SECTION IV. MEDICINE

**Бобров И.П., Лычёва Н.А., Крючкова Н.Г., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю.,
Шахматов И.И., Красова А.А., Осипова А.В., Алымова Е.Е.**

**Морфологическая и морфометрическая характеристика клеток печени крыс при
воздействии глубокой гипотермии и в постгипотермическом периоде**

*Алтайский государственный медицинский университет
(Россия, Барнаул)*

doi 10.18411/gq-30-11-2017-07

idsp 000001:gq-30-11-2017-07

Аннотация

Проведен комплексный морфологический и морфометрический анализ многочисленных параметров клеток печени белых крыс при воздействии экспериментальной глубокой гипотермии и в постгипотермическом периоде. Показано, что непосредственно после воздействия холодового фактора морфометрические параметры гепатоцитов значительно уменьшались. На 2-ой день после воздействия гипотермии (в период адаптации) морфологические характеристики ядра и цитоплазмы начинали возрастать, на 5-тый день после гипотермии (в период регенерации) морфометрические параметры были наибольшими и на 14-тый день уменьшались. Результаты проведенного морфометрического компьютерного анализа показали, что ткань печени обладает большими возможностями к адаптации и регенерации после повреждения холодovým стрессом.

Ключевые слова: печень, гипотермия, морфология, морфометрия.

В литературе имеется небольшое количество работ посвященных изучению морфологического строения печени при гипотермии [1,2,3,4,5,6,7]. На повреждение гепатоцитов при холодовой травме указывают некоторые авторы [3,5,6,8]. Так, Рябов Г.А. (1968) показал, что кратковременное холодовое воздействие приводит к уменьшению массы печени, вакуолизации цитоплазмы гепатоцитов и нечеткости их границ. На 3-7 сутки действия низкой температуры возрастает число лизирующихся печеночных клеток [8]. Зуевский В.П. и соавт. (2014) на 3-и сутки гипотермии выявляли зернистую дистрофию и пикноз ядер гепатоцитов [6]. Чудаков А.Ю. (1997) при действии охлаждения в клетках печени отмечал различные виды дистрофий: зернистой, гиалиново-капельной, гидропической [9].

Под влиянием низкой температуры изменяются морфометрические параметры клеток печени. При глубокой гипотермии уменьшаются площадь и диаметр ядра гепатоцитов, что исследователи объясняют угнетением синтеза ДНК и белка [1,10,11,12]. Также при воздействии холодового фактора выявлено увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения клеток печени [2,3,13]. По данным Петрук Н.Н. (2010) количество гипертрофированных гепатоцитов статистически достоверно возрастало на 60-90 сутки ($60,2\% \pm 2,7$) ($65,2\% \pm 1,8\%$) гипотермии [5]. Альперович Б.И. с соавт. (2004) установили, что после криодеструкции печень регенерирует за счет резкого увеличения количества гипертрофированных гепатоцитов [14]. Следует отметить, что в литературе нами не обнаружено данных об изменениях параметров характеризующих форму ядер гепатоцитов при гипотермии, которые также несут много информации о морфофункциональной активности клетки.

Цель исследования: провести морфологический и морфометрический анализ клеток печени крыс при воздействии глубокой гипотермии и в постгипотермическом периоде в эксперименте.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на 20 белых крысах линии Wistar. Гипотермию моделировали путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5 °С, при температуре окружающего воздуха 7 °С. Критерием прекращения эксперимента служило достижение животными ректальной температуры 20-25 °С, что соответствовало глубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и в среднем составляло 40±5 мин. В ходе эксперимента животные были разделены на 4 группы. Животные 1 группы умерщвлялись сразу после прекращения действия холодового фактора, животные 2 группы выводились из эксперимента через 2 суток после прекращения охлаждения, печень животных 3 группы исследовали через 5 суток и животных 4 группы изучали через 14 дней.

Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте и директивами -86/609/ЕЕС [15]. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Полученный материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине забуференном по Лилли. Проводку материала осуществляли по изопропиловому спирту с помощью автомата проводки карусельного типа TISSUE-TEK VIPTM6 (Sakkura, Япония), заливали в парафин при помощи станции парафиновой заливки TISSUE-TEK TEC 5 (Sakkura, Япония). Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм получали с использованием полуавтоматического роторного микротомы Accu-Cut SRM (Sakkura, Япония). Окрашивали срезы гематоксилином и эозином в автомате для автоматической окраски микропрепаратов TISSUE-TEK Prisma (Sakkura, Япония). Заключали препараты под пленку в автомате для автоматического заключения микропрепаратов TISSUE-TEK Film (Sakkura, Япония). Компьютерный морфометрический анализ клеток печени проводили с помощью аппаратно-программного комплекса, состоящего из программного обеспечения для морфометрического анализа ВидиоТест-Морфология 5.2., цифровой камеры VIDI CAM (Россия), адаптированной к световому микроскопу Nikon Eclipse E200 (Япония) и персонального компьютера. Высчитывали площадь, диаметр, периметр, фактор круга, фактор эллипса, фактор удлиненности ядра, площадь цитоплазмы гепатоцитов и ядерно-цитоплазматическое соотношение (ядр/цит). Также с помощью программы UTHSCSA Image Tool 3.0 (разработанной в University of the Texas Health Science Center of San Antonio, Texas) высчитывали среднее число гепатоцитов, среднее число одноядерных гепатоцитов, среднее число двуядерных гепатоцитов в 5 полях зрения в процентах. Определяли индекс альтерации – число некротизированных гепатоцитов 5 полях зрения выраженное в процентах. У каждого животного исследовали не менее 25-30 гепатоцитов.

Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 10.0. Если при проверке статистических гипотез распределение данных было нормальным, то применяли методы параметрической статистики (t-test Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро-Уилка $W = 0,89$, $p < 0,01$), то применяли методы непараметрической статистики: тест Колмогорова-Смирнова или U-тест Манна-Уитни. Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что при выведении животных из эксперимента сразу после проведения глубокой гипотермии печеночные дольки имели многоугольную форму, были окружены небольшим количеством соединительной ткани и границы их были выражены не четко. Гепатоциты были полиморфными: округлой, овальной или кубической формы. Ткань печени находилась в состоянии отека, отмечали дисконфлексацию печеночных балок, во многих

гепатоцитах присутствовали явления некроза. В среднем сразу после гипотермии в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$ в среднем содержалось $212,6 \pm 12,9$ гепатоцитов. Индекс альтерации составил $32,5\% \pm 3,1$. Вокруг центральных вен печеночные клетки были уменьшены в размерах, в то время как в периферийных отделах печеночных балок клетки имели крупные размеры. Ядра в гепатоцитах располагались преимущественно в центре клеток. В ядрах клеток периферийных отделов балок преобладал гетерохроматин, который занимал маргинальное положение, формируя агрегаты различных размеров. Большинство гепатоцитов являлись одноядерными клетками ($91,8\% \pm 0,8$). Средняя площадь ядра составила – $10,4 \pm 0,5$ мкм², периметр – $11,5 \pm 0,25$ мкм, диаметр – $3,6 \pm 0,1$ мкм, фактор круга – $0,951 \pm 0,003$ отн. ед, фактор эллипса $0,997 \pm 0,0002$ и фактор удлиненности ядра – $1,26 \pm 0,02$ отн. ед. Площадь сечения цитоплазмы составила $193,2 \pm 18,1$ мкм², ядр/цит соотношение – $0,11 \pm 0,01$. Двухядерные печеночные клетки регистрировали в $8,2\%$ случаев (таблица).

На 2 сутки после глубокой гипотермии ткань печени выглядела умеренно отечной. Количество гепатоцитов составило $174,4 \pm 9,3$ в 5 полях зрения. Индекс альтерации – $38,85\% \pm 2,2$. Гепатоциты имели полиморфную форму. Ядра гепатоцитов были увеличены в размерах. Большинство печеночных клеток имели одно ядро ($93,6\% \pm 0,5$). Средняя площадь ядра составила – $24,9 \pm 1,1$ мкм², периметр – $17,7 \pm 0,4$ мкм, диаметр – $5,6 \pm 0,1$ мкм, фактор круга – $0,962 \pm 0,002$ отн. ед., фактор эллипса $0,998 \pm 0,0001$ и фактор удлиненности ядра – $1,23 \pm 0,02$ отн. ед. Площадь сечения цитоплазмы составила $260 \pm 7,1$ мкм². Ядр/цит соотношение – $0,19 \pm 0,01$. Количество двухядерных печеночных клеток составило – $6,4\% \pm 0,5$ (таблица). Регистрировали двухядерные клетки крупных размеров.

