УДК 619:612.35:639.122

DOI: 10.31563/1684-7628-2019-51-3-36-41

Г.З. Бронникова, Е.Н. Сковородин

УЛЬТРАСТРУКТУРА И КАРИОЦИТОМЕТРИЯ ГЕПАТОЦИТОВ ПЕРЕПЕЛОВ

Ключевые слова: перепела; печень; гепатоциты; ультраструктура; клеточные органеллы; кариоцитометрия; ядра гепатоцитов; ядрышки клеток.

Введение. Морфологическое исследование печени, особенно с использованием электронной микроскопии и кариоцитометрии, занимает в современной гепатологии особое место, т. к. позволяет наиболее точно оценить морфофункциональное состояние органа и дать оценку влияния препаратов, используемых для профилактики гепатопатий [4]. Морфология печени пернатых различных видов изучена довольно подробно, но имеется мало работ по кариоцитометрии и ультраструктуре гепатоцитов птиц при использовании кормовых добавок и микроэлементов [1, 2]. Исследования, посвященные ультраструктуре гепатоцитов перепелов с использованием количественных кариоцитометрических методов, в доступной литературе отсутствуют.

Цель и задачи исследования: изучить функциональную морфологию гепатоцитов перепелов в норме.

Материал и методы исследования. Провели электронно-микроскопическое исследование печени перепелов и помощью кариоцитометрии количественно оценили структуру ядра и ядрышка.

Использовали печень десяти клинически здоровых перепелов месячного возраста, выведенных в КФХ и содержащихся в условиях вивария кафедры. Рацион кормления и условия содержания соответствовали зоотехническим нормам. Все эксперименты были проведены методом острого обескровливания после эфирного наркоза с соблюдением требований «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей», в соответствии с законодательством Российской Федерации (Закон РФ «О ветеринарии»; Уголовный кодекс Российской Федерации. Ст. 245. «Жестокое обращение с животными»; приказом Министерства здравоохранения № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») [5–8]. Для электронной микроскопии материал фиксировали в охлажденном 2,5 % глютаральдегиде на фосфатном буфере с pH 7,3. Фиксировали в 1 % растворе ос-

миевой кислоты на фосфатном буфере. Кусочки заливали в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы монтировали, контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе при увеличении до 30000. Измерения проводили с помощью миллиметровых линеек и методом точечного счета. Объем ядра и ядрышек определяли по формуле:

$$V = \frac{\pi}{6} \times L \times B^2, \quad (1)$$

где L – длинный диаметр, B – короткий диаметр.

Результаты исследований и их обсуждение. Установили, что гепатоциты представляют собой полигональную клетку диаметром 5–10 мкм. Они имеют два полюса – синусоидальный и билиарный, различающиеся характером расположения органелл. Цитоплазма гепатоцитов характеризуется наличием большого количества митохондрий округлой или вытянутой формы диаметром от 1–1,5 мкм и длиной на продольных срезах до 3 мкм. Встречаются гантелевидные, вероятно делящиеся митохондрии. При этом в некоторых гепатоцитах преобладают митохондрии округлой формы, в других вытянутые до нескольких микрон. С чем это связано? По нашему мнению, это объясняется односторонностью митохондриальной сети в гепатоцитах вытянутой формы и плотным расположением митохондриальных тяжей, что характерно для печени перепелов (рисунки 1, 8). Митохондрии имеют характерное строение, содержат значительное число расширенных, полукруглых коротких крист, расположенных по периферии и не достигающих до середины органеллы. Некоторые кристы на фоне электронно-плотного гранулированного матрикса выглядят светлыми, а в митохондриях относительно светлого матрикса – темными со светлой серединой (рисунки 2, 3). В светлых гепатоцитах чаще встречаются митохондрии небольшой величины с множеством мелких крист. Митохондрии гепатоцитов располагаются в околядерной зоне, на синусоидальном и билиарных полюсах. Функции митохондрий связаны со способностью «хранить» энергию в фосфатных связях АТФ, окислением трикарбоновых и жирных кислот, синтезом мочевой кислоты и других веществ.

