

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Я. И. Новгородская (yananovogrodskaya@mail.ru),  
Р. И. Кравчук (rimma.kravchuk@yandex.ru), О. Б. Островская (astrowskaja@gmail.com),  
М. Н. Курбат (vwmisha@mail.ru)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*Введение.* Гипергомоцистеинемия – патогенетический фактор ряда заболеваний. Печень – ключевой орган в обмене гомоцистеина.

*Цель исследования* – изучить структуру печени крыс при гипергомоцистеинемии.

*Материалы и методы.* Гипергомоцистеинемию вызывали нагрузкой метионином. Печень подвергали морфологическому исследованию.

*Результаты.* Гипергомоцистеинемия индуцирует локальные структурные изменения микроциркуляторного русла печени, стимулирует фиброгенез. Основной популяции гепатоцитов присущи морфологические признаки, указывающие на возрастание биосинтетического и энергетического потенциала клеток. В части гепатоцитов отмечаются дистрофические изменения, затрагивающие в основном ядерный аппарат и митохондрии. Регистрируются особенные структурные изменения митохондрий и эндоплазматического ретикулума гепатоцитов.

*Заключение.* Выявлены специфические изменения структуры печени при гипергомоцистеинемии, вызванной нагрузкой метионином.

**Ключевые слова:** гипергомоцистеинемия, метионин, печень, ультраструктура, митохондрии, эндоплазматический ретикулум.

**Для цитирования:** Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии / Я. И. Новгородская, Р. И. Кравчук, О. Б. Островская, М. Н. Курбат // Гепатология и Гастроэнтерология. 2019. Т. 3, № 1. С. 93-98. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-93-98>

## MORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT LIVER IN HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Ya. I. Novogrodskaya, R. I. Kravchuk, O. B. Ostrowskaya, M. N. Kurbat  
Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

*Background.* Hyperhomocysteinemia is a pathogenetic factor of a number of diseases. The liver is a key organ in homocysteine metabolism.

*Objective* – to study the structure of rat liver in hyperhomocysteinemia.

*Materials and methods.* Hyperhomocysteinemia was induced by methionine load. The liver underwent a morphological study.

*Results.* Hyperhomocysteinemia produces local structural changes in the microvascular liver blood flow, stimulating fibrogenesis. The majority of hepatocytes are characterized by morphological signs indicating an activation of biosynthetic processes and energy production in cells. In some hepatocytes dystrophic changes are noted, affecting mainly the nuclear apparatus and mitochondria. Specific structural changes in the mitochondria and hepatocyte endoplasmic reticulum are registered.

*Conclusion.* The specific changes in the liver structure were registered in methionine load-induced hyperhomocysteinemia.

**Keywords:** hyperhomocysteinemia, methionine, liver, ultrastructure, mitochondria, endoplasmic reticulum.

**For citation:** Novogrodskaya YaI, Kravchuk RI, Ostrowskaya OB, Kurbat MN. Morphological changes in rats liver in hyperhomocysteinemia. *Hepatology and Gastroenterology*. 2019;3(1):93-98. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-93-98>

### Введение

В развитии соматической патологии существенная роль отводится механизмам, связанным с нарушениями метаболизма серо-содержащих аминокислот. Особая роль принадлежит метионину (Met) и продуктам его превращений. Синтез метионина возможен только из гомоцистеина (Hcy) [1,2]. Накопление Hcy в ор-

ганизме – следствие дисбаланса между уровнем его наработки и удаления. Особую роль в его синтезе и метаболизме отводят печени, в которой происходит большая часть реакций трансметилирования [3, 4]. Клетки печени экспрессируют гены, принимающие участие в обмене Met и Hcy [5]. Можно предположить, что повреждение печени может влиять на уровень Hcy. При

циррозе печени у человека доказаны изменения метаболизма Hsu, которые были связаны с подавлением экспрессии генов метионин-синтазы, бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы, цистатионин-β-синтазы [3]. Похожую картину наблюдали также при циррозе как вирусной, так и алкогольной этиологии [6]. В связи с тем, что гипергомоцистеинемия может являться патогенетическим фактором широкого круга патологий, представляет интерес ее экспериментальное моделирование, наиболее надежным способом которого является достижение значительного избытка метионина в тканях, что, предположительно, блокирует один из путей утилизации гомоцистеина – реметилирование [7]. Однако в доступной литературе практически отсутствуют данные о влиянии гипергомоцистеинемии, индуцированной метиониновой нагрузкой, на морфологические характеристики печеночной ткани.