На 5 сутки после глубокой гипотермии ткань печени находилась в состоянии умеренно выраженного отека. Количество гепатоцитов составило $132,8 \pm 3,3$. Индекс альтерации – $1,9\% \pm 1,3$. Преобладали гепатоциты полиморфной формы. Большинство гепатоцитов имело одно ядро ($93,2\% \pm 2,1$). Ядра гепатоцитов имели увеличенные в размеры: средняя площадь ядра составила – $46,4 \pm 1,1$ мкм², периметр – $24,4 \pm 0,3$ мкм, диаметр – $7,7 \pm 0,1$ мкм. Фактор круга составил – $0,972 \pm 0,002$ отн. ед, фактор эллипса – $0,998 \pm 0,0002$ отн. ед. и фактор удлиненности ядра – $1,15 \pm 0,001$ отн. ед. Площадь сечения цитоплазмы составила – $436,4 \pm 34,9$ мкм², ядр/цит соотношение – $0,17 \pm 0,01$. Количество двухядерных печеночных клеток составило – $5,1\% \pm 1,6$ (таблица). Двухядерные клетки имели крупные размеры.

На 14 день в ткани печени явления отека были выражены слабо. Количество гепатоцитов составило – $148,7 \pm 7,6$. Индекс альтерации – $6,6\% \pm 0,7$. Гепатоциты приобретали округлую форму. Преобладали одноядерные гепатоциты ($80,2\% \pm 3,6$). Ядра гепатоцитов по сравнению с предыдущем сроком эксперимента имели тенденцию к уменьшению размера. Средняя площадь ядра составила – $24,2 \pm 1,0$ мкм², периметр – $17,5 \pm 0,4$ мкм – $0,998 \pm 0,0002$ отн. ед. и фактор удлиненности ядра – $1,20 \pm 0,02$ отн. ед. Площадь сечения цитоплазмы составила – $204,7 \pm 10,5$ мкм², ядр/цит соотношение – $0,14 \pm 0,01$. Количество двухядерных печеночных клеток составило – $15,7\% \pm 2,4$ (таблица).

Таблица

Морфологическая и морфометрическая характеристика гепатоцитов печени крыс в зависимости от срока проведения экспериментальной глубокой гипотермии

Параметры гепатоцитов	Срок эксперимента			
	Сразу после гипотермии	Через 2 дня	Через 5 дней	Через 14 дней
Число гепатоцитов в 5 полях зрения	$212,6 \pm 12,9$	$174,4 \pm 9,3^*$	$132,8 \pm 3,3^*$	$148,7 \pm 7,6^*$
Площадь ядра (мкм ²)	$10,4 \pm 0,5$	$24,9 \pm 1,1^*$	$46,4 \pm 1,1^*$	$24,2 \pm 1,0^*$
Периметр ядра (мкм)	$11,5 \pm 0,25$	$17,7 \pm 0,4^*$	$24,4 \pm 0,3^*$	$17,5 \pm 0,4^*$
Диаметр ядра (мкм)	$3,6 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1^*$	$7,7 \pm 0,1^*$	$5,5 \pm 0,1^*$

Фактор круга ядра (отн. ед.)	0,951±0,003	0,962±0,002*	0,972±0,002*	0,966±0,002*
Фактор эллипса ядра (отн. ед.)	0,997±0,0002	0,998±0,0001	0,998±0,0002	0,998±0,0002
Фактор удлиненности ядра (отн. ед.)	1,26±0,02	1,23±0,02*	1,15±0,001*	1,20±0,02*
Площадь цитоплазмы (мкм ²)	193,2±18,1	260±7,1*	436,4±34,9*	204,7±10,5*
Соотношение ядро/цитоплазма	0,11±0,01	0,19±0,01*	0,17±0,01	0,14±0,01*
Индекс альтерации (%)	32,5%±3,1	38,85%±2,2*	21,9%±1,3*	6,6%±0,7*
Число одноядерных клеток (%)	91,08±0,8	93,6±0,5*	93,8±2,1	80,2±3,6*
Число двуядерных клеток (%)	8,2±0,8	6,4±0,5*	5,1±1,6*	15,7±2,4*

