

Н.Ф. Воробьева, В.К. Спиридонов, Е.В. Никитенко

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ КАПСАИЦИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ И ИНДУКЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ ФОРМАЛИНОМ И ЗИМОЗАНОМ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Изучены морфологические особенности реакции ткани печени при изменении активности афферентных пептидсодержащих нейронов капсаицином и индукции воспалительной реакции у крыс линии Вистар. Показано, что повреждение капсаицин-чувствительных нейронов вызывает развивающиеся во времени нарушения микроциркуляции, дистрофические и некротические изменения паренхимы ткани печени. Субплантарное введение формалина и системное введение зимозана интактным животным вызывают воспалительную реакцию, дистрофические и некротические изменения гепатоцитов в ткани печени. Повреждение сенсорных нейронов капсаицином усиливало провоспалительное действие индукторов воспаления, увеличивало количество дистрофически измененных гепатоцитов, в большей степени при введении формалина, и некротически измененных гепатоцитов, в большей степени при введении зимозана. Полученные данные говорят о важной роли капсаицин-чувствительных нейронов в модуляции воспалительной реакции и в поддержании морфо-функциональной целостности ткани печени при воздействии повреждающих факторов.

Ключевые слова: капсаицин, печень, афферентные нейроны, формалин, зимозан

Нейропептиды сенсорных нейронов — вещество Р (SP), кальцитонин-ген-родственный пептид (CGRP) и др., выделяемые из нервных окончаний в тканях при раздражении рецепторов или антидромной стимуляции нерва, — оказывают сильное вазодилататорное действие, инициируют развитие нейрогенного воспаления, увеличивают сосудистую и тканевую проницаемость, активируют соединительнотканые клетки в периферических тканях. Компонент жгучего перца — капсаицин избирательно действует на афферентные нейроны В-типа, активируя их в небольших дозах и стимулируя выброс нейропептидов из нервных окончаний. При однократном или многократном применении больших доз капсаицина, в зависимости от суммарной дозы, способа введения препарата, вида животных, вызывает десенситизацию, блокаду аксоплазматического тока, истощение нейропептидов, дегенерацию капсаицин-чувствительных нейронов [7].

Показано, что к действию капсаицина чувствительны практически все хеморецепторы С-волокон как в коже, так и во внутренних органах [8].

Ранее [2] были исследованы ткани кожи бедра и спины, роговицы и респираторного отдела легких при воздействии капсаицином. Обнаруженные после введения стимулирующей дозы капсаицина изменения затрагивали в основном микроциркуляторное русло и отражали, по-ви-

димому, в первую очередь нарушение сосудистой проницаемости, причем во всех объектах изменения были однотипны, правда, они были больше выражены в легких. Наблюдаемые изменения были связаны с нейрогенным воспалением. Более глубокие изменения были обнаружены при введении нейротоксической дозы капсаицина (200 мг/кг). В этом случае наблюдали дистрофические изменения в тканях.

Известно, что повреждение капсаицин-чувствительных нейронов снижает проявления местной воспалительной реакции при воздействии раздражающих факторов, в частности формалином [5]. Ранее в лаборатории было показано, что обработка капсаицином снижает экссудативную фазу периферической воспалительной реакции, вызываемой при интраплантарном введении вакцины АКДС, но не влияла на нее при введении зимозана у крыс [4].

В этой связи представляет интерес изучение влияния изменения активности пептидсодержащих афферентных нейронов капсаицином на структурную целостность ткани печени, выполняющей важную роль в продукции реактантов воспалительной реакции, у интактных животных и после индукции воспалительной реакции.

Целью настоящей работы являлось исследование морфологических свойств ткани печени при воздействии капсаицином и влияния повреж-

дения пептидсодержащих нейронов на реакцию ткани печени при индукции воспаления зимозаном и формалином.

Методика

Исследование проводили на 85 самцах линии Вистар массой 200-240 г.

