

УДК 616.36-091(035):577.24

*С.В.Сазонов, Н.А.Серов, А.П.Ястребов*

## **ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ АКТИВНЫМ ГЕПАТИТОМ**

*ЦНИЛ, кафедры внутренних болезней N1 и патологической физиологии УИМА*

При воспалительном процессе, протекающем в печени при хроническом активном гепатите (ХАГ), в ткани отмечаются дистрофия и ступенчатый некроз печеночных клеток различной степени выраженности [6,8,12]. Обычно выделяют три степени активности ХАГ [10], и каждой степени соответствует свой объем поврежденной массы печени. С другой стороны, гибель гепатоцитов определяет стимуляцию, индукцию в ткани поврежденного органа регенераторных процессов. В печени появляются крупные гепатоциты с большими ядрами и ядрышками, которые часто образуют в паренхиме островки - регенераты, увеличивается число двуядерных клеток, происходит утолщение печеночных балок. Отмечаются существенные перестройки в структуре плоидности гепатоцитов, изменяется активность процессов внутриклеточной регенерации [3,4,7]. Заболевание ХАГ часто протекает на фоне уже существующих в печени изменений. У больных может быть различным исходное состояние процессов физиологической регенерации, т.к. известно, что эти процессы претерпевают значительные изменения с возрастом [5]. В ходе старения человека усиливаются процессы полиплоидизации клеток печени, увеличивается число одноклеточных тетраплоидных гепатоцитов, причем диплоидные клетки непосредственно превращаются в тетраплоидные, минуя стадию двуядерности. Однако проведение комплексного исследования по изучению возрастных особенностей развития регенераторных процессов в печени больных ХАГ затруднено, т.к. оно подразумевает выполнение прижизненной диагностической пункционной биопсии, что определяет небольшой объем получаемого материала для проведения исследований. Учитывая низкую скорость процессов клеточного обновления в печени, достоверно оценить состояние регенераторных процессов обычными, применяемыми с этой целью, методами не представляется возможным. Внедрение в клинику метода проточной ДНК-цитометрии позволило одновременно с патоморфологическими исследованиями определять распределение гепатоцитов по классам плоидности, т.е. появилась возможность судить о состоянии процессов клеточной регене-

раши без дополнительного забора материала у больного [8,9].

Нами обследовано 72 больных ХАГ вирусной этиологии в возрасте от 17 до 62 лет мужского пола. Больные были распределены на три группы, соответствующие трем основным периодам жизни человека: первая группа - период развития (роста) до 20 лет, вторая - репродуктивный период (период зрелости) до 50 лет и третья - период старения [5]. Проведено гистологическое и морфометрическое исследование гепатобиоптатов. Морфометрия проводилась с использованием 100-точечной сетки Г.Г.Автандилова [1] в 10 полях зрения на пяти срезах каждого больного (анализировалось 5000 точек). С помощью окуляр-микрометра определяли размеры печеночных клеток и их ядер, рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение, процентное соотношение одноклеточных и двуядерных гепатоцитов. Процессы клеточной регенерации в гепатоцитах изучали с помощью метода проточной ДНК-цитометрии [11,13], позволяющей объективно оценивать как полиплоидизацию, так и синтетические процессы в клетке. На ДНК-гистограммах определяли плоидность клеток и их распределение по периодам митотического цикла у 37 больных из всех трех групп.

Основная проблема, с которой сталкивается исследователь, пытающийся показать особенности изменения того или иного показателя в неоднородной группе, это адекватность получаемых в процессе анализа данных. В конечном итоге возникает вопрос: насколько объективно отражают полученные результаты изучаемый процесс, закономерность, не произошло ли в результате избирательного подбора в группы случаев определенной селекции показателей? Так, распределение изучаемых случаев по возрастным группам указывает на различия в структуре частоты их встречаемости в зависимости от степени активности ХАГ (табл. 1).