**Цель исследования** – изучение влияния гипергомоцистеинемии на структуру печени крыс.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 18 белых нелинейных крысах-самцах массой 200-250 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и одобрено комитетом по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский университет». Крысы были разделены на 2 группы, по 9 особей в каждой. Животные опытной группы получали внутривенно Met в дозе 1,5 г/кг дважды в сутки в течение 21 суток. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество 0,9% раствора натрия хлорида аналогичным образом [7].

После декапитации у животных в крови определяли уровень общих Hsu и глутатиона [8]. Данные обрабатывали с помощью программы Statistica 10.0 (серийный номер AXAR207F394425FA-Q) с применением медианного теста Манна-Уитни. Гипергомоцистеине-

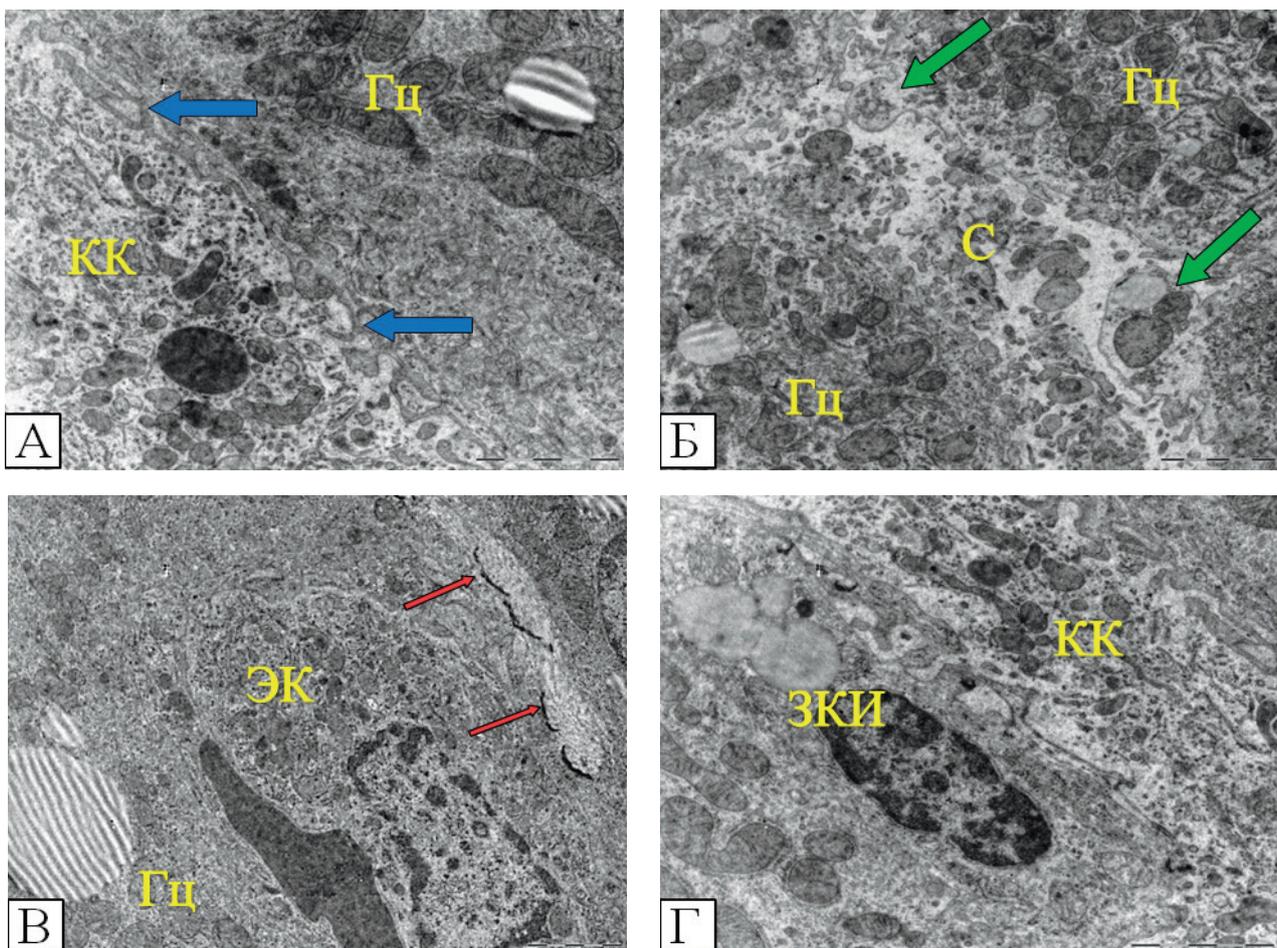


Рисунок 1. – Гипергомоцистеинемия. Ультраструктурные особенности микрососудистого русла. Электронограммы

А – Набухание и дезориентация отростков эндотелиальных клеток (ЭК, стрелки), активное состояние клетки Купфера (КК). Гц – гепатоцит. ×15 000; Б – Отек на сосудистом полюсе гепатоцитов и выбухание в просвет синусоидного капилляра фрагментов цитоплазмы, содержащих цитоплазматические компоненты и липидные включения (стрелки). ×12 000 В – Крупные пучки коллагеновых волокон в перикапиллярном пространстве (стрелки). ×8 000; Г – Активированная коллаген-продуцирующая звездчатая клетка Ито (ЗКИ). ×15 000

мия в опытной группе подтверждена уровнем Hcy (36,28 [32,29; 226,60] против 9,48 [34,8; 44,7] мкмоль/л,  $p < 0,05$ ).