Животные были распределены на 8 групп. Первая группа — интактные крысы (n=8). Вторая группа — животным вводили капсаицин неонатально в дозе 50 мг/кг за 2 месяца до забоя (n=7). Третья группа — животным вводили 50 мкл 2,5% формалина [9] субплантарно в правую заднюю лапу (n=7). Четвертая группа — формалин в этой же дозе вводили крысам, получавшим капсаицин неонатально (n=7). Пятая группа — крысам под легким эфирным наркозом вводили подкожно капсаицин трехкратно в дозах 25, 50 и 75 мг/кг с интервалом 6-12 часов (суммарная доза 150 мг/кг) за 4 недели до забоя (n=7). Шестая группа — интактным крысам вводили зимозан в дозе 10 мг/кг на 100 г веса, внутривенно, за 2 дня до забоя (n=5) [3]. Седьмая группа — крысам вводили зимозан в этой дозе через 4 недели после введения капсаицина (150 мг/кг, п/к), n=5. Восьмая группа — вводили капсаицин 150 мг/кг и смотрели реакцию печени через 1 сутки (n=3), 3 сут. (n=7), 7 сут. (n=7), 14 сут. (n=8) и контроль (n=14).

Животных декапитировали под эфирным наркозом. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Образцы печени для световой микроскопии брали из края левой латеральной доли печени, фиксировали их в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов с возрастающей концентрацией, заключали в парафин. Готовили срезы толщиной 5-6 мкм. От каждого животного получали по 5-6 микроскопических срезов ткани печени. Для изучения структурных компонентов ткани печени срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином и заключали в полистирол на предметных стеклах. Полученные препараты изучали на световом микроскопе Jenamed-2 Histology Zeiss при увеличении $\times 1000$. Препараты печени исследовали морфометрически с использованием окулярной сетки из 25 точек [1]. Подсчитывали объемную плотность зон с дистрофическими и некротическими изменениями гепатоцитов, численную плотность двухядерных гепатоцитов. Для выявления статистической значимости отличий использовали параметрический критерий Стьюдента.

Результаты

У интактных животных в печени наблюдается обычная морфологическая картина.

Действие нейротоксических доз капсаицина

Комплекс тканевых нарушений печени после введения капсаицина (150 мг/кг) складывается из сосудистой реакции и заметных изменений со стороны гепатоцитов. В этом случае в печени наблюдали резкое расширение сосудов центральных отделов долек, сдвиг эритроцитов, а в портальных трактах — умеренно выраженную лейкоцитарную инфильтрацию, местами выходящую за пределы пограничной пластинки. По сравнению с контролем гепатоциты подвержены изменениям, в некоторых видны выраженные деструктивные явления (вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядер, распад балок). Увеличенное количество двухядерных клеток свидетельствовало о наличии пролиферативного процесса в органе.

Морфометрический анализ показал, что объемная плотность дистрофически измененных гепатоцитов в группе животных, получавших капсаицин, была выше по сравнению с контролем (Таблицы 1, 2). Объемная плотность некрозов в печени у обработанных нейротоксическими дозами крыс также возрастала по сравнению с контролем. Увеличивалась и численная плотность двухядерных гепатоцитов.

При введении капсаицина неонатально (50 мг/кг) балочное строение печени сохранено. Центральные вены долек расширены, полнокровны, синусоиды и портальные тракты не расширены. Часть гепатоцитов находилась в состоянии гидропической дистрофии. Определялись единичные моноцеллюлярные некрозы гепатоцитов. В синусоидах и портальных трактах умеренно выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Количество некрозов практически не изменено по сравнению с контролем, но почти в 5 раз увеличено количество дистрофически измененных гепатоцитов и в 2 раза — количество двухядерных гепатоцитов (Таблица 1).

Анализ изменений структурной организации ткани печени после обработки нейротоксическими дозами капсаицина взрослых и новорожденных животных показал их однотипность. Однако имеются некоторые различия. После неонатальной обработки капсаицином у крыс более выражены очаги дистрофических изменений при незначительном количестве некрозов, тогда как у крыс, обработанных капсаицином во взрослом состоянии количество некрозов больше.

Изучение временного характера развития тканевых реакций после введения капсаицина в дозе 150 мг/кг показало, что реакция ткани печени на введение капсаицина развивалась уже через

1 сутки, а максимум регистрируемых изменений приходился на 7-е сутки — резко возрастало количество некротически и дистрофически измененных гепатоцитов. К 14-м суткам количество дистрофий и некрозов снизилось, но оставалось еще высоким; наблюдалось максимальное количество двухядерных гепатоцитов. Заметную реакцию ткани печени наблюдали и через 4 недели (см. описание выше).

Приведенные данные показали, что введение капсаицина вызывает комплекс изменений в ткани печени, состоящий из нарушений микроциркуляторного русла, воспалительной реакции, дистрофических и некротических изменений и пролиферативного процесса.

