

УДК 591.8:57.045:57.017.35

ГИСТОСТЕРЕОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ТКАНЕВОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ КОНТРАСТНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Молодых О.П., Капустина В.И., Клиникова М.Г., Колдышева Е.В.,

Бакарев М.А., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М.

*ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии»,
Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru*

Проведено комплексное морфологическое и гистостереологическое исследование печени крыс Вистар после воздействия умеренного и чрезмерного охлаждения и однократного общего перегревания. Показано, что из-за контрастных температурных воздействий развиваются стереотипные морфофункциональные изменения: выраженные нарушения крово- и лимфообращения (венозное и синусоидное полнокровие, лимфостаз, сладж эритроцитов), дистрофия и некробиоз гепатоцитов с резорбцией их мононуклеарными клетками. Закономерностью пространственной реорганизации печени при экстремальных температурных воздействиях является диспропорциональный характер изменений объемных плотностей синусоидов и гепатоцитов. При этом в условиях умеренного общего охлаждения и в начальный период посттепловой реституции происходит уменьшение объемного отношения синусоидов к гепатоцитам, а при чрезмерном общем охлаждении отмечается увеличение этого параметра. Стереотипной реакцией гепатоцитов на охлаждение и перегревание является увеличение ядерно-цитоплазматических отношений при снижении поверхностно-объемных отношений ядер гепатоцитов, что свидетельствует о гипертрофии ядер и усилении их функциональной активности. Диспропорциональный характер изменений объемных и поверхностных плотностей основных тканевых и цитоплазматических компартментов печени приводит к «атипичной» регенерации, которая характеризуется нарушением тканевой архитектоники.

Ключевые слова: охлаждение, перегревание, печень, тканевая реорганизация, стереология

HISTOSTEREOLOGIC ANALYSIS OF SPATIAL TISSUE REORGANIZATION PATTERNS OF RAT LIVER UNDER CONTRAST TEMPERATURE EXPOSURE

Molodykh O.P., Kapustina V.I., Klinnikova M.G., Koldysheva E.V.,

Bakarev M.A., Lushnikova E.L., Nepomnyaschikh L.M.

Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, e-mail: pathol@inbox.ru

A complex morphological and histostereologic study of Wistar rats liver after exposure to a moderate and excessive cooling and a single general overheating was carried out. It was shown that contrasting temperature exposure induce stereotypical morphological changes: severe disorders of blood and lymph circulation (venous and sinusoidal hyperemia, lymphedema, sludge of erythrocytes), dystrophy and necrobiosis of hepatocytes with their resorption by mononuclear cells. The typical feature of liver spatial reorganization under extreme temperature influences is a disproportionate nature of changes of sinusoid and hepatocyte volume densities. Under conditions of moderate cooling and during the initial period of afterheat restitution the volume ratio of sinusoids to hepatocytes decreases, and under excessive total cooling this parameter increases. For hepatocytes, stereotypical reaction to cooling and overheating is the increase of nuclear-cytoplasmic ratio and, at the same time, reduction of surface-volume ratio of hepatocyte nuclei, which indicates nuclear hypertrophy and functional enhancement. The disproportionate changes in volume and surface densities of the main tissue and cytoplasmic compartments of the liver lead to «atypical» regeneration, which is characterized by impaired tissue architectonics.

Keywords: cooling, overheating, the liver, tissue reorganization, stereology

Печень, играя ведущую роль в пластических и энергетических процессах организма, включается в адаптивно-компенсаторные реакции при всех экзогенных и эндогенных неблагоприятных воздействиях, даже в тех случаях, когда повреждающие факторы не обладают прямым гепатотропным эффектом [5, 7–11]. Значительное число исследований направлено на выявление и изучение структурных и метаболических проявлений повреждений печени, а также регенераторных процессов в этом органе при различных токсических воздействиях [1, 2, 4, 6].

Однако структурно-функциональные перестройки печени при действии контрастных температурных факторов изучены в недостаточной степени. Морфогенетические процессы, протекающие в ходе как нормального развития, так и при действии экстремальных факторов среды, характеризуются определенными пространственно организованными событиями в тканевых и клеточных системах [3, 12]. Архитектоника тканей и клеток отражает оптимальную для конкретных условий существования пространственную организацию функций,

которая, наряду с такими процессами, как пролиферация, дифференцировка, созревание, гипертрофия, определяет особенности регенерации и компенсаторно-приспособительных реакций тканей и клеток. В этом аспекте оценка закономерностей пространственной реорганизации тканевых и клеточных систем имеет большое значение для выяснения регенераторных и адаптивных стратегий, а также направленности морфогенетических процессов.

Цель исследования – изучить общие закономерности и особенности структурной реорганизации печени при действии на организм контрастных температур на тканевом уровне.

