

УДК 612.359:611.08:591.81

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИКЛОФОСФАМИДА

Лушникова Е.Л., Молодых О.П., Капустина В.И., Непомнящих Л.М.

*ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии»,  
Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru*

Проведено исследование тканевой и внутриклеточной реорганизации печени после однократного введения циклофосфамида. Показано, что однократное введение препарата вызывает выраженные морфофункциональные изменения печени (мелкоочаговые некрозы гепатоцитов преимущественно в перипортальной зоне и обширную мононуклеарную клеточную инфильтрацию, развивающиеся на фоне нарушений кровообращения и развития обструктивных процессов) и ультраструктурные изменения клеточных популяций печени – гепатоцитов и эндотелиоцитов, а также реактивные изменения мигрирующих в пространство Диссе клеток Купфера, лимфоцитов и плазмоцитов. Внутриклеточная реорганизация гепатоцитов и эндотелиоцитов обусловлена некробиозом одних клеток, усилением обменных и регенераторных процессов других и усилением фагоцитоза. В ранние сроки после введения циклофосфамида в печени происходит увеличение доли двуядерных гепатоцитов, в более поздние сроки возрастает доля одноядерных клеток.

**Ключевые слова:** действие циклофосфамида, печень, гепатоциты, эндотелиоциты, клетки Купфера, ультраструктура

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE LIVER UNDER THE INFLUENCE OF CYCLOPHOSPHAMIDE

Lushnikova E.L., Molodykh O.P., Kapustina V.I., Nepomnyaschikh L.M.

*Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, e-mail: pathol@inbox.ru*

The study of tissue and intracellular reorganization of the liver after a single injection of cyclophosphamide has been carried out. It is shown that a single administration of the drug causes marked morphological and functional alterations – microfocal necrosis of hepatocytes (predominantly in the periportal area), extensive mononuclear cell infiltration on the background of circulatory disorders and obstructive events, ultrastructural changes of hepatocytes and endothelial cells, reactive changes of Kupffer cells, lymphocytes and plasma cells migrating into Disse space. Intracellular reorganization of hepatocytes and endothelial cells is associated with necrobiosis (in some cells), increased metabolic and regenerative processes (in others) or enhanced phagocytosis. Shortly after the administration of cyclophosphamide there is an increase in the proportion of binuclear hepatocytes which later gives way to a proportional expansion of mononuclear cells.

**Keywords:** the treatment of cyclophosphamide, liver, hepatocytes, endothelial cells, Kupffer cells, ultrastructure

Гепатотоксические эффекты различных лекарственных препаратов постоянно находятся в центре внимания исследователей и клиницистов и представляют одну из наиболее сложных проблем современной медицины [3, 4, 6, 9]. Патогенез лекарственно индуцированной гепатопатии очень сложен, и важная роль в нем принадлежит метаболитам, которые образуются в гепатоцитах в результате биотрансформации лекарственных препаратов и могут обладать более выраженными цитотоксическими свойствами [10]. Существенное значение имеют также ишемические повреждения печени, которые возникают в результате развития хронической сердечной недостаточности или синусоидального обструктивного синдрома [7]. Циклофосфамид – препарат, широко используемый в противоопухолевой терапии, и вопросы, касающиеся морфогенетических процессов и выраженности цитотоксических эффектов в отношении гепатоцитов и других клеточных популяций печени, интенсив-

ности регенераторных реакций, являются крайне актуальными [1, 2, 5].

Для выяснения механизмов циклофосфамидного повреждения печени необходимо изучение в том числе ультраструктурных изменений гепатоцитов с оценкой выраженности внутриклеточных регенераторных реакций. Полученная информация имеет большое значение для разработки эффективных способов коррекции развивающихся побочных эффектов медикаментозной терапии.

**Цель работы** – изучить морфологические изменения в печени после однократного введения циклофосфамида.

### Материал и методы исследования

Комплексный морфологический анализ печени проведен у 3-месячных крыс-самцов Вистар. Животным ( $n = 68$ ) вводили однократно внутрибрюшинно циклофосфамид («Биохимик») в дозе 125 мг/кг. Контрольную группу составили особи ( $n = 12$ ), которым одновременно с опытными животными внутрибрюшинно однократно вводили физиологический

раствор в соответствующем их массе тела объеме, а затем внутривенно в воду. Животных содержали постоянно при комнатной температуре без ограничения доступа к воде и пище. Эксперимент проведен с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), одобрено этическим комитетом ФГБНУ ИМПМ.

