

**ДОСВІД ЗАСТОСУВАННЯ КОМП'ЮТЕРНОЇ МОРФОМЕТРІЇ
В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ І КЛІНІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ
ПАТОЛОГІЧНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ**

**С. Б. Геращенко, О. І. Дельцова, А. Д. Захараш,
Г. Б. Кулинич, О. Р. Кушнір**

*Івано-Франківський національний медичний університет;
кафедра гістології, цитології та ембріології;
76018, Івано-Франківськ, вул. Галицька 2*

У статті висвітлені можливості застосування морфометричного методу дослідження печінки в клінічних і експериментальних умовах (біопсійний матеріал від 8 осіб у клініці та від 93 щурів в експерименті). Результати показали морфометричні зміни площі і форми профілів гепатоцитів та їх ядер. Комплексний морфометричний аналіз стану печінки при її захворюваннях у клініці та при моделюванні впливів різних токсичних речовин є високоінформативним інструментом діагностики уражень гепатоцитів, який дозволяє чітко диференціювати характер морфологічних змін у розгортанні патологічного процесу, оцінити ступінь їх важкості і результати корекції лікарськими засобами. На підставі морфометричних досліджень експериментального матеріалу можна передбачити можливості патогенетичної корекції стану печінки в клініці.

Ключові слова: печінка, патологія, морфометричний аналіз.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень. До цього часу при аналізі морфологічних змін у печінці користуються ранговими системами обліку патологічних процесів, тобто напівкількісними методами. Про ступінь активності судять за кількістю балів. При патогістологічному дослідженні біопсійного матеріалу печінки клінічні патологи насамперед визначають індекс гістологічної активності при хронічному гепатиті за R.G. Knodell et al. [7], який вимірюється в балах на основі напівкількісного дослідження (індекс Knodell). Сьогодні в клініцистів виникають розбіжності в інтерпретації деяких результатів бальних оцінок [1]. Хоча автори критикують напівкількісні методи дослідження і пропонують розширити їх більш вірогідними [5], але до цього часу не існує загальноприйнятих алгоритмів морфометричного дослідження стану печінкових клітин із використанням спеціальних сучасних програм для точного математичного і статистичного аналізу.

Метою роботи було вивчити можливості застосування комп'ютерного морфометричного аналізу гістологічних препаратів печінки в експериментальному і клінічному матеріалі.

Матеріал і методи дослідження.

Матеріалом клінічного дослідження був біопсійний матеріал печінки 5 хворих на хронічний гепатит невірусної етіології з холестатичним компонентом (контроль – шматочки печінки 3 чоловіків-добровольців без клінічних, біохімічних та лабораторних проявів пошкодження органа).

В експерименті вивчали печінку 43 білих рандомбредних щурів-самців (*Rattus Norvegicus L.*) (I група), яким вводили хіміопрепарат Цисплатин-КМП (№ P.09.03/07324) (Цп) внутрішньоочеревино в дозі 2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень, 9 тижнів (Ia група, 23 тварини). Ib група – 20 тварин, які отримували Ентеросгель (№ UA/4415/01/01, “Екологоохоронна фірма Креома-фарм”) (Ег) по 1,5 мл 50% водного розчину гідрогелю метилкремніевої кислоти (0,7 г діючої речовини), внутрішньошлунково щодня, 14 днів після останнього введення цисплатину. Забір матеріалу проводили на 3-ю, 7-у, 14-у, 21-у і 28-у доби після останнього введення Цп і на 3-ю, 7-у, 14-у, 21-у і 28-у доби від початку введення Ег. Тварин виводили з експерименту шляхом передозування ефірного наркозу.

Вплив пестициду 2,4-Д на печінку моделювали на 50 щурах (II група). Пестицид 2,4-Д вводили внутрішньошлунково в дозі 1/10 DL₅₀ протягом 14 діб через день. У IIa групі тварин вивчали структуру гепатоцитів після введення пестициду. У IIб групі тваринам після останнього введення пестициду вводили глутаргін внутрішньоочеревино (0,2 мл 4% розчину глутаргіну разом із 1,4 мл ізотонічного розчину NaCl) протягом 5 діб щодня. Термін досліду – 1,3,7,14, 21,28 і 60 діб.

Утримання щурів і маніпуляції проводили відповідно до “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.) та вимог додатку 4 до “Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин”, затверджених наказом Міністерства охорони здоров’я № 755 від 12 серпня 1977 р. “Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин”, що узгоджується з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985 р.).

