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

**Компьютерный анализ интегральной оптической плотности гликогена в клетках
печени крыс при воздействии холодового стресса и в постгипотермическом
периоде**

*Алтайский государственный медицинский университет
(Россия, Барнаул)*

doi 10.18411/gq-30-11-2017-08

idsp 000001:gq-30-11-2017-08

Аннотация

С помощью специального аппаратно-програмного комплекса проведена оценка интегральной оптической плотности гликогена в цитоплазмах гепатоцитов белых крыс при холодовом стрессе и в постгипотермическом периоде. Показано, что сразу после воздействия холодового фактора содержание гликогена в гепатоцитах было наименьшим. Затем на 2-ой день после гипотермии (в период адаптации) количество гликогена возрастало, на 5-тый день после воздействия гипотермии (в период регенерации) содержание гликогена было наибольшим, а на 14-тый день оно уменьшалось. Применение компьютерного анализа изображений позволяет повысить точность и объективность исследования содержания гликогена в печени крыс при экспериментальной гипотермии.

Ключевые слова: печень, гипотермия, гликоген, компьютерный анализ изображений.

Введение

Важнейшей функцией гепатоцитов является их способность запасать и утилизировать гликоген как основной энергетический метаболит. Содержание данного энергетического субстрата важный показатель адаптированности печени к тем или иным неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Поэтому актуальной задачей является изучение метаболизма гликогена при воздействии на организм холодового фактора. По данным Алябьева Ф.В. и соавт. (2014) сразу после холодового воздействия (- 10 и - 18 °С) начинается исчезновение гликогена из печени, но если при температуре - 10 °С к окончанию срока наблюдения содержание гликогена в печени снижается в 2,5-3 раза по сравнению с исходным, то при температуре - 18 °С он исчезает практически до нулевых значений [1]. Аналогичные данные получили и другие авторы [2,3,4]. Резкое снижение гликогена в гепатоцитах при воздействии холодового фактора может указывать на функциональное перенапряжение печени и быстрой мобилизации энергетических ресурсов [5]. По данным Пальчиковой Н.А. и соавт. (1990) через 20 часов после перевода крыс в условия термокомфорта, когда снижается потребность в субстрате для термогенеза, содержание гликогена в гепатоцитах начинает возрастать [6]. В тоже время Верякин В.В. и соавт. (2004) показали, что в зимний период гепатоциты печени мышей-полевок характеризуются более высокими показателями резервов гликогена, чем летом. При этом в цитоплазме гепатоцитов гранулы гликогена образуют большие скопления «гликогеновые озера», оттесняя к ядру и периферии печеночных клеток митохондрии, цистерны эндоплазматической сети и другие органеллы [7].

Однако все эти многочисленные результаты получены полуколичественными субъективными методами. Исследований проведенных с помощью компьютерного анализа изображений в доступной литературе нами обнаружено не было. Поэтому целью данного исследования являлся количественный компьютерный анализ интегральной оптической плотности гликогена в гепатоцитах белых крыс после глубокой экспериментальной гипотермии и в постгипотермический период.

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 [8]. 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, по методу Шабадаш на гликоген, без докраски гематоксилином в автомате для автоматической окраски микропрепаратов TISSUE-TEK Prisma (Sakkura, Япония). Закрывали препараты под пленку в автомате для автоматического заключения микропрепаратов TISSUE-TEK Film (Sakkura, Япония). Компьютерный анализ интегральной оптической плотности (ИОП) гликогена в цитоплазмах 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. У каждого животного исследовали не менее 25-30 гепатоцитов, содержание гликогена выражали в относительных единицах (отн. ед).

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

При окраске гистологических срезов печени экспериментальных животных по методу Шабадаша непосредственно после проведения гипотермии гликоген в гепатоцитах определялся в виде «пылевидной» светло-фиолетовой зернистости и при этом полисахарид был равномерно распределен по цитоплазме печеночных клеток. ИОП полисахарида в цитоплазмах гепатоцитов составила 1676,4±65,4 отн. ед. (рис.).

Через 2 дня после проведения гипотермии отмечали неравномерное распределение гликогена в цитоплазме печеночных клеток в виде крупноглыбчатых и мелкоглыбчатых темно-фиолетовых скоплений, часто сливающихся в гомогенные массы. ИОП полисахарида составила – 2638,5±242,7 отн. ед. (рис.)

Через 5 дней после проведения гипотермии большинство гепатоцитов печени крыс было переполнено гликогеном, который имел вид крупных зерен и глыбок темно-

фиолетово-вишневого цвета, при этом заполнение гранулами цитоплазмы клеток печени в большинстве случаев имело тотальный характер. ИОП полисахарида составила – $4009,2 \pm 197,1$ отн. ед. (рис.).

На 14 день после проведения гипотермии ИОП гликогена в гепатоцитах уменьшалась до $2705 \pm 124,6$ отн.ед., при этом полисахарид определяется в виде мелкой светло-фиолетовой зернистости (рис.).

Рисунок. Динамика изменений интегральной оптической плотности гликогена в клетках печени в различные сроки после проведения гипотермии. По оси абсцисс – срок после гипотермии; по оси ординат – относительные единицы.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что холодовой стресс оказывает выраженное воздействие на углеводный обмен в клетках печени крыс. Сразу после гипотермии в гепатоцитах экспериментальных животных отмечалось значительное уменьшение интегральной оптической плотности гликогена, что может быть связано с повреждающим действием холодового фактора. Далее, на 2-ой день эксперимента (в период адаптации) отмечали возрастание синтеза гликогена. На 5-ый день содержание гликогена в печени было наиболее высоким, что являлось следствием регенерации гепатоцитов, а затем на 14-ый день эксперимента интегральная оптическая плотность гликогена значительно уменьшалась. Компьютерный анализ изображения является перспективным методом объективной оценки содержания гликогена в гепатоцитах крыс при воздействии холодового фактора.

***

1. Алябьев Ф.В., Арбыкин Т.В., Серебров Т.В., Яушев Т.Р., Вогнерубов Р.Н., Мельникова С.Ю., Воронков С.Ю., Логвинов С.В. Морфофункциональные изменения внутренних органов и некоторых биохимических показателей в динамике общего переохлаждения организма // Сибирский медицинский журнал. – 2014. – №2. – С. 71 – 74.
2. Шмерлинг М.Д., Филюшина Е.Е. Ультраструктура гепатоцитов при адаптации крыс к холоду // Морфология. – 1993. – № 7 – 8. – С. 90 – 97.
3. Молодых О.П. Структурные основы адаптивно-компенсаторной реорганизации печени при экстремальных экологических воздействиях: автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Новосибирск, 2001. – 42 с.
4. 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.
5. Шмерлинг М.Д., Бузуева И.И., Филюшина Е.Е., Сагдиева Ш.С. Особенности ультраструктурной реакции мышечных клеток и гепатоцитов адаптированных к холоду на острое охлаждение // Бюллетень СО РАМН. – 1997. – №1. – С. 113 – 117.
6. Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Аршинова Т.В., Шорин Ю.П. Углеводно-жировой метаболизм в условиях адаптации к холоду // Физиологический журнал. – 1989. – №2. – С. 61 – 65.
7. Верякин В.В., Филюшина Е.Е. Ультраструктурная характеристика гепатоцитов при адаптации к холоду в природных условиях // Бюл-летень СО РАМН. – 2004. – №1. – С. 83 – 85.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. – Strasbourg: Council of Europe, 1986. – 51 p.