Как видно из данных табл. 1, наибольшее число случаев ХАГ в первой возрастной группе приходится на умеренную степень активности. Число таких больных больше в 3 и 6 раз, чем, соответственно, при минимальной и выраженной степени активности патологического процесса. Наиболее равномерным распределение больных по степени активности оказалось в средней возрастной группе. Однако и в этом случае разница между частотой встречаемости ХАГ минимальной и выраженной степени активности составляет почти 1,7 раза. В то же время состояние регенераторных процессов в печени в значительной мере зависит от степени активности патологического процесса (табл. 2). Поэтому преобладание в структуре возрастных групп той или иной степени активности ХАГ может дать неправильные представления об изучаемых

Таблица 1

Распределение исследований по возрастным группам и степени активности ХАГ

Группа (возраст)	Распределение наблюдений %	Распределение по степени активности, %		
		Минимальная	Умеренная	Выраженная
Молодой	22,2	22,2	66,6	11,2
Средний	55,6	40,0	35,0	25,0
Старший	22,2	55,6	44,4	-

Таблица 2

Результаты проточной ДНК-цитометрии клеток печени у больных ХАГ (M ± m)

Степень активности процесса	Средний возраст (годы)	Cv	ПЛОИДНОСТЬ КЛЕТОК		
			2n-4n	4n	>4n
Минимальная	45,0±3,36	5,2	1,5 ± 0,23	9,0 ± 1,17	2,7± 0,56
Умеренная	32,5±3,89*	5,3	2,3 ± 0,39	13,9 ± 1,28	4,6± 0,80
Выраженная	34,5 ±4,68	5,4	3,1 ± 0,51*	24,4 ± 1,77	10,6± 1,53*

Примечание: Cv - среднее значение коэффициент вариации основного (диплоидного) пика клеток; \* - при p<0,05 между показателями сравниваемой группы и ХАГ минимальной степени активности.

Таблица 3

Распределение больных по возрастам при ХАГ различной степени активности

Степень активности	Распределение наблюдений	ВОЗРАСТ %		
		молодой	средний	старший
Минимальная	39,3	13,3	53,3	33,4
Умеренная	45,4	35,3	41,2	23,5
Выраженная	15,3	16,6	83,3	----

Таблица 4

Результаты проточной ДНК-цитометрии клеток печени у больных ХАГ с умеренной степенью активности (M ± m)

Возраст	Cv,%	ПЛОИДНОСТЬ КЛЕТОК		
		2n - 4n %	4n %	> 4n %
Молодой	5,6	2,3 ± 9,44	9,9 ± 1,4	3,4 ± 0,99
Средний	5,5	1,9 ± 0,52	16,6 ± 1,46*	4,6 ± 1,10
Старший	3,9	1,3 ± 0,27*	15,6 ± 1,89*	4,8 ± 1,59

Примечание: \* - при p<0,05 между показателями сравниваемой и первой возрастной группы.

возрастных закономерностях процесса регенерации. Разный же средний возраст больных в группах позволяет говорить о возрастных особенностях частоты развития той или иной степени активности ХАГ. Более подробно это положение обосновано результатами, приведенными в табл. 3.

При анализе полученных данных становится понятно, что изучение зависимости состояния регенераторных процессов от возраста возможно только в пределах одной группы, сформированной по степени активности патологического процесса в печени больных. Для исследований была выбрана группа больных с умеренной степенью активности ХАГ, т.к. в нее вошло наибольшее

число обследованных и наблюдалось наиболее равномерное распределение их по возрастам. Анализ данных, полученных при проведении проточной ДНК-цитометрии (табл. 4), позволяет говорить о меньшем низком числе клеток промежуточной ploидности и увеличении количества тетраплоидных гепатоцитов в печени у больных из старших возрастных групп с ХАГ умеренной степени активности. Несмотря на то, что различия в числе гиперплоидных гепатоцитов среди исследованных групп недостоверны, прослеживается четкая тенденция увеличения числа полиплоидных клеток с возрастом. Результаты морфометрического исследования гепатоцитов представлены в табл.5.

Таблица 5

Морфометрические показатели гепатоцитов в печени больных ХАГ умеренной степени активности ( $M \pm m$ )