Для гистологического исследования образцы печени фиксировали в 10% забуференном растворе формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования образцы фиксировали 1% раствором OsO<sub>4</sub> (Fluka, USA) и заливали в аралдитную смолу (Fluka, Germany). Срезы изготавливали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Germany), контрастировали и изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Japan).

### Результаты и обсуждение

У опытных животных при нагрузке метионином гистоструктура печени сохранялась, отмечалось расширение центральных вен, в сосудах – явления сладжа и венозного застоя. Внутри долек выявлялись многочисленные воспалительные очаги разных размеров, перипортальная лимфоцитарная инфильтрация была выра-

жена слабо. Делящиеся гепатоциты практически отсутствовали. Известно, что гипергомоцистеинемия вызывает угнетение митотической активности гепатоцитов мышей через снижение индукции циклина D1 и повышенную экспрессию p53 и p21Cip1 [9].

Гипергомоцистеинемия вызывала изменение ультраструктурной организации микроциркуляторного русла печени. В разных участках дольки регистрировались деструктивные изменения эндотелиальных клеток в виде набухания и дезорганизации их отростков (рис. 1А), сопровождаемые сужением перикапиллярного пространства Диссе, укорочением и редукцией микроворсинок со стороны гепатоцитов. Местами наблюдался отек на сосудистом полюсе гепатоцитов с выбуханием цитолеммы с фрагментами цитоплазмы (рис. 1Б). Одновременно в этих участках отмечалось возрастание фагоцитарной активности клеток Купфера, содержащих многочисленные электронно-плотные полиморфные мелкие гранулы и лизосомы.