Примечание: * - данные достоверны при $p < 0,05$.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что гипотермия оказывала повреждающее действие на ткань печени экспериментальных животных. Сразу после проведения гипотермии количественные и морфометрические параметры клеток печени были значительно уменьшены. В постгипотермическом периоде, через 2 дня (в период адаптации) параметры гепатоцитов начинали возрастать, а на 5-тый день (в период регенерации) количественные и морфометрические параметры клеток были самыми высокими и затем к 14 дню эксперимента они начинали уменьшаться. Холодовой стресс является мощным фактором воздействия на ткань печени.

1. Жирнова А.А., Широкова Н.Н., Рыжовский Б.Я. Изменения в печени белых крыс под влиянием низкой температуры // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1983. – №2. – С. 65 – 68.
2. Веряскин В.В., Филюшина Е.Е. Ультраструктурная характеристика гепатоцитов при адаптации к холоду в природных условиях // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – №1. – С. 83 – 85.
3. Молодых О.П., Клиникова М.Г., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М. Тканевая и внутриклеточная реорганизация печени крыс при общем охлаждении организма // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – №60. – С. 714 – 720.
4. Шмерлинг М.Д., Белкин В.Ш., Филюшина Е.Е., Астахов О.Б., Бузуева И.И., Веряскин В.В. Морфометрическая характеристика гепатоцитов при адаптации к экстремальным факторам Антарктиды // Морфология. – 2008. – №6. – С. 46 – 49.
5. Петрук Н.Н., Зуевский В.П., Вихарева Л.В. Влияние охлаждения на гистоструктурные изменения печени // Медицинская наука и образование Урала. – 2010. – №1. – С. 78 – 81.
6. Зуевский В.П., Петрук Н.Н., Дернак Т.В., Макарова Р.Г. Структурные изменения печени при действии холодового фактора (в эксперименте) // Научный медицинский вестник Югры. – 2014. – №1. – С. 60 – 64.
7. Алябьев Ф.В. Динамика ультраструктурной перестройки печени при общем переохлаждении организма // Международный научный журнал «Инновационная наука». – 2017. – №2-3. – С. 245 – 247.
8. Рябов Г.А. Реактивные изменения эпителия печени и почек крыс при воздействии низких температур: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ленинград, 1973. – 17с.
9. Чудаков А.Ю. Структурные изменения в печени, почках и надпочечниках при иммерсионной общей глубокой гипотермии в эксперименте // Отечеств. Воен. Мед. акад. – СПб. – 1997. – С. 47 – 49.
10. Аршавский И.А., Розанова В.Д., Суровцева З.Ф., Гайлиш Л.Г. Особенности роста и анаболических процессов у крыс, развивающихся в условиях холодовых экспозиций // Журнал эволюционной биохимии. – 1980. – №2. – С. 137 – 142.
11. Зашихин А.Л. Синтез ДНК в клетках печени при длительном воздействии субнижкой температуры // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1981. – №2 – С. 256.
12. Bobrov I.P., Lepilov A.V., Dolgatov A.U., Lychova N.A., Shakhmatov I.I., Kiselev V.I., Kryuchkova N.G., Osipova A.V., Krasova A.A. DNA analysis of nucleus of cells of a liver at influence deep hypothermia and in hypothermic period / Academic science – problems and achievements XIII: Proceedings of the Conference. North Charleston, 22-23.08.2017. // North Charleston, SC, USA: CreateSpace, 2017. – p. 13 – 20.
13. Захарова А.А. Морфология сосудистого русла печени при охлаждении (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 1990. – 17 с.
14. Альперович Б.И., Орлов А.В., Киселева Ю.В. Возможности криодеструкции в лечении цирроза печени // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – №2. – С. 79 – 84.
15. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. – Strasbourg: Council of Europe, 1986. – 51 p.