

УДК 616.36-002-053.2

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И КАРИОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТКАНИ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В**¹Булыгин В.Г., ²Булыгин Г.В., ¹Пуликов А.С.**¹ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, Красноярск, e-mail: impn@impn.ru;²ГБОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России», Красноярск

Обследовано 30 детей в возрасте 12-16 лет, больных хроническим вирусным гепатитом В (18 человек со 2-й стадией хронизации процесса и 12 – с 3-й стадией), у которых в биоптатах печени определялись кариометрические показатели гепатоцитов и активность внутриклеточных ферментов. Установлено, что интенсивность энергетических и пластических реакций в клетках печени у больных детей зависит от стадии хронизации вирусного гепатита В. Повышение стадии хронизации заболевания приводит к более выраженному поражению паренхиматозных структур печени, что сопровождается ингибированием внутриклеточных ферментов. Корреляционные связи между энзиматическими показателями ткани печени и кариометрическими параметрами гепатоцитов отражают субклеточные механизмы повреждения и регенерации печени при хроническом вирусном гепатите В.

Ключевые слова: дети, хронический вирусный гепатит В, стадии хронизации, биоптаты печени, кариометрические и энзиматические показатели

METABOLIC AND KARYOMETRIC PARAMETERS OF TISSUE OF THE LIVER AT CHILDREN AT CHRONIC VIRUS HEPATITIS B**¹Buligin V.G., ²Buligin G.V., ¹Pulikov A.S.**¹Scientific Research Institute of medical problems of the North» Siberian Office of the Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, e-mail: impn@impn.ru;²Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky the Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk

Examined 30 children aged 12-16 years with chronic hepatitis B (18 people from the 2 stage of chronic process and 12 – with the 3 stage), which were determined in liver biopsy specimens karyometric indicators hepatocytes and activity of intracellular enzymes. The intensity of energy and plastic reactions in liver cells pediatric patients depends on the stage of chronic hepatitis B. Increasing stage of chronicity leads to a more pronounced defeat parenchymal liver structures, accompanied by inhibition of intracellular enzymes. Correlations between enzymatic indicators of liver tissue and hepatocytes karyometric parameters reflect subcellular mechanisms of damage and liver regeneration in chronic viral hepatitis B.

Keywords: children, chronic hepatitis B, chronic stage, biopsy liver, karyometric and enzymatic indicators

Хронический вирусный гепатит В вследствие своей широкой распространенности, тяжести течения заболевания и его последствий остается одной из наиболее актуальных проблем инфекционной патологии и гепатологии, как во всем мире, так и в Российской Федерации [10]. Особенно остро стоит этот вопрос в педиатрической практике, так как является одним из факторов детской инвалидизации [9]. Исследования, проведенные до настоящего времени, позволили установить многие элементы патогенеза этого заболевания, но вопросов, связанных с объяснением механизмов его течения, остается достаточно много.

Морфологические и гистологические методы анализа состояния ткани печени используются при диагностике и дифференциальной диагностике гепатитов вирусной и другой этиологии, причем достаточно часто они являются решающими в данной области. В то же время, дальнейшее их применение, в том числе с использованием морфометрического подхода, несомненно,

будет способствовать получению более детальной и точной информации, раскрывающей новые механизмы развития хронического вирусного гепатита В.

Процессы повреждения и регенерации ткани печени при вирусных гепатитах протекают одновременно и во многом зависят от интенсивности и направленности реакций внутриклеточного метаболизма, характеристику которых можно получить при определении показателей активности ферментов [3]. В частности, наиболее информативными являются дегидрогеназы, участвующие в основных метаболических путях клеток и формирующие их функциональные возможности [4]. Однако изменения внутриклеточного метаболизма печеночной ткани при гепатитах остаются не изученными, так как немногочисленные исследования, проведенные при этих заболеваниях, посвящены, в основном, определению у больных активности ферментов в лимфоцитах крови [8], или же в печени животных при ее токсических поражениях в эксперименте [2].

Цель исследования: определение зависимости показателей активности внутриклеточных ферментов ткани печени и карิโอметрических параметров гепатоцитов, отражающих процессы повреждения и регенерации печени у детей, больных хроническим вирусным гепатитом В, от стадии хронизации этого заболевания.

Материалы и методы исследования

Обследовано 30 детей в возрасте от 12-и до 16-и лет, больных хроническим вирусным гепатитом В, диагноз которого устанавливался в условиях специализированного стационара с помощью стандартных клинико-биохимических, иммуноферментных методов анализа и подтверждался морфологически после проведения под контролем УЗИ пункционной биопсии печени с учетом гистологического индекса степени активности (ГИСА) и гистологического индекса стадии хронизации (ГИСХ) по В.В. Серову [7]. Морфометрическое исследование проведено в соответствии с принципами системного количественного анализа [1].