ВОЗРАСТ	Плоидность клеток	Соотношение %	Площадь клетки мкм <sup>2</sup>	
			ядро	цитоплазма
МОЛОДОЙ	2n	82,4 ± 2,58	82,4 ± 0,55	637,3 ± 18,06
	4n	8,8 ± 2,21	102,7 ± 1,93	712,1 ± 14,23
	2n2n	7,8 ± 0,79	81,7 ± 0,32	765,8 ± 16,08
	4n4n	----	----	----
	8n	3,5 0,90	128,7 1,90	845,4 30,96
	8n8n	----	----	----
среднее	----	----	85,5 ± 0,41	641,9 ± 1,09
СРЕДНИЙ	2n	68,5 ± 3,59*	83,1 ± 0,17	633,4 ± 16,47
	4n	16,7 ± 4,04	105,1 ± 1,82	749,5 ± 26,18
	2n2n	12,9 ± 2,36*	81,7 ± 0,28	854,8 ± 4,81*
	4n4n	8,5 ± 0,92	106,7 ± 4,55	892,2 ± 23,43
	8n	----	----	----
	8n8n	----	----	----
среднее			88,2 ± 2,12	695,3 ± 7,11*
СТАРШИЙ	2n	65,8 ± 3,18*	82,3 ± 0,55	643,7 ± 6,67
	4n	15,0 ± 3,38	102,8 ± 2,99	804,1 ± 18,83*
	2n2n	14,3 ± 2,27*	80,8 ± 1,08	813,5 ± 8,43*
	4n4n	3,3 ± 0,95	105,1 ± 1,96	819,2 ± 4,08
	8n	2,4 ± 1,08	133,5 ± 2,07	845,4 ± 11,69
	8n8n	----	----	----
среднее			86,9 ± 1,86	715,9 ± 10,66*

Примечание: \* - при  $p < 0,05$  между показателями сравниваемой и первой возрастной группы.

При развитии ХАГ в печени больных среднего старшего возраста происходит перераспределение гепатоцитов по степени плоидности их ядер. Увеличивается количество одноядерных тетраплоидных гепатоцитов, двудерных клеток с диплоидными ядрами, появляются октаплоидные гепатоциты (как одноядерные, так и двудерные). Это происходит на фоне снижения числа диплоидных одноядерных гепатоцитов. С возрастом увеличиваются размеры клеток, в первую очередь за счет тетраплоидных гепатоцитов (одноядерных и двудерных). При этом размеры других клеток достоверно не изменяются.

Таким образом, развитие патологического процесса в печени зависит не только от степени его активности, но и от возраста больного ХАГ. В свою очередь каждая выделенная возрастная группа характеризуется особым состоянием регенераторных процессов в органе. В период развития организма (до 20 лет) происходит увеличение числа и размеров клеток, их дифференцировка, увеличение размеров организма и рост его органов. Масса печени к концу этого периода увеличивается в 10-13 раз и достигает 1300-1800 г. Примерно до 6 лет в печени присутствуют только диплоидные ядра. Тетраплоидные клетки появляются в паренхиме с 10-13 лет, а октаплоидные - лишь в самом конце периода развития. Даже в конце перио-

да развития, когда завершается рост органов, число диплоидных клеток превышает 95%, поэтому полиплоидия не играет существенной роли в постнатальном росте печени человека [6]. Развитие патологического процесса в печени при ХАГ приводит к повреждению и гибели гепатоцитов паренхимы органа. Процессы повреждения в печени индуцируют регенерацию, причем активность ее напрямую зависит от степени повреждения ее ткани.

Анализ регенераторных процессов у больных ХАГ с умеренной активностью процесса зовил определить их возрастные особенности. В молодом возрасте стимуляция процессов клеточной регенерации осуществляется путем выхода клеток в митоз и эндомитоз, прохождения ими периода синтеза ДНК, за счет чего в печени поддерживается популяция диплоидных одноядерных клеток и увеличивается доля полиплоидных гепатоцитов. При этом появляются гепатоциты с полиплоидными ядрами, не встречающимися в печени здоровых людей в этом возрасте. Полиплоидные клетки отличаются большими размерами, большим объемом цитоплазмы, ядра, они более функционально активны. Однако в молодом возрасте роль митоза в развитии компенсаторно-испособительного процесса в поврежденной печени остается достаточно существенной и процессы полиплоидии менее выражены, чем в более старших возрастных группах. После