Действие формалина и зимозана у интактных и обработанных капсаицином крыс

Проведенные исследования показали, что при введении формалина интактным животным балочное строение печени не нарушено. Центральные отделы долек расширены и полнокровны. В гепатоцитах наблюдали выраженную гидропическую дистрофию, определялись некрозы гепатоцитов, количество которых увеличиваено по сравнению с нормой (Таблица 1). В портальных трактах видна умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью незначительного количества полинуклеаров.

При введении формалина крысам, получавшим капсаицин неонатально, структура балочного строения печени сохранялась. Центральные вены печеночных долек расширены, полнокровны, с периваскулярными кровоизлияниями. Синусоиды расширены. Часть гепатоцитов нахо-

дилась в состоянии выраженной гидропической дистрофии, выявлено увеличение количества некрозов гепатоцитов по сравнению с печенью крыс, которым вводили только формалин (Таблица 1). В расширенных портальных трактах выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью незначительного количества нейтрофилов, а в синусоидальных пространствах видны цепочки лимфоцитов.

При внутрибрюшинном введении зимозана интактным крысам балочное строение печени сохранено. В гепатоцитах наблюдали умеренно выраженную гидропическую дистрофию. Определялись единичные моноцеллюлярные некрозы гепатоцитов. Центральные отделы долек умеренно расширены, полнокровны. В портальных трактах умеренно выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация, местами выходящая за пределы пограничной пластинки. В синусоидах видны единичные цепочки лимфоцитов. В паренхиме определялись гранулемы, состоящие из крупных мононуклеарных клеток и единичных макрофагов. Часть гранулем «увядала», в них появлялись клетки с вытянутыми гиперхромными ядрами — фибробласты.

При введении зимозана крысам, обработанным за 4 недели капсаицином (150 мг/кг), наблюдали выраженную дисплазию печеночных долек. В гепатоцитах — выраженная гидропическая и баллонная дистрофия. Значительно увеличено количество некротизированных гепатоцитов по сравнению с введением только зимозана (Таблица 2). В расширенных портальных трактах выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация, выходя-

Таблица 1

Морфологические изменения в ткани печени у крыс Вистар после неонатального введения капсаицина (50 мг/кг) и формалина ($M \pm m$)

Выявленные изменения	Контроль	Капсаицин неонатально	Интактные + формалин	Капсаицин неонатально + формалин
Количество некрозов	0,02±0,01	0,03±0,01	0,28±0,05***	0,60±0,03***
Дистрофические изменения гепатоцитов	0,63±0,02	3,07±0,08***	7,17±0,21***	8,36±0,17***
Двухядерные гепатоциты	0,37±0,04	0,82±0,06***	1,11±0,05***	0,98±0,01***

Примечание: достоверные отличия от контроля отмечены знаком *, при $p < 0,001$ — ***

Таблица 2

Морфологические изменения в ткани печени у крыс Вистар после введения капсаицина (150 мг/кг) и зимозана ($M \pm m$)

Выявленные изменения	Контроль	Капсаицин	Интактные + зимозан	Капсаицин + зимозан
Количество некрозов	0,12±0,01	0,42±0,03***	0,66±0,03***	2,68±0,13***
Дистрофические изменения гепатоцитов	1,03±0,01	5,54±0,12***	6,97±0,67***	7,8±0,15***
Двухядерные гепатоциты	0,21±0,01	0,78±0,05***	0,59±0,02***	0,84±0,04***

Примечание: достоверные отличия от контроля отмечены знаком *, при $p < 0,001$ — ***

щая за пределы пограничной пластинки. Центральные отделы долек расширены. В синусоидных пространствах многочисленные цепочки лимфоцитов. Настоящих гранул в этом случае не было, отмечены только единичные скопления мононуклеаров.