Животных всех групп декапитировали в первой половине дня с использованием эфирного наркоза через 3 сут (34 опытных и 6 контрольных) и 14 сут (34 опытных и 6 контрольных) после введения циклофосамида. После вскрытия печень осторожно отделяли от окружающих тканей, быстро взвешивали и проводили визуальное обследование, затем фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина при комнатной температуре.

Проводку осуществляли на гистологическом комплексе Микром («Zeiss», Германия), образцы заливали в смесь воска и парафина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином с постановкой реакции Перлса, по методу ван Гизона с докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили PAS-реакцию. Светооптическое исследование проводили на универсальном микроскопе «Leica DM 4000B» (Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры «Leica DFC 320» (Германия) и компьютерной программы «Leica QWin V3».

Для электронно-микроскопического исследования образцы печени размерами фиксировали в 4% растворе параформальдегида, постфиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub>, обезжировали, заливали в смесь эпона 812 и аралдита М. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III. Полутонкие срезы окрашивали капельным способом 1% раствором азур II, ставили PAS-реакцию с докраской раствором азур II. Ультратонкие срезы контрастировали в уранилацетате и цитрате свинца. Исследование проводили в электронном микроскопе JEM-1400 (фирмы «Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Проводили количественную оценку популяции гепатоцитов – оценивали процентное содержание одно- и двуядерных гепатоцитов в перипортальной и периферической зонах с помощью универсального микроскопа «Leica DM 4000B» (Германия) при увеличении 1000 раз. Для каждого животного соотношение одно- и двуядерных клеток вычисляли при анализе не менее 500 клеток.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием критерия Стьюдента. Различия считали статистически достоверными, если достигнутый уровень значимости (p) не превышал принятого критического уровня значимости, равного 0,05 (p ≤ 0,05).

### Результаты исследования и их обсуждение

Общетокические свойства циклофосамида оценивали по уровню летальности. В сроки до 14 сут погибли 5 животных из 20 (25%-я летальность). Однократное введение циклофосамида вызывало снижение абсолютной массы тела на 19% (p < 0,05) и абсолютной массы печени на 17% (p < 0,05) к 3-м суткам наблюдения (табл. 1).

К 14-м суткам после введения препарата масса тела оставалась сниженной (на 12%, p < 0,05), масса печени восстанавливалась до уровня контроля, обуславливая увеличение относительной массы печени (на 19%, p < 0,05).

Морфологические изменения печени после однократного введения циклофосамида проявлялись, прежде всего, в дистрофических, некробиотических и некротических изменениях гепатоцитов, в нарушениях кровообращения в виде неравномерного синусоидального и венозного полнокровия, обтурации синусоидов мононуклеарами и нейтрофилами. Однако для каждого срока наблюдения эти изменения были выражены в разной степени. Через 3 сут наблюдения в перипортальной зоне преобладали явления дистрофии и некробиоза гепатоцитов, в периферической зоне – выраженная субплазмалеммальная «вакуолизация» цитоплазмы гепатоцитов. Регенераторные реакции гепатоцитов в этот срок эксперимента заключались в усилении митотической активности гепатоцитов, особенно в перипортальной зоне, и в увеличении доли двуядерных гепатоцитов (табл. 2). Наблюдалась значительная гипертрофия клеток Купфера (часто содержащих липидные включения) и тромбирование ими просветов синусоидных капилляров.

Таблица 1

Результаты морфометрического исследования крыс Вистар после введения циклофосамида (M ± m)

Показатель	Контроль	Введение циклофосамида	
		3 сут	14 сут
Масса тела, г	235,5 ± 9,46	191,70 ± 6,72*	206,40 ± 16,33*
Масса печени, г	11,057 ± 0,586	9,210 ± 0,349*	11,458 ± 0,968
Относительная масса печени, мг на 1 г массы тела	46,75 ± 1,34	48,07 ± 0,77	55,62 ± 1,96*

Примечание. \* – p < 0,05 при сравнении с контролем.