Синтетическая активность клеток связана с их количеством и морфологией. Количество митохондрий может увеличиваться. Это особенно ярко выражено при делении, увеличении функциональной активности клетки. Происходит постоянное обновление митохондрий [3]. Мы наблюдали большее количество митохондрий и большую величину этих ультраструктур в крупных клетках с большим светлым ядром и ядрышком гранулированного типа. В двуядерных гепатоцитах митохондрий больше и они крупнее. В гепатоцитах перепелов хорошо развита цитоплазматическая сеть. При электронно-микроскопическом исследовании она выявляется в виде ограниченных мембранных канальцев и везикул. Зернистая цитоплазматическая сеть (ЗЦС) покрыта рибосомами. Гладкая цитоплазматическая сеть (ГЦС) лишена рибосом. Соотношение ЗЦС и ГЦС различно в зависимости от функционального состояния клетки и видовых особенностей организма. У крыс ЗЦС составляет более 60 %, у мышей ЗЦС преобладает над ГЦС, у собак это соотношение изменено в сторону ГЦС, у человека относительное содержание ЗЦС и ГЦС составляет соответственно 25 и 75 % всей цитоплазматической сети [4].

ЗЦС перепелов представлена главным образом плоскими цистернами, лежащими чаще всего близко к митохондриям, окружая их частично или полукругом, образуя своеобразную «шапочку» (рисунок 2), или вокруг митохондрии в виде кольца (рисунки 4, 9). Последнее чаще наблюдается в двуядерных гепатоцитах. Если в срезе видны удлинённые митохондрии, профили ЗЦС располагаются близко между ними в виде тяжей (рисунок 1). Описанная картина является видовой особенностью гепатоцитов перепелов. Цистерны ЗЦС в гепатоцитах перепелов, в отличие от млекопитающих животных, фрагментированы, не образуют стопок параллельно расположенных мембран. ГЦС гепатоцитов у перепелов представлена двумя типами: первым – преобладающим, который имеет вид везикул различных размеров и форм, чаще диаметром 0,1 мкм (рисунки 1, 3); вторым – плотно упакованными мембранами без выраженных полостей. Функциональное значение указанных типов ГЦС не выяснено. Первый тип располагается преимущественно на билиарном полюсе гепатоцита.

Кроме того, в цитоплазме гепатоцитов перепелов встречаются лизосомы, периксомы, пластинчатый комплекс, филаментозные структуры, липиды, гликоген. Но наибольшую информативность для оценки функционального состояния гепатоцитов имеет ядро и располага-

ющееся в нем структуры и ядрышко. Ядра гепатоцитов имеют преимущественно округлую, овальную форму, редко они выглядят овально вытянутыми. Величина ядра колеблется от 4 до 6 мкм. Интегрирующим показателем размеров ядра является его объем, рассчитываемый по указанной выше формуле на основе короткого и длинного диаметров. Этот показатель колеблется от 21 до 81 мкм³. Во всех ультратонких срезах гепатоцитах перепелов, прошедших через ядро, видны ядрышки, в которых можно различить следующие пять компонентов: гранулярный компонент, фибриллярные центры, плотный фибриллярный компонент, хроматин, белковый сетчатый матрикс. Ретикулярный или нуклеолонемный, компактный, кольцевидный, остаточный (покоящийся), сегрегированный типы ядрышек различают на основании преобладания какого-то компонента.

Ультраструктура ядрышек гепатоцитов характеризуется волокнистой и сетчатой структурами, заключенными в плотную диффузную массу, которая окружает гранулярную структуру с низкой плотностью и формирует фибриллярные центры. Вокруг ядрышек выявляется компактная зона хроматина (околоядрышкового), который виден не только по периферии, но и между петлями гранулярного компонента. Структура и величина ядрышек тесно коррелирует с синтетической активностью клетки. Кроме того, установлено, что действие различных веществ (антибиотиков, токсинов, лекарств) вызывает в клетках падение синтетической активности и в первую очередь активности ядрышек, проявляющей морфологическими изменениями. Кариометрия ядрышек и ядер позволяет выявить закономерности изменения объема ядрышек при разных функциональных состояниях и сравнить их с ультраструктурными изменениями ядра и цитоплазмы. Установили, что величина ядрышек гепатоцитов перепелов колеблется от 1 до 2,5 мкм. Наиболее точным и информативным, по нашему мнению, является такой показатель, как объем ядрышка, поскольку эти структуры имеют округлую или овальную форму. Установили, что объем ядрышек варьирует от 0,2 до 9 мкм³, что существенно коррелирует с гранулярно-фибриллярной структурой этой органеллы, объемом ядра и количеством митохондрий и гранулярной эндоплазматической сети. Ядрышки объемом от 0,2 до 0,5 мкм³ встречаются у 25 % гепатоцитов. Такие ядрышки располагаются эксцентрично или ближе к центру ядра, имеют округлую форму. Они не обладают нуклеонемной гранулярной структурой (рисунки 4, 5), плотные, состоящие