Отмечалась умеренная активация фиброгенеза, о чем свидетельствовало формирование

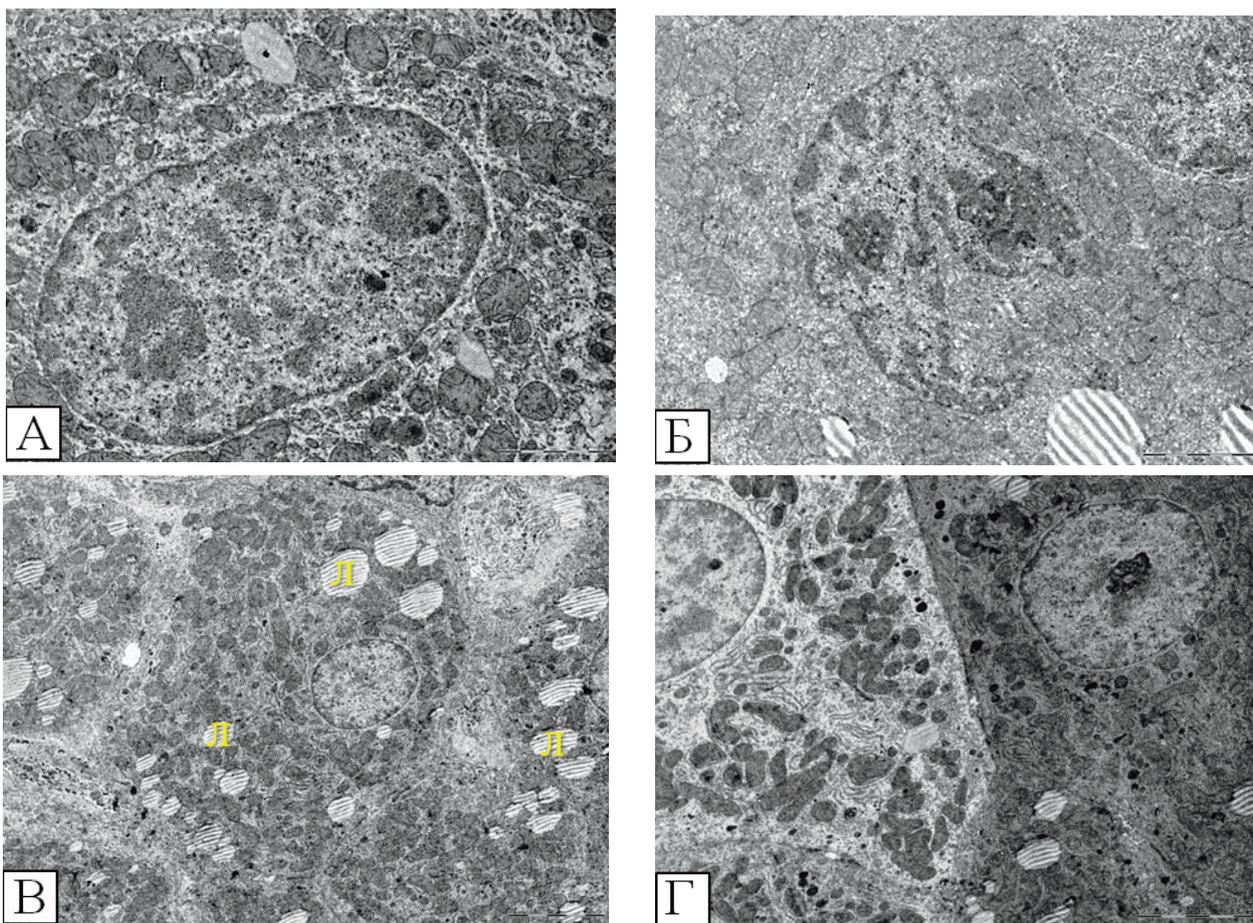


Рисунок 2. – Гипергомоцистеинемия. Ультраструктурные особенности цитоплазмы и ядерного аппарата гепатоцитов. Электронограммы

А – Крупное ядро с отсутствием глубоких инвагинаций и наличием многочисленных широких пор в кариолемме, содержащее крупные ядрышки, в которых преобладает гранулярный компонент.  $\times 12\ 000$ ; Б – Глубокая инвагинация кариолеммы.  $\times 12\ 000$ ; В – Умеренная мелковезикулярная жировая дистрофия в цитоплазме гепатоцитов.  $\times 5\ 000$ ; Г – «Темная» и «светлая» клетки в дольке печени.  $\times 5\ 000$

многочисленных пучков коллагеновых волокон в перикапиллярном пространстве (рис. 1В), а также наличие коллаген-продуцирующих звездчатых клеток Ито с уменьшенным числом липидных включений и приобретающих удлинненную форму. Последнее указывает на их трансформацию в миофибробластоподобные клетки, т. е. активацию (рис. 1Г). Известно, что гипергомоцистеинемия усугубляет течение цирроза печени у крыс путем стимуляции экспрессии профибротических факторов [10].

Доминировали гепатоциты с морфологическими признаками высокой функциональной активности. В их цитоплазме регистрировались единичные мелкие липидные включения, ядра отличались крупными размерами, отсутствием глубоких инвагинаций, удлинненной формой и наличием многочисленных широких пор в кариолемме, а ядрышки содержали преимущественно гранулярный компонент (рис. 2А).