Обсуждение

Полученные нами данные показывают, что введение нейротоксических доз капсаицина в ранние сроки наблюдения вызывает типичные изменения в микроциркуляторном русле, заключающиеся в расширении мелких сосудов, появлении лейкоцитов, нарушении сосудистой проницаемости и развитие нейрогенного воспаления. Эти эффекты инициируются действием капсаицина на рецепторы афферентных нервов и последующим массивным выбросом нейропептидов, главным образом SP и CGRP, обладающих вазодилаторным действием и активирующих провоспалительные механизмы [9]. Нарушения сосудистой проницаемости, застойные явления и гипоксия являются, вероятно, основной причиной последующего развития дистрофических процессов, тяжесть которых пропорциональна дозе капсаицина. Длительность наблюдаемых изменений связана, вероятно, с дефицитом нейропептидов сенсорных нейронов, имеющимся после обработки капсаицином [7], и отсутствием их регуляторного влияния на сосудистый тонус и, возможно, на собственно трофические процессы. Сравнение действия неонатального введения капсаицина и его введения взрослым крысам показывает однотипность наблюдаемых тканевых поражений. Наблюдаемое более выраженное увеличение некрозов при обработке капсаицином взрослых крыс является следствием, вероятно, острого повреждения нервных окончаний и нарушением нервно-тканевых отношений, тогда как более выраженные дистрофические изменения гепатоцитов после неонатального введения капсаицина могут быть объяснены длительным снижением нейропептидов в тканях и отсутствием регуляторного влияния сенсорных нейропептидов.

Нами показано, что субплантарное введение формалина вызывает в печени морфологические изменения провоспалительного характера и увеличение дистрофически измененных гепатоцитов и количества некрозов по сравнению с контролем и с обработкой капсаицином. Введение формалина крысам, которым неонатально вводили капсаицин, вызывало более выраженные изменения в воспалительной реакции, дальнейшее увеличение количества дистрофических гепатоцитов и двукратное повышение количества некрозов. Усиление реакции в печени на введение формалина у крыс, обработанных неонатально капсаицином, свидетельствует о том, что повреждение капсаицин-чувствительных нейронов не снижает развитие воспалительной реакции в печени, как это показано для локального воспаления в месте введения формалина [5]. Более того, лишение чувствительной иннервации капсаицином усилило дистрофические и некротические изменения в ткани печени, вызываемые формалином, что говорит о важной роли капсаицинчувствительных нервов в обеспечении резистентности к повреждающим воздействиям.

При внутрибрюшинном введении зимозана интактным крысам развивается характерное грануломатозное воспаление, описанное в литературе. Из результатов наших опытов видно, что предварительная обработка крыс капсаицином существенно усиливала воспалительную реакцию, значительно увеличивала количество некрозов (в 4 раза) и незначительно — дистрофически измененных гепатоцитов после введения зимозана (Таблица 2). Известно, что введение высокомолекулярного полисахарида зимозана вызывает воспалительную реакцию, причем зимозан вызывает образование гранул, которые появляются уже через двое суток после введения частиц [3]. По нашим данным, у крыс с повреждением капсаицин-чувствительных нервов отсутствовали типичные гранулемы через двое суток после введения зимозана. Возможно, что обработка капсаицином в какой-то степени нарушает экстравазальную миграцию гранулоцитов в воспаленную ткань.

Усиление реакции в ткани печени на введение индукторов воспаления у крыс с повреждением капсаицин-чувствительных нейронов говорит, с одной стороны, о различных механизмах активации воспалительной реакции, а с другой — о снижении резистентности к повреждающему действию примененных веществ в условиях нарушения чувствительной иннервации и дефицита сенсорных нейропептидов, что является дополнительным свидетельством их регуляторной роли в тканевом гомеостазе. По данным литературы, стимуляция сенсорных нервов ослабляет повреждение поджелудочной железы, а повреждение чувствительных нервов капсаицином усиливает их после ишемии и последующей реперфузии [11], деафферентация капсаицином усиливает воспаление и некротические повреждения в кишечнике после воздействия химических агентов [6, 10].

В наших опытах отмечено, что формалин, как и зимозан, уменьшает количество двухядерных форм гепатоцитов в отличие от действия капсаицина. Введение их на фоне нейротоксической дозы капсаицина меняет количество двухядерных

форм неодинаково: формалин значительно снижает их количество, т.е. тормозит пролиферативные процессы, а зимозан незначительно усиливает. Такое действие формалина свидетельствует об отличии в механизмах его действия и наличии токсического компонента, ингибирующего пролиферативный процесс.