Материал, полученный при биопсиях, использовался как для проведения морфологического и морфометрического исследования, так и для определения в ткани печени активности внутриклеточных ферментов биолюминесцентным методом [6]. Часть ткани печени (3-5 мг), получаемой при биопсии, гомогенизировали и в гомогенате определяли актив-

ность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ), НАД- и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДФГДГ), НАД- и НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (НАДМДГ и НАДФМДГ), а также глутатионредуктазы (ГР). Показатели активности ферментов выражали в микроединицах на 1 микрограмм ткани печени (мкЕ/мкг).

Полученные данные обработаны методами статистического анализа, используемыми в биологии и медицине, с применением пакета прикладных программ Statistica 6,0 и соответствующих рекомендаций [5]. В таблицах представлены: среднегрупповые показатели (М), ошибки средних (m), достоверность непараметрического критерия Манна-Уитни (U) для различий между показателями групп (p); значения и достоверность коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между морфометрическими и энзиматическими показателями.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами проведен анализ ряда карิโอметрических показателей гепатоцитов, а также показателей активности метаболических ферментов в ткани печени (табл. 1).

Таблица 1

Кариометрические и энзиматические показатели ткани печени детей при разных стадиях хронизации хронического вирусного гепатита В

Морфометрические показатели			
Кариометрические показатели	(2-я стадия хронизации), n=18	(3-я стадия хронизации), n=12	Достоверность по U-критерию (p)
Объем ядра, мкм ³	483,94±3,51	497,73±4,53	0,023
Объем ядрышка, мкм ³	6,63±0,02	6,59±0,02	0,176
Число ядрышек	1,58±0,02	1,53±0,01	0,048
Объем ядрышкового материала, мкм ³	10,36±0,10	10,04±0,08	0,025
Ядерно-ядрышковое соотношение	46,79±0,24	49,59±0,32	0,001
Ядра в интерфазе, %	33,06±0,41	52,00±0,49	0,001
Ядра в состоянии деления, %	66,94±0,41	47,86±0,49	0,001
Одноядерные гепатоциты с интерфазным ядром, %	47,92±0,30	49,34±0,26	0,019
Активность ферментов в гомогенатах ткани печени (мкЕ/мкг)			
Ферменты	2-я стадия хронизации, n=12	3-я стадия хронизации, n=10	Достоверность по U-критерию (p)
Г6ФДГ	29,95±6,64	7,99±2,36	0,024
ГЗФДГ	140,09±17,77	121,09±13,60	0,468
ЛДГ	23,80±4,59	7,18±2,26	0,011
НАДИЦДГ	5,86±1,57	2,30±0,78	0,166
НАДФИЦДГ	57,67±11,59	19,06±5,30	0,005
НАДГДГ	329,94±74,11	153,29±31,39	0,210
НАДФГДГ	35,68±9,04	9,48±4,26	0,029
НАДМДГ	217,14±48,24	77,75±17,94	0,024
НАДФМДГ	23,40±4,21	7,90±1,84	0,017
ГР	8,23±1,70	3,01±0,81	0,024

Морфометрические показатели свидетельствовали о том, что при 3-й стадии хронизации гепатита В для гепатоцитов характерен больший, чем при 2-й стадии, объем ядра (соответственно $497,73 \pm 4,53$ и $483,94 \pm 3,51$; $p < 0,023$). В то же время, при более тяжелой стадии заболевания определялись менее высокими число ядрышек ($1,53 \pm 0,01$ и $1,58 \pm 0,02$; $p < 0,048$) и объем ядрышкового материала ($10,04 \pm 0,08$ и $10,36 \pm 0,10$; $p < 0,025$). В связи с этим, и ядерно-ядрышковое соотношение в гепатоцитах при 3-й стадии хронизации гепатита было ниже, чем при 2-й стадии ($49,59 \pm 0,32$ и $46,79 \pm 0,24$; $p < 0,001$).

Несколько из определявшихся показателей характеризовали уровень повреждения гепатоцитов и регенераторную активность ткани печени при разной степени ее поражения патологическим процессом. Так, число ядер гепатоцитов, находящихся в интерфазном состоянии, при 3-й стадии было выше, чем при 2-й ($52,00 \pm 0,49$ и $33,06 \pm 0,41$; $p < 0,001$), а показатель числа ядер, находящихся в состоянии деления, наоборот, был ниже ($66,94 \pm 0,41$ и $47,86 \pm 0,49$; $p < 0,001$). Одноядерных гепатоцитов с интерфазным ядром при 3-й стадии хронизации определялось больше, чем при 2-й ($49,34 \pm 0,26$ и $47,92 \pm 0,30$; $p < 0,019$).