Однако в части паренхиматозных клеток наблюдались структурные изменения: глубокие инвагинации кариолеммы при общей сохранности цитоплазматических структур (рис. 2Б), в разных участках дольки – умеренно выраженная диссеминированная мелковезикулярная жировая дистрофия цитоплазмы (рис. 2В). Предполагают, что механизм индукции жировой дистрофии печени при гипергомоцистеинемии осуществляется через повышенную печеночную экспрессию CD36 – белка, транспортирующего жирные кислоты [11].

В разных участках дольки обнаруживались «темные» клетки (рис. 2Г) с электронно-плотным цитозолем и обилием органоидов. В цитоплазме как «светлых», так и «темных» гепатоцитов наблюдались многочисленные митохондрии и хорошо развитая ГрЭС, что свидетельствует о возрастании энергетического и биосинтетического потенциала паренхимы печени.

Гипергомоцистеинемия вызывала структурные изменения митохондрий гепатоцитов. Основная популяция органелл отличалась полиморфизмом. Митохондрии содержали умеренно электронно-плотный матрикс и многочисленные кристы, многие отличались крупными размерами (рис. 3А), что указывает на их высокую функциональную активность. Интенсификация энергетического обмена в митохондриях клеток печени крыс была установлена рядом авторов при метиониновой нагрузке [12].

С другой стороны, нами обнаружено образование своеобразных кольцевидных органелл. Подобную трансформацию митохондрий описывают и другие исследователи при воздействии ряда агентов, которые вызывают окислительное повреждение митохондрий (ацетаминофен, азид натрия, длительное употребление алкоголя) [13]. Авторы назвали подобную структуру органелл митохондриальным сфероидом, который охва-

тывает участок гиалоплазмы и может содержать различные органеллы. Согласно нашим наблюдениям, чаще всего внутри него оказывалась липидная капля, которая была либо полностью отграничена (заключена в инвагинационной полости) (рис. 3Б), либо имелось небольшое отверстие, которое соединяло внутренний просвет инвагинационной полости с цитоплазмой гепатоцита (рис. 3В). Значение митохондриальных сфероидов не установлено. Предполагают, что этот тип динамики митохондрий может быть связан с состояниями, включающими окислительное повреждение [13].

Среди других изменений митохондрий выявлено формирование мегаорганелл, которые отличались набухшим, просветленным матриксом и укороченными кристами (рис. 3Г). Подобные митохондрии, как известно, характеризуются сниженным биосинтетическим и биоэнергетическим потенциалом, поэтому могут указывать на токсический эффект гипергомоцистеинемии в отношении отдельных гепатоцитов. Кроме того, некоторые митохондрии приобретали волнистые очертания наружных мембран (рис. 3Д), что может способствовать увеличению площади поверхности органелл в условиях дефицита выработки энергии.

По данным других авторов, гипергомоцистеинемия изменяет экспрессию митохондриальных генов, в частности генов деления, что приводит к фрагментации митохондриальной сети и нарушению мембранного потенциала органелл [14]. Ранее выявлено, что метиониновая нагрузка на фоне повышения функциональной активности органелл нарушает депонирование  $Ca^{2+}$  и усиливает карбонилирование их белков, причиной чего может служить снижение продукции оксида азота [12].

Гипергомоцистеинемия стимулирует процессы аутофагии в печени. Нами обнаружены структуры, ограниченные одиночной мембраной, содержащие фрагменты разрушающихся цитоплазматических структур, в т. ч. дегенерирующих митохондрий с формированием аутомитофагосом (рис. 3Е). Механизм активации аутофагии в гепатоцитах при гипергомоцистеинемии связывают с ингибированием экспрессии CFTR через взаимодействие между H3K27me3 и метилированием ДНК [15].

