

Е. И. Лебедева

**МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ
АЛКОГОЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ**

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Целью данной работы явилась морфологическая оценка содержания гликогена в гепатоцитах пациентов на разных стадиях алкогольного поражения печени. Работа выполнена на секционном материале и прижизненных пункционных биопсиях печени. Всего исследован материал от 25 мужчин и 22 женщин в возрасте от 22 до 65 лет. Пациенты были разделены на 5 групп: относительная норма; пациенты с алкогольным стеатозом; пациенты с алкоголь-

ным гепатитом; пациенты с алкогольным циррозом; пациенты с алкогольным циррозом печени, класс тяжести «С». Использовали общегистологические, специальные и гистохимические методы исследования. Для морфометрической оценки гликогена использовали метод полуколичественного компьютерного анализа результатов. Как показали результаты исследования, на начальной, обратимой стадии алкогольной болезни (стеатозе печени) содержание гликогена в гепатоцитах было увеличено в 1,34 раза. На стадии хронического алкогольного гепатита с фиброзными изменениями печени содержание гликогена по сравнению со стадией стеатоза не изменялось. У пациентов с алкогольным циррозом оно было снижено в 1,17 раза, а цирроз класс тяжести «С» сопровождался резким снижением содержания гликогена (в 7,88 раза по сравнению с нормой). Достоверные различия в содержании глюкозы в сыворотке крови пациентов были выявлены только на стадии цирроза класс тяжести «С». Он сопровождался снижением глюкозы в 1,59 раза по сравнению с нормой.

Ключевые слова: печень, биопсии, аутопсии, алкоголь, гликоген, глюкоза.

E. I. Lebedeva

MORPHOMETRIC EVALUATION OF GLYCOGEN CONTENT IN HEPATOCYTES OF PATIENTS AT DIFFERENT STAGES OF ALCOHOLIC LIVER DISEASE

The aim of this study was to estimate the morphological content of glycogen in hepatocytes of patients at different stages of alcoholic liver disease. Work performed on autopsy material and lifetime liver biopsy. Totally materials from 25 men and 22 women aged 22 to 65 years were studied. Patients were divided into 5 groups: the relative norm; patients with alcoholic steatosis; patients with alcoholic hepatitis; patients with alcoholic cirrhosis; patients with alcoholic cirrhosis, severity class «C». Common histological, special and histochemical methods were used. For morphometric evaluation of glycogen semi-quantitative method of computer analysis was used. The survey revealed that, in the initial, reversible stage of alcoholic disease (hepatic steatosis) glycogen content in hepatocytes was increased 1,34 times. At the stage of chronic alcoholic hepatitis with fibrotic changes of the liver glycogen content was not changed as compared with the stage of steatosis. In patients with alcoholic cirrhosis, it was reduced to 1,17 times, and the severity of cirrhosis of class «C» accompanied by a sharp decrease in glycogen content (to 7,88 times in comparison with the norm). Significant differences in the content of glucose in the blood serum of the patients were detected only at the stage of cirrhosis severity class «C». It was accompanied by a decrease in glucose of 1,59 times compared with the norm.

Key words: liver, biopsy, autopsy, alcohol, glycogen, glucose.

Алкоголь является одной из основных причин заболеваемости и смертности населения во многих странах мира [10]. Ежегодно в мире от злоупотребления алкоголем умирает 2,5 миллиона человек, что составляет 6,2% всех смертей мужчин и 1,1% всех смертей женщин [6]. Отравления алкоголем и суррогатами представляют собой серьезную медико-социальную проблему, поскольку являются одной из основных причин насильственной смерти во многих странах СНГ, в том числе и в Беларуси [5]. Несмотря на большое число работ, посвященных метаболизму алкоголя в печени, механизм развития алкогольного повреждения печени остается до конца неясным. Хронический гепатит и цирроз приводят не только к нарушению структуры печени, но и вызывают различные изменения в углеводном метаболизме, что отражается на состоянии глюкостатической функции [11].

По сравнению с нормальной печенью, метаболизм гликогена и особенности его регуляции в цирротически измененной печени изучены недостаточно, а имеющиеся данные противоречивы. Снижение концентрации гликогена в печени было найдено у пациентов с циррозом [8]. Однако в других работах было показано, что содержание гликогена в гепатоцитах, изолированных из биопсийного материала печени пациентов больных хроническим гепатитом и циррозом различной этиологии, напротив, в несколько раз превышает норму [1, 3].