При анализе энзиматических показателей ткани печени, проведенном по результатам определения активности ферментов в ткани печени 22 детей (12 человек со 2-й и 10 – с 3-й стадиями хронизации), первое,

что обращало на себя внимание, это подавление в несколько раз активности ферментов при 3-й стадии хронизации гепатита В по сравнению со 2-й, причем, большинство межгрупповых различий достоверно (табл.1). Вторая особенность внутриклеточного метаболизма ткани печени заключалась в том, что в большей степени снижались активности касалось НАДФ-зависимых ферментов, чем НАД-зависимых (количество достоверных различий показателей в соотношении 5:2).

3-я стадия хронизации, по сравнению со 2-й, сопровождалась снижением активности фермента гликолиза ЛДГ ($7,18 \pm 2,26$ и $23,80 \pm 4,59$; $p < 0,011$), а также Г6ФДГ – фермента пентозофосфатного пути ($7,99 \pm 2,36$ и $29,95 \pm 6,64$; $p < 0,024$). Также при 3-й стадии на менее высоком, чем при 2-й, уровне определялась активность ферментов цикла трикарбоновых кислот и ассоциированных с ним реакций: НАДФИЦДГ (соответственно $19,06 \pm 5,30$ и $57,67 \pm 11,59$; $p < 0,005$), НАДФГДГ ($9,48 \pm 4,26$ и $35,68 \pm 9,04$; $p < 0,029$), НАДМДГ ($77,75 \pm 17,94$ и $217,14 \pm 48,24$; $p < 0,024$), НАДФМДГ ($7,90 \pm 1,84$ и $23,40 \pm 4,21$; $p < 0,017$), а также ГР, функционирующей в системе глутатионовой антиоксидантной защиты клеток и в активном транспорте в них аминокислот ($3,01 \pm 0,8$ и $18,23 \pm 1,70$; $p < 0,024$).

С помощью корреляционного анализа установлены взаимосвязи энзиматических и некоторых кариометрических параметров ткани печени больных детей (табл. 2).

Таблица 2

Значения и достоверность коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между кариометрическими показателями гепатоцитов и активностью внутриклеточных метаболических ферментов в гомогенате ткани печени

Ферменты	Число ядер гепатоцитов в состоянии деления	Число ядер гепатоцитов в интерфазе	Одноядерные гепатоциты с интерфазным ядром	Число ядрышек в ядре	Объем ядрышкового материала
Г6ФДГ	+ 0,47 (P<0,05)	- 0,45 (P<0,05)	- 0,44 (P<0,05)	+ 0,43 (P<0,05)	+ 0,48 (P<0,05)
ГЗФДГ			- 0,55 (P<0,01)		
ЛДГ	+ 0,50 (P<0,05)	- 0,49 (P<0,05)			
НАДИЦДГ				+ 0,44 (P<0,05)	+ 0,43 (P<0,05)
НАД-ФИЦДГ	+ 0,55 (P<0,01)	- 0,55 (P<0,01)			+ 0,42 (P<0,05)
НАДГДГ	+ 0,43 (P<0,05)				+ 0,43 (P<0,05)
НАДФГДГ	+ 0,42 (P<0,05)				
НАДМДГ	+ 0,43 (P<0,05)	- 0,42 (P<0,05)	- 0,43 (P<0,05)		
НАДФМДГ	+ 0,42 (P<0,05)				+ 0,44 (P<0,05)

Примечание. Критическое значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена при $n=22$ для уровня достоверности $P < 0,05$ равно 0,042; для $P < 0,01 = 0,54$.

Наиболее существенным обстоятельством является то, что максимальное количество достоверных связей определялось между относительным содержанием числа ядер гепатоцитов, находившихся в состоянии деления, и активностью почти всех (за исключением НАДИЦДГ) изученных ферментов цикла Кребса и ассоциированных с ним реакций (НАДФИЦДГ, НАДГДГ, НАДФГДГ, НАДМДГ, НАДФМДГ), а также ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути (ЛДГ и Г6ФДГ). При этом положительное значение коэффициентов корреляции указывало на высокую прямую зависимость митоза гепатоцитов от активности как реакций энергопродукции в цикле трикарбоновых кислот и гликолизе с участием НАД-зависимых ферментов, так и от количества восстановленного НАДФ, вырабатываемого соответствующими НАДФ-зависимыми ферментами и необходимым для пластических и синтетических процессов клеток. Наличие же положительного коэффициента корреляции между числом ядер гепатоцитов в состоянии деления и активностью Г6ФДГ свидетельствовало о наличии прямой зависимости процесса клеточного деления и от работы пентозофосфатного пути, его продуктивности по обеспечению необходимого для деления количества нуклеиновых кислот. Следует отметить, что показатель Г6ФДГ имел максимальное количество достоверных корреляционных связей с морфометрическими показателями, характеризующими репаративные процессы в печени детей, больных хроническим гепатитом В, что подтверждает высокую значимость метаболических реакций пентозофосфатного пути для процессов регенерации.