Митохондрии, как правило, находились в плотном контакте с хорошо развитой ГрЭС, на параллельно ориентированных цистернах которой содержалось множество рибосом (рис. 4А). Характерной особенностью являлось формирование в некоторых гепатоцитах полей ГрЭС с концентрическим расположением цистерн в виде замкнутых колец (рис. 4Б). Можно предположить, что подобное структурное преобразование ГрЭС, которое ранее нами не наблюдалось, является одним из морфологических

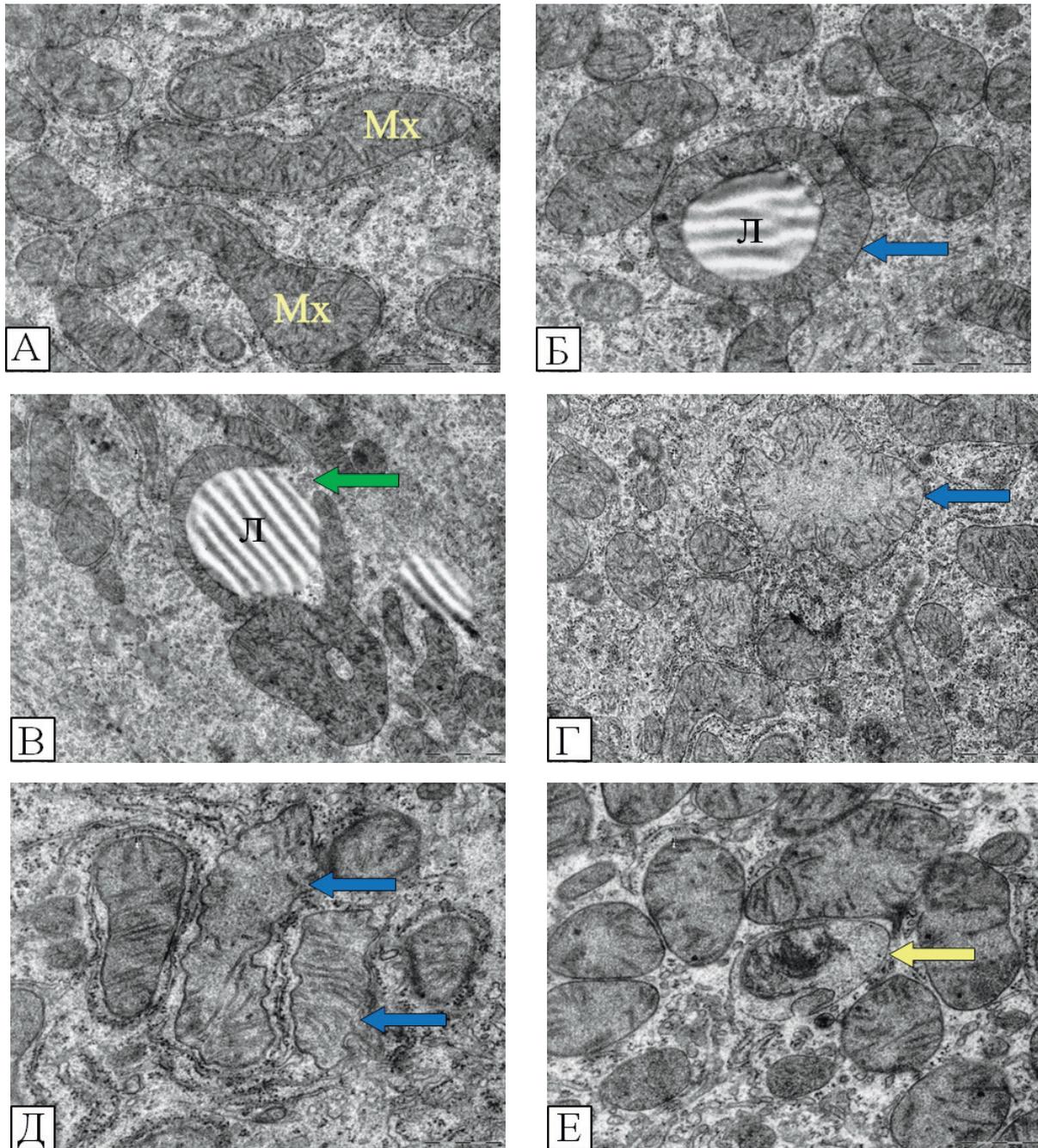


Рисунок 3. – Гипергомоцистеинемия. Ультраструктурные особенности митохондрий в гепатоцитах. Электронограммы

