омывающая их



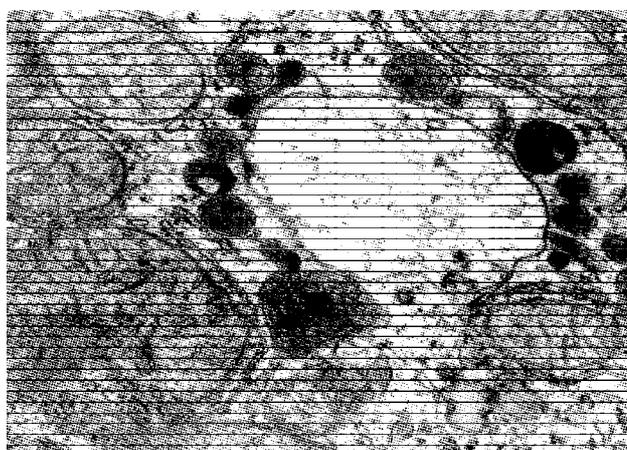
**Рис.8. Парацетамол.** Увеличение числа первичных лизосом, атипичные, гипертрофированные митохондрии с локальным разрушением наружной мембраны органелл. Ув. 36000.



**Рис.10. Парацетамол.** Крупный, активный макрофаг с многочисленными полиморфными лизосомами. Ув. 36000.



**Рис.9. Парацетамол.** Желчный капилляр нерегулярной формы, отложение электронно-плотных масс на межклеточных мембранах. Ув. 36000.



**Рис.11. Парацетамол.** Аутофагическая вакуоль, окруженная первичными лизосомами и пероксисомами в цитоплазме гепатоцита. Ув. 560000.

кровь содержит продукты метаболизма, выделяемые в процессе транскапиллярного обмена клетками зон 1 и 2. Принятый в литературе термин «центролобулярная зона» соответствует зоне 3 ацинуса. Следует отметить, что именно в центролобулярной зоне долек печени в цитоплазме гепатоцитов отмечены деструктивные изменения митохондрий, свидетельствующие о снижении функциональной активности органа, с образованием атипичных форм органелл, сочетающихся с гиперплазией ГлЭС и лизосом. Подобные изменения органелл обнаруживались нами в исследованиях гепатоцитов после однократного  $\gamma$ -излучения [1].

Таким образом, результаты электронно-микроскопического исследования свидетельствуют о том, что парацетамол, вводимый в дозе 750 мг/кг в течение 5 дней, вызывает деструктивные изменения печени животных. В ответ на воздействие парацетамола в ткани печени активируются биосинтетические и репаративные процессы, более выраженные в перипортальной и интермедиальной зонах долек печени. В гепатоцитах центролобулярной зоны наряду с активацией биосинтеза белка отме-

чено усиление процессов, связанных с детоксикацией и формированием вторичных образований.

#### Литература

1. Заводник Л.Б., Кравчук Р.И., Арцукевич А.Н., Чумаченко С.С., Шейбак В.М. и др. //Динамика структурных изменений в печени крыс после однократного воздействия  $\gamma$ -излучения // Общая радиобиология. – 2003. – Т. 43, № 6. – С. 618-624.
2. Панин Л.Е., Максимов В.Ф., Коростышевская И.М. Влияние глюкокортикоидов и липопротеинов высокой плотности на активность ядерного аппарата гепатоцитов // Бюлл. exper. биол. и мед. - 1999. - Т. 128, № 12. – С. 650-652.
3. Протекторный эффект мелатонина при гепатотоксическом действии четыреххлористого углерода у крыс //Л.Б.Заводник, И.Б.Заводник, Д.И.Мартынич и др. // Весті нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серія медыка-біялагічных навук. – 2003. - №2. - С. 69-74.
4. Bessems J.G., Vermeulen N.P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches // Crit. Rev. Toxicol. – 2001. – Vol. 31, N1. – P. 55-138.
5. Kuffner E.K., Dart R.C., Bogdan G.M., Hill R.E. Effect of maximal daily doses of acetaminophen on the liver of alcoholic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial //Arch. Intern. Med. – 2001. – Vol. 161, N18. – P. 2247-2252.
6. Millonig G.A. Advantages of a phosphate buffer for osmiumtetroxide solutions in fixation // J. Appl. Physics. - 1961. - V.32. - P.1637-1643.
7. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
8. Watson M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals // J. Biophys. Biochem. Cyt. – 1958. - Vol. 4. - P.475-478.