Таблица 2

Количественная оценка (%) популяции гепатоцитов печени крыс Вистар после введения циклофосфамида ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль	Введение циклофосфана	
		3 сут	14 сут
Перипортальная зона			
1-ядерные гепатоциты	91,3 ± 1,8	89,0 ± 1,8	93,7 ± 1,2
2-ядерные гепатоциты	8,7 ± 1,8	11,0 ± 1,8	6,3 ± 1,2
Перицентральный зона			
1-ядерные гепатоциты	89,2 ± 1,4	85,8 ± 2,5	94,6 ± 0,7*
2-ядерные гепатоциты	10,8 ± 1,4	14,2 ± 2,5	5,4 ± 0,7*

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Через 14 сут наблюдения печень приобрела выраженный «ячеистый» вид из-за расширения и полнокровия синусоидных капилляров. Во всех зонах долики печени наблюдались обильные скопления гипертрофированных клеток Купфера, плазматиков, сегментоядерных лейкоцитов, часто обтурировавших просвет синусоидных капилляров. Отмечался выраженный полиморфизм эритроцитов (преобладание «звездчатых» форм), который рассматривается нами как одно из проявлений цитотоксического эффекта циклофосфамида.

Митотической активности гепатоцитов в этот срок эксперимента не наблюдалось; доля двуядерных гепатоцитов в обеих зонах долики была уменьшена как по сравнению с контролем, так и по сравнению с 3 сут после введения препарата. Выявлено снижение количества гликогена во всех гепатоцитах долики, но наиболее «опустошенными» выглядели гепатоциты в перипортальных зонах; гранулы полисахарида были сконцентрированы преимущественно перинуклеарно. Во многих гепатоцитах сохранялась значительная «вакуолизация» и метахроматизация цитоплазмы. Увеличивалось количество некробиотически измененных гепатоцитов, наблюдались некрозы гепатоцитов (преобладание литических повреждений).

Перипортально регистрировались немногочисленные гепатоциты с выраженной маргинальной конденсацией гетерохроматина в ядрах и деструктурированной цитоплазмой, которые можно было отнести к апоптотически измененным. В очагах некроза гепатоцитов отмечалась интенсивная мононуклеарная инфильтрация. Усиливались склеротические процессы (преимущественно в портальных зонах) – развивался выраженный портальный склероз, строма портальных трактов была инфильтрирована мононуклеарными клетками так, что инфильтраты образовывали протяженные

массивные муфтообразные скопления вдоль сосудов и желчных протоков.

Количественная оценка популяции гепатоцитов и в перипортальной, и в перицентральной зонах в этот срок показала существенное увеличение через 3 сут после введения циклофосфамида доли двуядерных клеток (на 26 и 32%) (табл. 2). Через 14 сут наблюдения наблюдалось существенное снижение доли двуядерных клеток в обеих зонах и увеличение доли одноядерных клеток как по сравнению с контролем (соответственно на 28 и 50%,  $p < 0,05$ ), так и по сравнению с 3-ми сутками эксперимента (соответственно на 43 и 62%). Уменьшение доли двуядерных гепатоцитов через 14 сут после введения циклофосфамида свидетельствовало об истощении клеточной формы регенерации гепатоцитов.

*Внутриклеточная реорганизация печени при действии циклофосфамида.* Внутриклеточная реорганизация гепатоцитов через 3 суток после однократного введения циклофосфамида была обусловлена выраженными изменениями тонкой структуры митохондрий (полиморфизм, электронноплотный матрикс), транзитными изменениями гранулярной цитоплазматической сети (неравномерное расширение и укорочение), значительной редукцией гладкой цитоплазматической сети, гиперплазией и гипертрофией структурных элементов комплекса Гольджи, формированием массивных скоплений гликогена и его усиливающейся секвестрацией и аутофагоцитозом, с формированием многочисленных субплазмалемальных остаточных телец; миелоноподобной трансформации и неравномерным истощением липидных капель. Ядрышки, как правило, были крупными, петлистыми, но состояли в основном из фибриллярного материала, что отражало нарушение процессов формирования рибосом. В наибольшей степени лизис и секвестра-

ция гликогена были выражены в гепатоцитах перипортальной зоны с образованием светлого ободка вокруг гранул гликогена, формированием мелких миелопоподобных (остаточных) телец. На билиарных полюсах гепатоцитов в обеих зонах скапливались вторичные лизосомы.