Приведенные данные показывают, что как повреждение афферентных нейронов, так и индукция воспаления формалином и зимозаном вызывают воспалительную реакцию в печени, где осуществляется синтез многих белков про- и противовоспалительного характера. Наблюдаемые различия в характере течения реакции ткани печени при введении формалина и зимозана объясняются, по-видимому, различным механизмом действия этих препаратов — формалин является раздражающим веществом с сильным токсическим действием общего характера, а зимозан вызывает стойкое раздражение ретикуло-эндотелиальной системы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии капсаицин-чувствительных нервов в воспалительной реакции и модуляции тканевых процессов, обеспечивающих резистентность ткани печени к действию повреждающих факторов.

Заключение

Суммируя данные проведенного исследования, можно заключить, что наблюдаемые изменения в ткани печени после введения нейротоксической дозы капсаицина говорят о нарушении регуляции микроциркуляции, которое приводит к серьезным дистрофическим и некротическим процессам в печени.

Повреждение капсаицин-чувствительных нейронов капсаицином усиливает дистрофические и некротические изменения в ткани печени при индукции воспаления.

Все это свидетельствует о том, что пептидсодержащие афферентные нейроны являются необходимым звеном гомеостатических реакций в поддержании морфо-функциональной целостности тканей и модулируют тканевые защитные реакции.

Morphologic peculiarities of liver tissue under damage of capsaicin-sensitive neurons and induction inflammation by formalin and zymozan

N.F. Vorobjeva, V.K. Spiridonov, E.V. Nikitenko

Morphologic peculiarities of the reaction of the liver tissue were studied in Wistar rats by changing the functional activity of afferent peptide-containing neurons by capsaicin as well as induction of inflammation. The damage of capsaicin-sensitive neurons has been shown to result in the disturbances of mi-

crocirculation developing in time, dystrophic and necrotic changes in the liver tissue parenchyma. The administration of formalin or zymozan to the control rats produced the inflammatory reaction, dystrophic and necrotic changes of hepatocytes in the liver tissue. The damage of sensory neurons by capsaicin intensified the proinflammatory effects of the inflammation inducers. The administration of formalin caused to a greater extent the dystrophic changes of hepatocytes while the necrotic changes of these cells were mainly induced by zymozan. The obtained data indicate an important role of capsaicin-sensitive neurons in the modulation of inflammation as well as in supporting the morpho-functional integrity of the liver tissue under influence of the damage-induced factors.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. — М., 1990. — 383 с.
2. Воробьева Н.Ф. Структурные изменения тканей белых крыс после введения капсаицина / Н.Ф. Воробьева, Г.Г. Князев, В.А. Лазарев, В.К. Спиридонов // Морфология. — 1997. — Т. 111. — № 2. — С. 59-63.
3. Маянский Д.Н. Новые рубежи гепатологии / Д.Н. Маянский, Э. Виссе, К. Декер. — Новосибирск, 1992. — 266 с.
4. Спиридонов В.К. Влияние блокады капсаицин-чувствительных нервов на развитие экссудативной реакции при иммунном ответе и асептическом воспалении / В.К. Спиридонов, Е.М. Жукова // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1995. — № 10. — С. 434-436.
5. Damas J., Liegeois J.F. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw / J. Damas, J.F. Liegeois // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1999. — Vol. 359. — № 3. — P. 220.
6. Functional ablation of afferent nerves aggravates dextran sulphate sodium – induced colonic damage in rats / M.J. Domek, E.I. Blackman, J. Kao et al. // J. Gastroenterol. Hepatol. — 1977. — Vol. 11. — № 12. — P. 698-702.
7. Holzer P. Peptidergic sensory neurons on the control of vascular functions: mechanisms and significance of the cutaneous and splanchnic vascular beds / P. Holzer // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. — 1992. — Vol. 121. — P. 49-146.
8. Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin / P. Holzer // Gen. Pharmacol. — 1998. — Vol. 30. — № 1. — P. 5-11.
9. Peripheral actions of tachykinins / A. Lessi, S. Ginliani, M. Tramontana et al. // Neuropeptides. — 2000. — Vol. 34. — № 5. — P. 303-313.
10. Protective role of vagal afferents in experimentally-induced colitis in rats / L. Mazelin, V. Theodorou, J. More et al. // J. Auton. Nerv. Syst. — 1998. — Vol. 73. — № 1. — P. 38-45.
11. Stimulation of sensory nerves and CGRP attenuate pancreatic damage in ischemia/reperfusion induced pancreatitis / A. Dembinski, Z. Warzecha, P. Ceranowicz et al. // Med. Sci. Monit. — 2003. — Vol. 12. — № 9. — P. 418-425.