Довольно противоречивы данные о продукции глюкозы печенью при циррозе. С одной стороны, показано, что содержание ее у пациентов с циррозом не изменяется [7], а с другой стороны, было найдено, что она у пациентов с алкогольным циррозом снижается [8]. В других работах выявлено, что после приема пищи у многих пациентов с хроническими заболеваниями печени наблюдается повышенный уровень глюкозы в крови. Такая интолерантность к глюкозе наблюдается у 20–80% пациентов с циррозом печени различной этиологии, а также при остром и хроническом активном вирусном гепатите, жировом перерождении печени и некоторых токсических повреждениях печени. Повышение уровня глюкозы у пациентов с циррозом сопровождается заметным увеличением концентрации в крови лактата, пирувата и инсулина [9].

Углеводный метаболизм в печени осуществляется с помощью многих ферментов, активность которых регулируется различными гормональными, нервными, субстратными и другими механизмами. Помимо них, важную роль в регуляции углеводного обмена в печени играют различные тканевые и клеточные факторы. Показано, что активность ферментов углеводного обмена, содержание гликогена и направление основных субстратных потоков в гепатоцитах в значительной мере зависят от локализации клеток в дольке печени, степени их плоидности, а также фазы клеточного цикла, в которой они находятся [2].

□ Оригинальные научные публикации

Несмотря на ключевую роль инсулинорезистентности в патогенезе алкогольного поражения печени, большинство исследователей считают, что и другие патофизиологические процессы имеют важное значение в патогенезе таких поражений. Понимание механизмов дисфункции печени при хроническом злоупотреблении алкоголем может сыграть определенную роль в разработке новых методов лечения и, как следствие, снижение заболеваемости и смертности [11].

Противоречивость данных об углеводном обмене в цирротической печени связана главным образом с тем, что они получены на материале с разной степенью выраженности патологических изменений в органе и на разных стадиях пищеварительного цикла человека. Таким образом, из краткого обзора литературы следует, что отсутствуют четкие представления об углеводном обмене в печени при алкогольном поражении в целом и о содержании в гепатоцитах гликогена в частности.

Цель исследования: морфологическая оценка содержания гликогена в гепатоцитах пациентов на разных стадиях алкогольного поражения печени.

Материалы и методы. Работа выполнена на материале прижизненных пункционных биопсий печени пациентов с клинико-лабораторными и морфологическими признаками хронической гепатопатии, находившихся в УЗ «Витебская областная клиническая больница». Всем пациентам проводили чрескожные трепанобиопсии печени натошак (всегда в одно и то же время суток: в 10^{00} – 11^{00} ч.), под УЗ-контролем с помощью аппаратов SDU-500A фирмы «Shimadzu», оснащенных линейными и конвексными датчиками 3,5–5,0 МГц. Для получения стоекких печеночных длиной до 21 мм использовали иглы «Quick-Cut» 14–16G и автоматическое устройство «Bard» 14G. Кроме того, был изучен секционный материал от пациентов с хронической алкогольной интоксикацией. Размер и фиксацию изъятых фрагментов печени определяли в соответствии с Правилами «Витебского областного клинического патологоанатомического бюро» (приказ Министерства Здравоохранения Республики Беларусь № 111 от 17.06.1993). Критериями отбора пациентов в группу злоупотребляющих алкоголем явилось указание в анамнезе на регулярное употребление ими спиртных напитков и данных клинических и биохимических исследований. В стационаре больницы у пациентов был проведен биохимический анализ крови, включающий в себя определение концентрации глюкозы.

В качестве контроля использовали материал печени ostensibly здоровых людей (биоптаты печени лиц, направленных военкоматами для исключения патологии и лиц, умерших от причин, непосредственно не связанных с патологией печени), в котором отсутствовали морфологические, клинические и биохимические признаки поражения печени. Пациенты были разделены на 5 групп: 1-я – относительная норма (n = 8); 2-я – пациенты с алкогольным стеатозом (n = 12); 3-я – пациенты с алкогольным гепатитом (n = 10); 4-я – пациенты с алкогольным циррозом (n = 13); 5-я – пациенты с алкогольным циррозом печени, класс тяжести «С» по Child (декомпенсация, печеночно-клеточная недостаточность 1–2 ст., портальная гипертензия, варикозное расширение вен пищевода, асцит, n = 4). Всего исследован материал от 25 мужчин и 22 женщин в возрасте от 22 до 65 лет.