Ультраструктурная реорганизация пространств Диссе заключалась в его значительном сужении, появлении в нем единичных утолщенных пучков коллагеновых волокон, остаточных телец. Клетки Купфера, лимфоциты и плазмоциты были представлены функционально активными формами и формировали цитоплазматические выросты. Значительным изменениям подвергалась эндотелиальная выстилка микроциркуляторного русла печеночной долики – регистрировалась выраженная гетерогенность эндотелия в виде активированных и некробиотически измененных клеток. Внутриклеточная реорганизация активированных эндотелиоцитов определялась интенсификацией обменных процессов и фагоцитоза, приводящих к гипертрофии клеток, для ультраструктурного фенотипа которых характерными были развитая гранулярная цитоплазматическая сеть, многочисленные везикулы, микротрубочки, остаточные тельца, формирование выростов на люминальной поверхности клеток. Некробиотически измененные эндотелиоциты имели электронно-прозрачную цитоплазму с незначительным количеством органелл и повреждением плазматической мембраны. В некоторых синусоидах некроз эндотелиоцитов приводил к нарушению целостности эндотелиальной выстилки.

Через 14 сут после введения циклофосфамида ультраструктурные изменения гепатоцитов в обеих зонах усиливались: в перипортальной зоне формировались еще более обширные «поля» гликогена с гетерогенными липидными включениями, усиливалась секвестрация гликогена, появление среди зерен гликогена вакуолей с мембранными структурами и истощающимися гранулами полисахарида; увеличение степени осмиофильной дегенерации митохондрий с образованием остаточных телец.

Ядра гепатоцитов отличались небольшим полиморфизмом, крупными, петлистыми ядрышками, содержащими фибриллярный и гранулярный материал, что свидетельствовало о восстановлении процессов сборки рибосом. На билиарных полюсах гепатоцитов наблюдались обилие вторичных лизосом и структурных элементов гиперплазированного комплекса Гольджи с расширенными по периферии и содержа-

щими хлопьевидный материал диктиосомы, в везикулярной части регистрировались многочисленные окаймленные везикулы. Пространства Диссе сохранялись суженными. Эндотелиоциты синусоидов были представлены преимущественно активированными формами. В некоторых случаях отмечалось тотальное разрушение эндотелиальной выстилки синусоидных капилляров с активацией в участках клеток Купфера и нейтрофилов. Среди мигрирующих из синусоидов клеток часто встречались лимфоциты, образовывавшие в ряде случаев протяженные цитоплазматические выросты, позволяющие им внедряться между гепатоцитами, нарушая межклеточные контакты.

Важной особенностью циклофосфамидного поражения печени была массивная обтурация (преимущественно клетками Купфера и лимфоцитами) синусоидных капилляров, которая носила распространенный характер.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что циклофосфамид вызывает значительные морфофункциональные изменения печени, сходные с таковыми при действии других противоопухолевых препаратов [3, 4], и обусловленные изменениями тонкой структуры двух основных клеточных популяций – гепатоцитов и эндотелиоцитов синусоидов и реактивными изменениями мигрирующих в пространство Диссе клеток Купфера, лимфоцитов, плазмоцитов. Возможным механизмом длительного повреждающего воздействия однократного введения циклофосфамида может быть несостоятельность репарации основного звена сосудистого русла печени – синусоидов, эндотелий которых активно разрушается циклофосфамидом [8].

#### Список литературы

1. Ефремов А.В., Кунц Т.А., Овсянко Е.В., Ищенко И.Ю., Пустоветова М.Г. Применение циклофосфана для ограничения роста карциносаркомы Walker 256 у крыс усугубляет паранеопластические ультраструктурные нарушения в печени // Сибирский научный медицинский журнал. – 2012. – Т. 32, № 4. – С. 32–36.
2. Лушникова Е.Л., Овсянко Е.В., Непомнящих Л.М., Ефремов А.В., Морозов Д.В. Пролiferация клеток карциносаркомы Walker 256: влияние общей гипертермии и противоопухолевых агентов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 3. – С. 159–166.
3. Молодых О.П., Лушникова Е.Л., Клиникова М.Г., Непомнящих Л.М. Структурная реорганизация печени крыс при цитотоксическом действии доксорубина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 5. – С. 579–585.
4. Молодых О.П., Лушникова Е.Л., Клиникова М.Г., Непомнящих Л.М. Внутриклеточная реорганизация гепатоцитов при воздействии доксорубина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 10. – С. 464–472.