из тесно расположенных тонких фибрилл. Гранул в них совсем нет или же одиночные гранулы встречаются иногда по периферии. Такую структуру можно отнести к сжатому фибриллярному типу или компактному типу строения ядрышка. Более крупные ядрышки, величина которых достигает $0,5\text{--}1\text{ мкм}^3$, встречаются чаще (35 %). Они становятся более светлыми за счет снижения осмиофильных свойств и в них появляется небольшой светлый участок, окруженный плотным фибриллярным компонентом – фибриллярный центр, а по периферии располагаются крупные участки конденсированного хроматина, так называемые «спутники» ядрышка (рисунок 6). Еще более крупные ядрышки ($1\text{--}6\text{ мкм}^3$) встречаются в 35 % случаев. Они становятся еще более светлыми, в них увеличивается гранулярная часть, они приобретают неправильную форму за счет инвагинаций и выступов, растут величина фибриллярных центров до $0,55\text{ мкм}$ и их количество; число «спутников» увеличивается до трех (рисунки 1, 10–12). Крупные гипертрофированные ядрышки, объем которых достигает 9 мкм^3 , встречается в 5 % гепатоцитов. У них нуклеонемная часть выражена хорошо, они богаты гранулами, фибриллярные зоны невелики и не выделены в обособленные участки, не всегда имеются фибриллярные центры вследствие декоденсации, наблюдается

проникновение светлого ядерного вещества, за счет чего создается впечатление разделения ядрышка (рисунок 8). Такую структуру можно отнести к ретикулярному типу ядрышка. Структура ядрышек в гипертрофированных двуядерных клетках имеет свои особенности. Двуядерные гепатоциты с близко расположенными ядрами приблизительно одинаковой величины, давящими друг на друга, содержат ядрышки различной структуры, отличающиеся по величине в 2–3 раза. Крупное ядрышко может достигать 9 мкм^3 и имеет типичный ретикулярный тип строения. Ядрышко во втором ядре имеет переходный тип строения от компактного к ретикулярному. Это свидетельствует о разной функциональной нагрузке ядер в двуядерном гепатоците. Второе ядро можно рассматривать как «дополнительное», обеспечивающее повышенную синтетическую активность гипертрофированного гепатоцита (рисунки 7, 8). Важным показателем морфофункциональной активности клетки является ядрышко – ядерное отношение (Яко/Я), которое рассчитывали делением объема ядрышка на объем ядра. Этот показатель колеблется более чем в десять раз ($0,01$ до $0,13$). Низкое Яко/Я-отношение наблюдается в гепатоцитах с небольшим ядром, что отражает низкую синтетическую активность этих клеток.

Рисунок 1
Билиарный полюс гепатоцита.
Ув. 8000

Рисунок 2
Митохондрии с хорошо видимыми кристами
в гепатоцитах. Ув. 30000

Рисунок 3
Цитоплазма и фрагмент ядра гепатоцита.
Ув. 16000

Рисунок 4
Билиарный полюс гепатоцита, пигменты
в лизосомах. Ув. 8000

Рисунок 5
«Темный» гепатоцит. Интерхроматиновые гранулы
в ядре. Ув. 10000

Рисунок 6
«Светлый» гепатоцит. Ядрышко, митохондрии,
ЗЦС, ГЦС, лизосомы. Ув. 10000