Зрізи, забарвлені гематоксилином і еозином, підлягали морфометричному дослідженню за допомогою аналізатора зображень на базі програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool[®]. Визначали такі показники: S₁ – площу профілю гепатоцитів та S₂ – їх ядер, S₁/S₂ – співвідношення між площею профілю ядра і площею профілю гепатоцита, F₁ – коефіцієнт форми гепатоцита та F₂ – його ядра (F=P/4πS, де P – периметр, S – площа досліджуваного об’єкта) [2]. Для кожного випадку було зроблено виміри 500-600 одноядерних гепатоцитів, в ядрі яких визнача-

лось ядере. Цифровий матеріал обробляли методами варіаційної статистики, використовуючи програму Statistica for Windows® для персонального комп'ютера. Результати морфометричного дослідження представлені гістограмами.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дослідження клінічного (біопсійного) матеріалу при хронічному гепатиті з холестатичним компонентом виявили дрібні за розмірами зморщені та великі за розмірами набряклі гепатоцити. Проведений нами морфометричний аналіз підтвержує, що гепатоцити переважно зменшуються в розмірах до 100,0-150,0 мкм², тільки поодинокі з них досягають розмірів понад 200,0 мкм². Тобто при аналізі процентного складу гепатоцитів за розмірами привертає увагу велика кількість дрібних, порівняно з нормою, клітин.

При досліджуваній патології вираженими також є зміни площі профілів ядер. При якісному аналізі важко оцінити подібні прояви. Кількісний аналіз показав, що домінуючими є пошкодження ядер, які полягають у зменшенні площі їх профілів та значної деформації, що є характерним для процесу зморщення. Лише невелика кількість гепатоцитів (8,0%) зберігає величину ядра типову для нормальних клітин (від 30,0 до 50,0 мкм²), тоді як у нормі таких гепатоцитів налічується 60,4%.

При хронічному гепатиті ми виявили значні зміни показника $S_{я}/S_{кл}$. Це вказує на переважаюче зменшення об'ємів ядра, порівняно з об'ємом цитоплазми гепатоцитів.

Значно порушується форма гепатоцитів. Коефіцієнт F_1 віддаляється від величини 1,0. У гістограмі показника форми ядра ми спостерігали подібну спрямованість – величина цього коефіцієнту збільшувалася аж до 1,50, чого не виявляється за умов норми (не перевищує 1,20).

Одержані нами результати дають підстави погодитись з дослідниками, які наголошують на тому, що при проведенні морфометричного дослідження усувається вплив суб'єктивного фактору при оцінці морфологічних змін [6]. Динаміка морфометричних змін площі профілів гепатоцитів та їх ядер у наших дослідженнях співзвучна з результатами інших вчених, які визначали морфологічну характеристику тривалого холестатичного синдрому в хворих на гепатит А на тлі носійства HBV-інфекції [3]. Е.Л. Пименова и др. [4] наполягають, що для оцінки гепатоцелюлярної карциноми в статистичному аналізі виділені три найбільш значимих параметри: площа і периметр ядра та ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Ми схильні до думки, що в характеристиці гепатоцитів, крім зазначених ними, не менш важливими є показники площі клітини та її форми та розміри і форма ядра.

У динаміці розвитку хронічного гепатиту з холестатичним компонентом виявляються морфологічні зміни гепатоцитів, які підтвержуються виразними змінами морфометричних показників. У сукупності ці відхилення можна трактувати як зменшення робочої паренхіми печінки,

навіть на тих етапах, коли не виявляються ділянки новоутвореної сполучної тканини в печінкових часточках. У перспективі подальших досліджень захворювань печінки запропонований морфометричний підхід є об'єктивним і суттєвим доповненням до якісної характеристики стану гепатоцитів.

Морфометричні результати вивчення впливу цисплатину на гепатоцити та при їх корекції ентеросгелем. У результаті введення тваринам цисплатину протягом 9 тижнів у печінці відбувалися значні порушення гістотопографії печінкових часточок – дисконкомплексация печінкових пластинок, внутрішньочасточкові лімфоїдні інфільтрати, дистрофічні, некробіотичні та некротичні зміни гепатоцитів усіх зон, активація макрофагів до 14 доби після останнього введення хіміопрепарату. У міжчасточковій сполучній тканині і в порталних трактах – набряк і лімфо-плазмоцитарна інфільтрація при збережених печінкових триадах. Синусоїдні гемокапіляри нерівномірно розширені в усіх зонах печінкового ацинуса з поширенням деформації і повнокров'я на центральні і міжчасточкові вени. Комп'ютерний морфометричний аналіз гістологічних зрізів печінки в усі терміни експерименту виявив метричні порушення гепатоцитів. У динаміці досліду до 14 доби простежувалася тенденція до збільшення числа печінкових клітин із великою площею профілю та ядра й одночасного зменшення кількості малих і середніх гепатоцитів. Коефіцієнт форми гепатоцитів та ядер зростав, що свідчило про порушення форми гепатоцитів та їхніх ядер. Отримана морфофункціональна характеристика змін печінки під впливом цисплатину та результати комплексного морфологічного і морфометричного дослідження некоригованих і коригованих ентеросгелем гепатотоксичних проявів показали, що застосовані методи дозволили об'єктивно оцінити зміни структурних компонентів печінки у взаємозв'язку з їх функціональною здатністю, довести позитивний вплив сорбенту в перші 14 діб лікування після припинення введення цисплатину і неспроможність нормалізації морфо-функціонального стану печінки в подальші терміни. Це служить обґрунтуванням доцільності застосування ентеросгелю при ятрогенних ураженнях печінки більш тривалі, ніж 14 діб, терміни.