Несколько отрицательных корреляционных показателей свидетельствовали о том, что при менее высоком уровне метаболизма со сниженной активностью ферментов, в ткани печени определяются более высокими как доля одноядерных гепатоцитов с интерфазным ядром, так и процентное количество клеточных ядер в интерфазе. Эти морфометрические показатели имели обратные связи с активностью ферментов, обеспечивающих и пластические, и энергетические потребности клеток: Г6ФДГ, Г3ФДГ, ЛДГ, НАДМДГ и НАДФИЦДГ.

Применение корреляционного анализа позволило установить взаимосвязи активности метаболических ферментов в ткани печени и с такими показателями, как среднее число ядрышек в ядре гепатоцитов и объем ядрышкового материала. Для первого из них установлена прямая взаимозависимость с Г6ФДГ – ключевым ферментом пентозофосфатного пути, а также с НАДИЦДГ – ферментом цикла трикарбоновых кислот. Показатель объема ядрыш-

кового материала имел связи с большим числом ферментов, функционирующих как в цикле Кребса, так и в пентозофосфатном пути: НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ, НАДГДГ, НАДФМДГ и Г6ФДГ. Перечисленные положительные связи вполне объяснимы тем, что количество ядерного материала и число ядрышек в гепатоците зависят от способности метаболизма обеспечить как энергетические, так и пластические потребности клеток.

Таким образом, в результате проведения комплексного исследования впервые установлены взаимосвязи между морфологическими и метаболическими параметрами ткани печени у детей, больных хроническим вирусным гепатитом В, которые раскрывают некоторые клеточные и субклеточные механизмы повреждения и регенерации печени при этом заболевании.

Выводы

1. Интенсивность энергетических и пластических реакций в клетках печени у детей в возрасте 12-16 лет, больных хроническим вирусным гепатитом В, зависит от стадии хронизации заболевания. Повышение стадии хронизации заболевания приводит к более выраженному поражению паренхиматозных структур печени, что сопровождается ингибированием внутриклеточных ферментов.

2. Корреляционные связи между энзиматическими показателями ткани печени и кариометрическими параметрами гепатоцитов отражают субклеточные механизмы повреждения и регенерации печени при хроническом вирусном гепатите В у детей.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 382 с.
2. Безбородкина, Н. Н. Молекулярные механизмы метаболической адаптации патологически измененной печени при токсическом гепатите / Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, М.В. Кудрявцева и др. // Цитология. – 2008. – т.50. – №3. – С. 228–237.
3. Булыгин В.Г. Особенности метаболизма в клетках печени у детей в зависимости от стадии хронизации вирусного гепатита В / В.Г. Булыгин, Г.В. Булыгин // Якутский медицинский журнал. – 2013. – №3(43). – С. 21–23.
4. Булыгин Г.В. Метаболические основы регуляции иммунного ответа / Г.В. Булыгин, Н.И. Камзалакова, А.В. Андрейчиков. – Новосибирск, СО РАМН. – 1999. – 346 с.
5. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных: Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: Медиасфера, 2002. – 312 с.
6. Савченко, А.А. Высококочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека биолюминесцентным методом / А.А. Савченко, Л.Н. Сунцова // Лабораторное дело. – 1989. – № 11. – С. 23–25.
7. Серов В.В. Морфологические критерии оценки этиологии, степени активности и стадии процесса при вирусных хронических гепатитах В и С / В.В. Серов, Л.О. Севергина // Архив патологии. – 1996. – №4. – С. 61–64.
8. Тихонова Е.П. Метаболические основы иммунореактивности при парентеральных гепатитах В и С / Е.П. Тихонова, Г.В. Булыгин. – Новосибирск: Наука, 2003. – 148 с.
9. Учайкин, В.Ф. Вирусные гепатиты у детей: от прошлого к настоящему / В.Ф. Учайкин, С.Б. Чуелов // Детские инфекции. – 2006. – №4. – С. 4–8.
10. Шахгильдян И.В. Хронические вирусные гепатиты в Российской Федерации / И.В. Шахгильдян, А.А. Ясинский, М.И. Михайлов и др. // Клинико-эпидемиологические и этно-экологические проблемы заболеваний органов пищеварения: материалы восьмой Восточно-Сибирской гастроэнтерологической конференции с международным участием и Красноярской краевой гастроэнтерологической конф., 17–18 апреля 2008 г. – Красноярск, 2008. – С. 246–253.