Гистологические препараты для обзорного изучения окрашивали гематоксилином-эозином. Фибропластические изменения выявляли при помощи окраски по методу Маллори в собственной модификации [4]. Степень фиброзных изменений печени оценивали по шкале Knodel (Комарова Д. В., 1999). Гликоген выявляли по методу Шабадаша (Роскин Г. И., 1951) с докраской препаратов гематоксилином. Контрольные срезы обрабатывали амилазой слюны в термостате при температуре 37 °C в течение 30 мин.

Для морфометрической оценки гликогена использовали метод полуколичественного компьютерного анализа результатов. Высчитывали относительную площадь, занимаемую гликогеном на срезе печени пациентов в процентах, с помощью программного обеспечения анализа изображений Image Scope Color. С этой целью производили микротофосъемку случайных полей зрения микропрепаратов цифровой камерой OLYMPUS XC 30 на базе микроскопа OLYMPUS BX 51 (Japan). Статистический анализ полученных результатов проводили в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2007 и STATISTIKA 6,1. Определяли средние значения и стандартные отклонения. Для выявления достоверных различий использовали непараметрический U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Гистологическая картина печени пациентов первой группы в целом соответствовала критериям нормы.

Во 2-й группе был выявлен жировой стеатоз. Во всех гистологических препаратах данной группы имелась выраженная мелко- и крупнокапельная жировая дистрофия. Наблюдалась мелкая некроза. В портальных трактах отмечалась скудная нейтрофильноклеточная воспалительная инфильтрация. При гистохимическом исследовании препаратов гликоген в гепатоцитах выявлялся в виде зерен фиолетово-вишневого цвета, равномерно заполняющих цитоплазму. Встречались гепатоциты, переполненные гликогеном, но в отдельных клетках содержание гликогена было снижено (рисунок 1). Изредка выявлялись единичные клетки, в которых зерна гликогена отсутствовали.

Как показали результаты исследования, на начальной, обратимой стадии алкогольной болезни (стеатозе печени) содержание гликогена в гепатоцитах было увеличено в 1,34 раза (рисунок 2).

Достоверных различий в содержании глюкозы в сыворотке крови на стадии стеатоза по сравнению с нормой выявлено не было (рисунок 3).

В 3-й группе пациентов был выявлен хронический алкогольный гепатит с фиброзными изменениями. На данной стадии развития алкогольного поражения печени изменений в содержании гликогена и глюкозы в сыворотке крови по сравнению со 2-й группой не выявлено (рисунок 2, 3).

В настоящее время мы не располагаем данными, позволяющими определить действительную причину, вызывающую увеличение содержания гликогена в клетках печени у пациентов с алкогольным стеатозом и гепатитом. Можно лишь надеяться, что дальнейшие исследования в этом на-

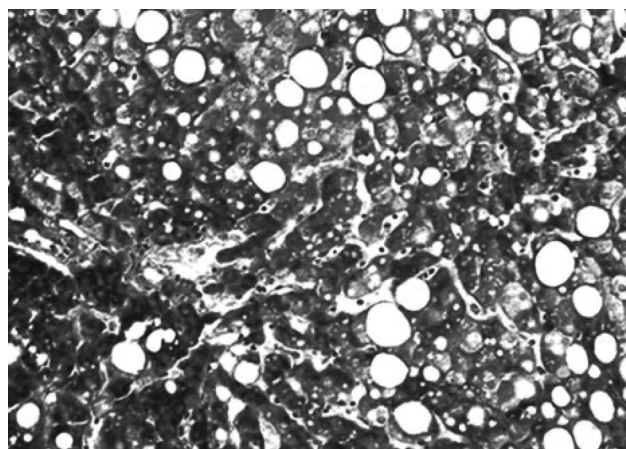


Рисунок 1. Печень пациентов при алкогольном стеатозе (биопсийный материал). Окраска по методу Шабадаша, увеличение $\times 400$

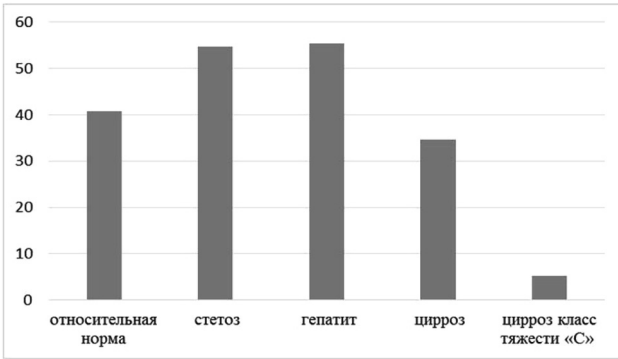


Рисунок 2. Относительная площадь, занимаемая гликогеном при гистохимической окраске от выделенной области интереса на снимке с гистологического препарата при различных стадиях алкогольного поражения печени