5. Эпштейн О.И., Дыгай А.М., Сергеева С.А., Жданов В.В., Хричкова Т.Ю., Ставрова Л.А., Зюзьков Г.Н., Удут Е.В., Симанина Е.В. Влияние препарата сверхмалых доз антител к циклофосфану на миелотоксичность циклофосфана в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 3. – С. 295–299.

6. Björnsson E.S. Drug-induced liver injury: an overview over the most critical compounds // *Arch Toxicol.* – 2015. – Vol. 89(3). – P. 327–334.

7. DeLeve L.D., Shulman H.M., McDonald G.B. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease) // *Semin Liver Dis.* – 2002. – Vol. 22(1). – P. 27–42.

8. Malhi H., Annamaneni P., Slehria S., Joseph B., Bhargava K.K., Palestro C.J., Novikoff P.M., Gupta S. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver // *Hepatology.* – 2002. – Vol. 36(1). – P. 112–121.

9. Metushi I.G., Hayes M.A., Uetrecht J. Treatment of PD-1(-/-) mice with amodiaquine and anti-CTLA4 leads to liver injury similar to idiosyncratic liver injury in patients // *Hepatology.* – 2015 Vol. 61(4). – P. 1332–1342.

10. Sasaki E., Iwamura A., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Kume T., Yokoi T. Role of cytochrome P450-mediated metabolism and identification of novel thiol-conjugated metabolites in mice with phenytoin-induced liver injury // *Toxicol. Lett.* – 2014. – Vol. 232(1). – P. 79–88.

### References

1. Efremov A.V., Kunts T.A., Ovsyanko E.V., Ischenko I.Ju., Pustovetova M.G. *Sibirskiy nauchny meditsinskiy zhurnal*, 2012, vol. 32, no 4, pp. 32–36.

2. Lushnikova E.L., Ovsyanko E.V., Nepomnyashchikh L.M., Efremov A.V., Morozov D.V. *Kletochnie tehnologii v biologii i meditsine – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2011, no 3, pp. 159–166.

3. Molodykh O.P., Lushnikova E.L., Klinnikova M.G., Nepomnyashchikh L.M. *Byulleten eksperimentalnoy biologii*

*i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2006, vol. 141, no 5, pp. 579–585.

4. Molodykh O.P., Lushnikova E.L., Klinnikova M.G., Nepomnyashchikh L.M. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2007, vol. 144, no 10, pp. 464–4725.

5. Epshteyn O.I., Digay A.M., Sergeeva S.A., Zhdanov V.V., Khriчkova T.Yu., Stavrova L.A., Zyuzkov G.N., Uдут E.V., Simanina E.V. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2009, vol. 147, no 3, pp. 295–299

6. Björnsson E.S. *Arch Toxicol.*, 2015, vol. 89(3), pp. 327–334.

7. DeLeve L.D., Shulman H.M., McDonald G.B. *Semin Liver Dis.*, 2002, vol. 22(1), pp. 27–42.

8. Malhi H., Annamaneni P., Slehria S., Joseph B., Bhargava K.K., Palestro C.J., Novikoff P.M., Gupta S. *Hepatology*, 2002, vol. 36(1), pp. 112–121.

9. Metushi I.G., Hayes M.A., Uetrecht J. *Hepatology*, 2015, vol. 61(4), pp. 1332–1342.

10. Sasaki E., Iwamura A., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Kume T., Yokoi T. *Toxicol. Lett.*, 2014, vol. 232(1), pp. 79–88.

### Рецензенты:

Волков А.М., д.м.н., заведующий лабораторией патоморфологии и электронной микроскопии, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, г. Новосибирск;

Поляков Л.М., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биохимии», г. Новосибирск.