Морфометричні показники печінки щурів при впливі пестициду 2,4-Д. Під впливом пестициду 2,4-Д у печінці розвивався токсичний гепатит: виявлено порушення цитоархітектоніки печінкових пластинок і їх лімфо-плазмоцитарну інфільтрацію, набряк, деформацію гепатоцитів та їх ядер, як під час введення пестициду 2,4-Д (14 діб), так й у відновному періоді. Від 21-ї до 30-ї доби набряк зменшувався і поступово проявлялись ознаки адаптаційних і компенсаторних процесів, підтверджені морфометрично. На 60-у добу досліду в печінці визначалися залишкові ознаки – дрібновакуольна дистрофія, слаба інфільтрація лімфоцитами і плазмоцитами, недосягнення гепатоцитами нормальних клітинних параметрів.

Нами встановлено, що корекція глутаргіном позитивно впливає на стан гепатоцитів, які були пошкоджені в результаті токсичної дії пестициду 2,4-Д, що підтверджено морфометричними дослідженнями гепатоцитів та їх ядер, показника ядерно-клітинного співвідношення гепатоцитів. При введенні глутаргіну одночасно з пестицидом 2,4-Д адаптаційні та компенсаторно-приспосувальні зміни в гепатоцитах були помірними протягом 30 діб: набряк зменшився, форма гепатоцитів і їх ядер зберігала стабільність розподілу на гістограмах і підтверджувалася змінами кореляційної залежності між морфометричними показниками на протилежну, виявлялися гіпертрофічні зміни органел, збільшилися розміри ядер, які дестабілізувалися після припинення введення глутаргіну. Результати проведених дослідів із внутрішньоочеревинною корекцією глутаргіном після останнього введення пестициду 2,4-Д показали, що цей спосіб введення мав позитивні наслідки, які проявлялися швидкою нормалізацією стану паренхіми печінки, розвитком у гепатоцитах компенсаторних реакцій, утримання морфометричних показників на рівні контролю до 21-ї - 30-ї доби після останнього введення глутаргіну.

Висновки.

1. Комплексний морфометричний аналіз стану печінки при її захворюваннях у клініці та при моделюванні впливів різних токсичних речовин є високоінформативним інструментом діагностики уражень гепатоцитів, який дозволяє чітко диференціювати зміни характеру морфологічних змін у розгортанні патологічного процесу, оцінити ступінь їх важкості і результати їх корекції лікарськими засобами.

2. На підставі морфометричних досліджень експериментального матеріалу можна передбачити можливості патогенетичної корекції стану печінки в клініці.

Література

1. Балльная система оценки морфологических изменений печени при хроническом гепатите // РЖГГК. – 2004. – №2. – С. 4-8.
2. Исаков В.Л. Современные методы автоматизации цитологических исследований / В.Л.Исаков, В.Г.Пинчук, Л.М.Исакова. – К.:Наукова думка, 1988. – 212 с.
3. Клинико-морфологическая характеристика длительного холестатического синдрома у больных гепатитом А на фоне носительства HBV-инфекции / Н.Д.Никифоров, М.Н.Трофимова, Е.В.Иванников [и др.] // Архив патологии. – 2003. – №3. – С. 29-31.
4. Пименова Е.Л. Использование компьютерного image-анализа для дифференциальной диагностики гепатоцеллюлярной карциномы и гиперплазии гепатоцитов/ Е.Л.Пименова, В.Н.Богатырев, О.В.Чистякова // Клиническая и лабораторная диагностика. – 2002. – №8. – С. 35-37.
5. 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.
6. Щербинина М.Б. Диагностические возможности и реальное использование в клинике пункционной биопсии печени / М.Б.Щербинина, И.В.Баринов, И.Я.Будзак // Сучасна гастроентерологія. – 2004. – №3(17). – С. 27-31.
7. Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis / R.G.Knodell, R.G.Ishak, W.C.Black [et al.] // Hepatology. – 1981. – Vol.1. – P. 431-435.

EXPERIENCE OF APPLYING COMPUTER MORPHOMETRY IN EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCHES OF PATHOLOGICAL CONDITIONS IN LIVER

**S. D. Geraschenko, O. I. Deltsova, A. D. Zakharash,
G. B. Kulynych, O. R. Kushnir**

*Ivano-Frankivs'k National Medical University; department of histology,
cytology and embryology; 76018, Ivano-Frankivs'k, Galytska str., 2*

In the article, the opportunities of applying morphometric methods of research in liver in clinical and experimental conditions (biopsy material attained from 8 individuals in clinic and 93 rats in experiment) are highlighted. The results showed morphometric changes in the area and shape of hepatocytes, and their nuclei. Complex morphometric analysis of liver's condition in its diseases in clinic, and in modeling the influence of different toxic substances is a highly informative instrument of diagnosing hepatocytes' damage which allows differentiating precisely the character of morphological changes in a pathological process development, estimating the degree of its gravity and appreciating the results of correction by medication. On the basis of morphometric research on experimental material it is possible to foresee the opportunities of pathogenetic correction of liver's condition in clinic.

Key words: *liver, pathology, morphometric analysis.*