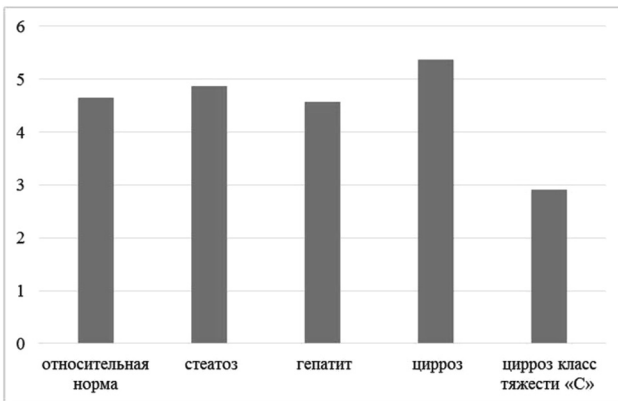


Рисунок 3. Содержание глюкозы в сыворотке крови пациентов при различных стадиях алкогольного поражения печени

правления помогут установить истинные механизмы этого явления.

В 4-й группе пациентов был выявлен моно-мультилобулярный цирроз. Печень была представлена ложными дольками, окруженными фиброзными септами различной толщины. Центральная вена в этих дольках часто отсутствовала. Гепатоциты находились в состоянии белковой дистрофии, встречались очаги крупнокапельной жировой дистрофии. При гистохимическом исследовании препаратов в отдельных гепатоцитах гликоген вообще не выявлялся (рисунок 4). Выявлялась лишь фоновая окраска, обусловленная гематоксилином.

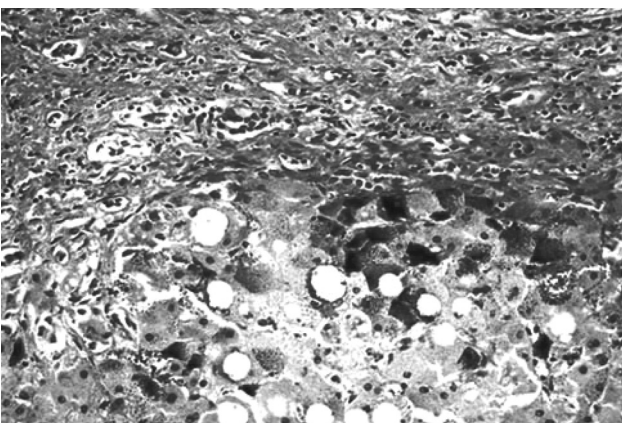


Рисунок 4. Печень пациентов при алкогольном циррозе (секционный материал). Окраска по методу Шабдаша, увеличение $\times 400$

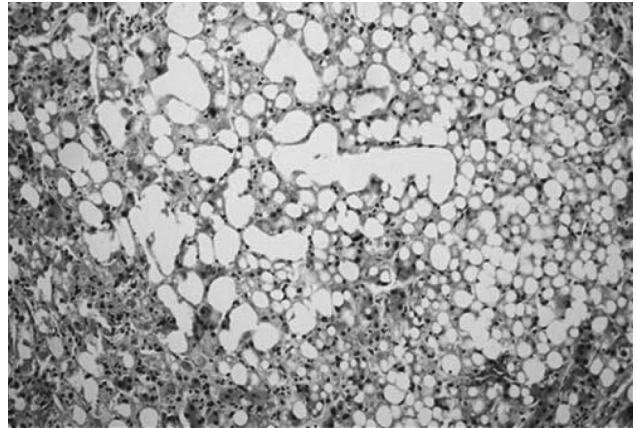


Рисунок 5. Печень пациентов при алкогольном циррозе класс тяжести «С» (секционный материал). Окраска по методу Шабдаша, увеличение $\times 200$

Встречались также клетки, в которых он определялся в виде разрозненных зерен, гомогенно распределенных по цитоплазме. Количество зерен часто резко различалось в разных клетках – от минимального до более значительного. Иногда отмечалась полярность распределения этих зерен: их количество было меньшим в одних участках (чаще в васкулярной зоне) и большим в других участках (билиарная зона клеток). Однако эта закономерность прослеживалась не всегда. Клетки, переполненные гликогеном, встречались редко. В цитоплазме этих клеток наряду со сплошным интенсивным окрашиванием на гликоген встречались участки, в которых были отчетливо различимы зерна биополимера, т. е также определялась полярность в его распределении. Следует также отметить, что на отдельных препаратах отмечалось гомогенное розовое окрашивание соединительной ткани (рисунок 4). Можно предположить, что это окрашивание давали углеводные компоненты гликопротеиновых молекул. У пациентов с алкогольным циррозом содержание гликогена было снижено в 1,17 раза (рисунок 2), а достоверных различий в содержании глюкозы в сыворотке крови выявлено не было (рисунок 3).