завершения периода роста наступает период зрелости, который продолжается примерно до 50 лет. Печень в этот период не увеличивается в размерах, ее паренхима представлена главным образом клетками с диплоидными ядрами, доля тетраплоидных ядер не превышает 5-7%, диплоидных - 80-90%, а относительное количество двуядерных клеток нарастает очень медленно. Физиологическая регенерация в печени осуществляется за счет пролиферации одноядерных диплоидных гепатоцитов [5]. Развитие патологического процесса в этот возрастной период приводит к резкому усилению процесса полиплоидизации гепатоцитов, увеличению числа тетраплоидных клеток (как одноядерных, так и двуядерных). Это происходит на фоне снижения выхода клеток в митотический цикл и уменьшения числа синтезирующих ДНК клеток, что свидетельствует о преобладании в регенераторном процессе явления эндомитоза. При этом тетраплоидные гепатоциты имеют, по сравнению с такими же клетками из печени молодых больных ХАГ, более крупные размеры, что позволяет говорить об активации процессов внутриклеточной регенерации. В периоде старения (после 50 лет) в печени нарастают склеротические изменения ткани, отмечается атрофия органа, уменьшается число клеток и снижается масса органа. В этот период в паренхиме печени присутствуют ядра трех классов плоидности. Значительно уменьшается (на 11,5-13,0%) число диплоидных клеток, количество двуядерных гепатоцитов возрастает почти в 2 раза по сравнению с показателями в группе зрелого возраста, еще больше увеличивается число тетраплоидных клеток (до 7,0-9,2%). После 80 лет отмечается появление отдельных октаплоидных гепатоцитов [6]. Развитие в такой печени ХАГ приводит к стимуляции регенерации, основные особенности которого напоминают этот процесс в предыдущей группе (у больных среднего возраста). На фоне ослабления синтетических процессов происходит развитие полиплоидии гепатоцитов, преимущественно за счет тетраплоидных (однойядерных и двуядерных), появляются октаплоидные (так-же двуядерные и одноядерные) клетки, что сопровождается уменьшением числа диплоидных гепатоцитов. Эти же тетраплоидные клетки характеризуются достоверно большими размерами, что является на клеточном уровне проявлением стимуляции процессов внутриклеточной регенерации.

Таким образом, состояние регенерации в поврежденной печени в значительной мере зависит от возраста больного. В молодом возрасте регенерация осуществляется путем клеточного деления и полиплоидизации гепатоцитов. Явления внутриклеточной регенерации остаются на обычном уровне. В регенерации в основном участвуют диплоидные гепатоциты. В более старших возрастных

группах митотическая активность в паренхиме печени снижается, а на первый план выходят явления полиплоидии и клеточной гипертрофии. При этом наиболее активное участие в регенерации принимают тетраплоидные гепатоциты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Канунго М. Биохимия старения. М.: Мир, 1982. 296 с.
3. Карташова О.Я. Регенерация гепатоцитов при заболеваниях человека/ В сб.: Сравнительные аспекты изучения регенерации и клеточной пролиферации. М., 1985. Ч.1. С.119-121.
4. Кудрявцев Б.Н., Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э., Смирнова С.А., Скорина А.Д. Полиплоидия в печени человека в норме и при хроническом гепатите// Цитология. 1982. Т.24, N4. С.436-443.
5. Кудрявцев Б.Н., Кудрявцева М.В., Сакута Г.А., Штейн Г.И. Кинетика клеточной популяции паренхимы печени человека в разные периоды его жизни//Цитология. 1991. Т.33, N 8. С.96-109.
6. Общая патология человека: Руководство для врачей/Под ред. А.И.Струкова, В.В.Серова, Д.С.Саркисова в 2 т. Т.2. АМН СССР. М.: Медицина, 1990. 416 с.
7. Подымова С.Д. Болезни печени. М.: Медицина, 1993. 544 с.
8. Серов Н.А., Сазонов С.В., Максимова Э.А., Бродская И.К., Валамина И.Е. Морфо-функциональные критерии дифференциальной диагностики хронических гепатитов и компенсированных циррозов печени//Вестник Уральской государственной медицинской академии. Екатеринбург. 1995. Вып.1. С.183-185.
9. Цвиренко С.В., Сазонов С.В., Серов Н.А. Диагностическое значение исследования плоидности гепатоцитов//30 лет Центральной научно-исследовательской лаборатории УГМИ:Тез.докл.научн.конф.Екатеринбург, 1994. С. 59-60.
10. Bianchi L., De Groot J., Desmet N.J. et al. Acute and chronic hepatitis revisited//Lancet. 1977. V.2. P.914-919.
11. Givan A.L. Flow cytometry: first principles. New York, 1992. 202 P.
12. Sherlock S. Diseases of the liver and biliary system. Blackwell, 1989. 287 p.
13. Taylor W., Milthorpe B.K. An evaluation of DNA fluorochromes, staining techniques and analysis for flow cytometry//J.Histochem.Cytochem. 1980. V.28. P.1224-1232.