А – Митохондрии (Мх) с многочисленными кристами.  $\times 30\ 000$ ; Б – Замкнутый митохондриальный сфероид (стрелка), внутри которого находится липидная капля (Л) и небольшое количества цитозоля.  $\times 20\ 000$ ; В – Митохондриальный сфероид, имеющий небольшое отверстие (стрелка), которое соединяет просвет с цитозолем.  $\times 20\ 000$ ; Г – Мегамитохондрия с просветленным матриксом и укороченными кристами.  $\times 20\ 000$ ; Д – Митохондрии с волнистыми очертаниями наружной мембраны.  $\times 40\ 000$ ; Е – Аутомитофогозома, содержащая дегенерирующую митохондрию.  $\times 40\ 000$

проявлений ER-стресса. Он может индуцироваться в паренхиматозных клетках печени под влиянием избытка гомоцистеина [16]. Известно, что наиболее чувствительны к ER-стрессу белок-продуцирующие клетки, к которым относят и гепатоциты [17]. При нарушениях клеточного гомеостаза белки накапливаются в эндоплазматическом ретикулуме [18]. В то же время ER-стресс может запускать систему сигнальных путей UPR (unfolded protein response), которые

приводят либо к гибели клетки, либо к ее нормализации. Одним из компонентов этой системы является белок эндоплазматической сети Hsp90 (homocysteine ER-protein) [1]. Еще одним фактором, подтверждающим предположение о развитии в гепатоцитах ER-стресса, может быть зарегистрированный нами высокий уровень общего глутатиона в плазме крови (34,26 [33,31; 38,62] мкМ против 26,93 [26,25; 29,11] мкмоль/л).

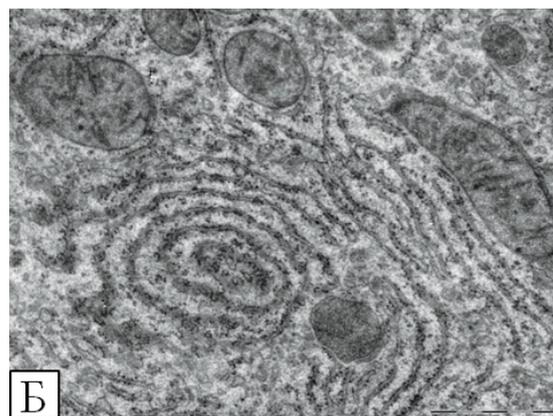
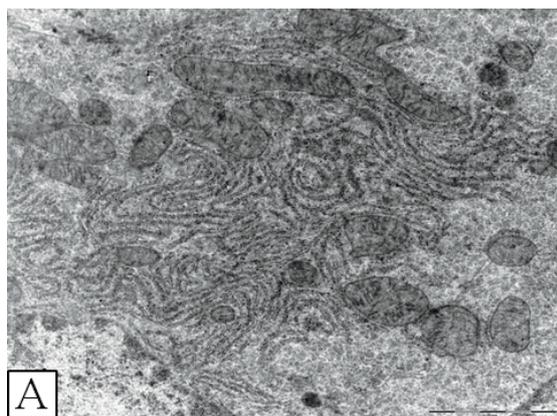


Рисунок 4. – Гипергомоцистеинемия. Ультраструктурные особенности гранулярной эндоплазматической сети в гепатоцитах. Электронограммы

А – Многочисленные цистерны ГрЭС с обилием связанных рибосом.  $\times 15\ 000$ ; Б – Концентрическое расположение цистерн ГрЭС в виде замкнутых колец.  $\times 30\ 000$

### Выводы

1. Гипергомоцистеинемия индуцирует морфологические изменения, которые могут свидетельствовать об усилении биосинтетических процессов в большинстве гепатоцитов. В части последних вызываются дистрофические изменения, затрагивающие в основном ядерный аппарат и митохондрии.

2. Гипергомоцистеинемия вызывает структурные преобразования основных органоидов гепатоцитов в виде формирования митохондриального сфероида и концентрической ориентации цистерн гранулярной эндоплазматической сети.

3. Гипергомоцистеинемия вызывает локальные повреждения микроциркуляторного русла и умеренную активацию фиброгенеза.