Цирроз класс тяжести «С» сопровождался резким снижением содержания гликогена в 7,88 раза по сравнению с нормой (рисунок 2). Во многих гепатоцитах окраска на этот биополимер практически полностью отсутствовала. Определялась лишь фоновая окраска, обусловленная гематоксилином. В подавляющем большинстве гепатоцитов выявлялась резко выраженная крупнокапельная жировая дистрофия. Часто жировые капли в ряде соседних гепатоцитов сливались и формировали причудливые гигантские структуры (жировые кисты, рисунок 5). Наблюдались широкие поля грубоволокнистой соединительной ткани, содержащие крупные вены. Количество гепатоцитов было снижено.

У пациентов 5-й группы цирроз сопровождался и снижением глюкозы в 1,59 раза по сравнению с нормой (рисунок 3).

Можно предположить, что снижение гликогена в 4-й и 5-й группах связано с уменьшением количества гепатоцитов и увеличением количества соединительной ткани, а также увеличением количества клеток лишенных гликогена.

Таким образом, исследование содержания гликогена в клетках печени пациентов в материале прижизненных пункционных биопсий является одним из подходов к поиску связей между механизмом развития алкогольного повреждения и выявленных метаболических нарушений. Его определение может быть также использовано при дифференциальной диагностике скрыто протекающих форм хронических гепатитов.

■ Оригинальные научные публикации

Литература

1. Байдюк, Е. В. Сравнительный анализ морфофункциональных показателей культуры гепатоцитов, выделенных из нормальной и патологически измененной печени крыс / Е. В. Байдюк [и др.] // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 10. – С. 797–805.
2. Безбородкина, Н. Н. Углеводный метаболизм при хронических поражениях печени / Н. Н. Безбородкина. – СПб.: Синтез Бук, 2008. – 176 с.
3. Кудрявцева, М. В. Количественная оценка содержания гликогена в гепатоцитах печени человека в норме и при хронических гепатитах различной этиологии / М. В. Кудрявцева [и др.] // Цитология. – 1995. – Т. 37, № 5. – С. 470–480.
4. Лебедева, Е. И. Модификация метода окрашивания соединительной ткани в печени при ее фиброзах / Е. И. Лебедева // «Инновации в медицине и фармации – 2014»: материалы дистанционной науч.-практ. конф., БГМУ, Минск, 2014. / Белорус. гос. мед. ун-т; редкол.: А. В. Сикорский [и др.]. – Минск, 2014. – С. 389–394.
5. Развадоский, Ю. Е. Экономическая доступность алкоголя и связанная с алкоголем смертность в Беларуси / Ю. Е. Развадоский // Вопросы организации и информатизации здравоохранения. – 2013. – № 1. – С. 48–52.
6. *Global status report on alcohol and health.* – WHO Press., 2011. – 286 p.
7. *Johansson, U. Splanchnic and peripheral glucose metabolism in cirrhosis / U. Johansson [et al.] // J. Hepatol.* – 1994. – № 20. – P. 760–767.
8. *Krahenbuhl, L. Reduced hepatic glycogen stores in patients with liver cirrhosis / L. Krahenbuhl [et al.] // Liver International.* – 2003. – № 23. – P. 101–109.
9. *Kruszynska, Y. T., Meyer-Alber A., Darakshan F., Home P. D., McIntyre N. Metabolic handling of orally administrated glucose in cirrhosis / Y. T. Kruszynska [et al.] // J. Clin. Invest.* – 1993. – № 91. – P. 1057–1066.
10. *Malaguarnera, G. Gut microbiota in alcoholic liver disease: Pathogenetic role and therapeutic perspectives / G. Malaguarnera [et al.] // World Journal of Gastroenterology.* – 2014. – Vol. 20, № 44. – P. 16639–16648.
11. *Ramirez, T. Insulin resistance, ceramide accumulation and endoplasmic reticulum stress in experimental chronic alcohol-induced steatohepatitis / T. Ramirez [et al.] // Alcohol and Alcoholism.* – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 39–52.

Поступила 4.03.2015 г.