Рисунок 7
Двоядерный гепатоцит. Ядра с ядрышками,
митохондрии, ЗЦС. Ув. 10000

Рисунок 8
Двоядерный гепатоцит, звездчатый макрофаг,
эритроцит, синусоид. Ув. 8000

Рисунок 9
«Темный» гепатоцит. Ядро с интерхроматиновыми
гранулами. Ув. 10000

Рисунок 10
«Темный» гепатоцит с фибриллярными центрами
в ядрышках. Ув. 10000

Рисунок 11
«Светлый» гепатоцит. Ядрышко со «спутником».
Ув. 10000

Рисунок 12
Гепатоциты, звездчатый макрофаг, синусоид.
Ув. 5000

Средняя величина отношения наблюдается как в мелких, так средних и крупных гепатоцитах, что свидетельствует о функциональной ге-

терогенности гепатоцитов. Высокое Яко/Я-отношение наблюдается в двоядерных гипертрофированных гепатоцитах. Этот показатель поз-

воляет интегрировать величины объема ядра и ядрышка и оценивать функциональную активность клетки.

Гепатоциты – это функционально активные клетки, выполняющие более пятисот функций, поэтому ядра этих клеток светлые и содержат мало периферического хроматина, формирующего вытянутые уплощенные тяжи, между которыми располагаются внутриядерные каналы. Имеется также околядрышковый хроматин. Кроме того, в большинстве ядер встречаются перихроматиновые гранулы. Периферический хроматин по ходу внутренней ядерной мембраны образует тяжи. Они тонкие, в виде небольших овальных возвышений, крупных возвышений, вытянутых к центру ядра островков или крупных конгломератов. В крупных ядрах (рисунки 8, 11) периферический хроматин имеет вид узких полосок с большим количеством близко расположенных внутриядерных канальцев. В более мелких ядрах (рисунки 4, 6, 10) периферический хроматин представлен более крупными гранулами или даже конгломератами с редко расположенными внутриядерными канальцами. Хроматиновые островки в нуклеоплазме гепатоцитов располагаются на значительных расстояниях. Они преимущественно небольшой величины, осmioфильные. Кроме того, встречаются формы островков, имеющих гранулярную структуру. В крупных ядрах островков мало, а в более мелких их заметно больше и они более крупные и осmioфильные. Перихроматиновые гранулы мелкие и окружены просветленным ободком. Между гранулами и перихроматинизированными фибриллами существует структурная связь. При увеличении более чем в 30 тысяч раз внутри гранул можно видеть тонкие извитые фибриллы [3]. Располагаются они ближе к центру ядра, только на периферии конденсированного хроматина, в диффузном хроматине их нет. Ин-

терхроматиновые гранулы – это третий тип структур, содержащих РНК (наряду с перихроматиновыми фибриллами и гранулами). У перепелов они группируются в форме крупных скоплений между участками хроматина в виде «россыпи» (рисунки 5, 9). У водоплавающих птиц они имеют аналогичную структуру [1, 2]. У животных эти гранулы не одинаковы по величине, переплетены с тонкими фибриллами и образуют четкообразные или сетчатые фигуры. Совершенно не ясно их функциональное значение [3]. Ядерная оболочка гепатоцитов имеет типичное строение и состоит из двух мембран, внешней и внутренней, между которыми располагается перинуклеарное пространство. Ядерная оболочка имеет характерную особенность, отличающую ее от других двухмембранных структур клетки (митохондрии и пластиды). Это наличие особых ядерных пор, которые образуются за счет многочисленных зон слияния двух ядерных мембран и представляют собой как бы округлые, сквозные перфорации всей ядерной оболочки.

Выводы. Ультраструктура гепатоцитов перепелов свидетельствует о высокой синтетической активности данных клеток, выполняющих в организме этих быстро растущих птиц более пятисот функций. Кариоцитометрия гепатоцитов позволяет выявить скрытые морфофункциональные особенности ультраструктуры клеток, которые при обычном качественном описании электроннограмм не выявляются. Кариоцитометрия гепатоцитов перепелов свидетельствует о ярко выраженной структурно-функциональной гетерогенности гепатоцитов. Электронномикроскопическое исследование с использованием кариоцитометрических методов является высокоинформативным методом оценки морфофункционального состояния органа, и его необходимо использовать при оценке влияния на организм фармакологических препаратов.