### References

- Naumov AV. Homocystein. Mediko-biologicheskie problemy [Homocysteine. Biomedical problems]. Minsk: Professionalnye izdaniya; 2013. 312 p. (Russian).
- Hankey GJ, Eikelboom JW, Ho WK, van Bockxmeer FM. Clinical usefulness of plasma homocysteine in vascular diseases. *Med. J. Aust.* 2004;181(6):314-318.
- García-Tevijano ER, Berasain C, Rodríguez JA, Corrales FJ, Arias R, Martín-Duce A, Caballería J, Mato JM, Avila MA. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension.* 2001;38(5):1217-1221.
- Cooper AJ. Role of the Liver in Amino Acid Metabolism. In: Zakim D, Boyer TD. *Hepatology: a textbook of liver disease.* 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia: WB. Saunders; 1996. p. 563-600.
- Finkelstein JD. Methionine metabolism in liver diseases. *Nutr. Biochem.* 1990;1(5):228-237. doi: 10.1093/ajcn/77.5.1094.
- Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC. Methionine metabolism and liver disease. *Annual Reviews.* 2008;28:273-293. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155438.
- Medvedev DV, Zvjagina VI, Fomina MA. Sposob modelirovaniya tjazhelej formy gipergomocisteinemii u krysa [Modeling of severe hyperhomocysteinemia in rats]. *Rossijskij mediko-biologičeskij vestnik im. akademika I.P. Pavlova* [I.P. Pavlov Russian medical biological herald]. 2014;4:42-46. (Russian).
- Doroshenko EM, Snezhitskiy VA, Lelevich VV. Struktura pula svobodnyh aminokislot i ih proizvodnyh plazmy krovi u pacientov s ishemičeskoj boleznju serdca i pojavlenijami hroničeskoj serdečnoj nedostatočnosti [Structure of the pool of free amino acids and their derivatives in plasma of patients with ischemic heart disease and chronic cardiac insufficiency]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2017;15(5):552-553. doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-5-551-556. (Russian).
- Liu WH, Zhao YS, Gao SY, Li SD, Cao J, Zhang KQ, Zou CG. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Am. J. Pathol.* 2010;177(5):2357-2365.
- Tung HC, Hsu SJ, Tsai MH, Lin TY, Huo TI, Lee FY, Huang HC, Ho HL, Lin HC, Lee SD. Homocysteine deteriorates intrahepatic derangement and portal-systemic collaterals in cirrhotic rats. *Clin. Sci.* 2016;131(1):69-86. doi: 10.1042/CS20160470.
- Yao L, Wang C, Zhang Xu, Peng L, Liu W, Zhang X, Liu Y, He J. Hyperhomocysteinemia activates the aryl hydrocarbon receptor/CD36 pathway to promote hepatic steatosis in mice. *Hepatology.* 2016;64(1):92-105. doi: 10.1002/hep.28518.
- Medvedev DV, Zvjagina VI. Izučenie biohimicheskih mehanizmov razvitija disfunkcii mitohondrij gepatocitov pri jeksperimentalnoj gipergomocisteinemii u krysa [The study of biochemical mechanisms of mitochondrial dysfunction in rats hepatocytes during experimental hyperhomocysteinemia]. *Voprosy pitanija* [Problems of nutrition]. 2016;85(1):29-35. (Russian).
- Ding WX, Li M, Biazik JM, Morgan DG, Guo F, Ni HM, Goheen M, Eskelinen EL, Yin XM. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *J. Biol. Chem.* 2012;287(50):42373-42378. doi: 10.1074/jbc.M112.413674.
- Kumar A, John L, Maity S, Manchanda M, Sharma A, Saini N, Chakraborty K, Sengupta S. Converging evidence of mitochondrial dysfunction in a yeast model of homocysteine metabolism imbalance. *J. Biol. Chem.* 2011;286(24):21779-21795. doi: 10.1074/jbc.M111.228072.
- Yang A, Jiao Y, Yang S, Deng M, Yang X, Mao C, Sun Y, Ding N. Homocysteine activates autophagy by inhibition of CFTR expression via interaction between DNA methylation and H3K27me3 in mouse liver. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):169. doi: 10.1038/s41419-017-0216-z.
- Ai Y, Sun Z, Peng C, Liu L, Xiao X, Li J. Homocysteine induces hepatic steatosis involving ER stress response in high methionine diet-fed mice. *Nutrients.* 2017;9(4):pii:E346. doi: 10.3390/nu9040346.
- Boot-Handford RP, Briggs MD. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases. *Cell. Tissue Res.* 2010;339(1):197-211.
- Gotoh T, Mori M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(7):1439-1446. doi: 10.1161/01.ATV.0000223900.67024.15.