Библиографический список

1. Губайдуллин, А.С. Ультраструктурная характеристика печени гусей при использовании гепатопротектора «Диронакс» [Текст] / А.С. Губайдуллин, Е.Н. Сковородин, И.Р. Кильметова // Актуальные проблемы современной ветеринарной науки и практики: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института (июнь 2016 г.). Краснодар, 2016. С. 19–21.
2. Давлетова, В.Д. Количественная цитометрия печени мускусных уток [Текст] / В.Д. Давлетова // Инновационному развитию аг-

- ропромышленного комплекса – научное обеспечение. Материалы международной научно-практической конференции в рамках XXII Международной специализированной выставки «Агрокомплекс-2012». Уфа, 2012. С. 234–236.
3. Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию [Текст] / Ю.С. Ченцов. М., 2004. 495 с.
4. Serov V.V., Lapish K. Morphological diagnosis of liver diseases. Moscow, 1989. 336 p.
5. О ветеринарии [Текст]: Закон РФ.
6. Жестокое обращение с животными [Текст]: статья 245 // Уголовный кодекс Российской Федерации.

7. О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных [Текст]: приказ министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977.

8. Council of Europe – ETS no. 125 – European Convention for the Protection of Pet Animals.

Сведения об авторах

1. **Бронникова Гузель Замилевна**, аспирант кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, 450001, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, тел.: (347) 228-28-77, e-mail: skovorodinen@mail.ru.

2. **Сковородин Евгений Николаевич**, доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, 450001, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, тел.: (347) 228-28-77, e-mail: skovorodinen@mail.ru.

Изучена функциональная морфология гепатоцитов перепелов. Для этого проведено электронно-микроскопическое исследование печени перепелов. Количественно оценили структуру ядра и ядрышка с помощью объективных методов кариоцитометрии. Установили, что гепатоциты перепелов характеризуются высокой синтетической активностью. Кариоцитометрия гепатоцитов позволяет выявить скрытые морфофункциональные особенности ультраструктуры клеток, которые при обычном качественном

описании электроннограмм не выявляются. Кариоцитометрия гепатоцитов перепелов свидетельствует о ярко выраженной структурно-функциональной гетерогенности гепатоцитов. Электронно-микроскопическое исследование с использованием кариоцитометрических методов является высокоинформативным методом оценки морфофункционального состояния органа, и его необходимо использовать при оценке влияния на организм фармакологических препаратов.

G. Bronnikova, E. Skovorodin

ULTRASTRUCTURE AND HEPATOCYTE KARYOCYTOMETRY OF QUAILS

Key words: *quails; liver; hepatocytes; ultrastructure; cell organelles; hepatocyte nuclei; cell nucleoli.*

Authors' personal details

1. **Bronnikova Guzel**, Post-graduate student the Morphology, pathology, pharmacy and noncontagious diseases department, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University», Ufa, 50-letia Octiabria St., 34, phone: (347) 228-28-77, e-mail: skovorodinen@mail.ru.

2. **Skovorodin Evgeny**, Doctor of veterinary sciences, professor, head of the Morphology, pathology, pharmacy and noncontagious diseases department, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University», Ufa, 50-letia Octiabria St., 34, phone: (347) 228-28-77, e-mail: skovorodinen@mail.ru.

The paper studies the functional morphology of quail hepatocytes. To conduct the research there was an electron-microscopic examination of quail liver. The structure of the nucleus and nucleolus were quantitatively assessed using objective methods of karyocytometry. Quail hepatocytes are found to have high synthetic activity. Hepatocyte karyocytometry enables to reveal hidden morphological characteristics of the cell ultrastructure being hardly

detected under normal qualitative description of electron-diffraction photos. Quail hepatocyte karyocytometry indicates a pronounced structural and functional heterogeneity of hepatocytes. Therefore, electron-microscopic examination using karyocytometric methods is a highly informative method for assessing the morphological and functional state of the body and it should be used in assessing the impact of pharmacological agents on the body.

© Бронникова Г.З., Сковородин Е.Н.