Материал и методы исследования

Комплексный морфологический анализ печени экспериментальных животных проводили при контрастных температурных воздействиях – общем охлаждении и однократном общем перегревании организма. Эксперимент проведен с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), одобрено этическим комитетом ФГБНУ ИМПМ.

В первую экспериментальную группу (умеренное охлаждение, 3–4°C) входило 66 крыс-самцов линии Вистар в возрасте 5 мес. (из них 23 животных – контроль). Животных содержали в индивидуальных клетках без ограничения доступа к воде и пище в течение 6 и 8 нед, после чего декапитировали. Во вторую экспериментальную группу (чрезмерное охлаждение, –7°C) входило 66 крыс-самцов линии Вистар в возрасте 4 мес. (из них 22 животных – контроль). Животных содержали в термальной камере в индивидуальных клетках постоянно, исключая время кормления. Время пребывания в термальной камере при выбранном режиме охлаждения определялось выживаемостью животных – массовая гибель животных наблюдалась после 16 сут. Исходя из этого длительность экспозиции составила 8 и 16 сут.

Воздействие однократного общего перегревания (42–43°C) изучали на 36 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 2 мес. (из них 9 животных – контроль). Время экспозиции животных в термальной камере (45 мин) определялось выживаемостью и соответствовало предельному сроку, после которого отмечалась их массовая гибель. Забор материала для морфологического исследования осуществляли сразу после перегревания, на 3-и, 7-е и 14-е сутки. Контрольных животных во всех сериях экспериментов содержали в обычных условиях вивария на стандартном лабораторном корме и при свободном доступе к воде.

Животных декапитировали в первой половине дня, производили макроскопическое обследование внутренних органов. Образцы печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина при комнатной температуре не менее 2 сут. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином с постановкой реакции Перлса, по методу ван Гизона с докраской эластических волокон резорцин-

фуксином Вейгерта, ставили PAS-реакцию; полутонкие (1 мкм) срезы окрашивали 1% раствором азур II.

Стереологический анализ проводили с помощью метода, основанного на подсчете числа точек тестовой системы, попавших на профиль исследуемой структуры, и числа пересечений тестовой линии с границами этой структуры, анализируя неперекрывающиеся поля зрения при увеличении 1320. Вычисляли относительные и абсолютные стереологические параметры: объемную плотность (относительный объем) гепатоцитов и их ядер, синусоидов, эндотелиальных клеток, клеток соединительной ткани без их дифференциации и суммарно основного вещества и волокон соединительной ткани; поверхностную плотность (относительную площадь поверхности) гепатоцитов и их ядер, синусоидных капилляров, клеток соединительной ткани. На основании первичных стереологических параметров рассчитывали вторичные, описывающие количественные взаимоотношения между компонентами стромы и паренхимы: поверхностно-объемное отношение структур, объемное отношение стромы к паренхиме, объемное и поверхностно-объемное отношение синусоидов к гепатоцитам.

Статистическая обработка результатов включала нахождение средних значений изучаемых параметров, вычисление дисперсии и ошибок средних (t-критерий Стьюдента).

Результаты исследования и их обсуждение

Общее охлаждение организма. Контрастные температурные воздействия вызывали различную направленность в изменениях массы тела и массы печени животных. Чрезмерное охлаждение в течение 16 сут и умеренное охлаждение в течение 6 нед привело к увеличению относительной массы печени на 12 и 22% ($p < 0,05$) соответственно. При чрезмерном охлаждении увеличение относительной массы печени происходило за счет снижения массы тела животных (на 16%, $p < 0,05$), а при умеренном охлаждении – за счет увеличения массы печени (на 24%, $p < 0,01$). При воздействии высоких температур существенных изменений абсолютной и относительной массы печени не наблюдалось.

Тканевые изменения печени при общем умеренном и чрезмерном охлаждении носили стереотипный характер: на фоне нарушений гемодинамики развивались повреждения гепатоцитов, обусловившие мозаичность окрашивания паренхимы печени кислыми красителями. При умеренном общем охлаждении при сохранении общего строения печени отмечалось увеличение количества гепатоцитов с литическими повреждениями, со значительной разреженностью перинуклеарной зоны, пикнозом ядер. В гепатоцитах с нормальными тинкториальными свойствами отмечались выраженные полиморфизм и гипертрофия ядер гепатоцитов. Умеренное холодовое воздействие в течение 6 нед. привело к увеличению выработки липидов – обилие липидных капель в цитоплазме с преимущественным их

накоплением на синусоидальных полюсах. К 8-й неделе эксперимента происходило существенное перераспределение липидов: в цитоплазме гепатоцитов их содержание существенно снижалось, а в клетках Ито – возрастало; нарастала интенсивность литических повреждений гепатоцитов, увеличивались размеры очагов некроза паренхимы, их диффузная моноклеарная инфильтрация и моноклеарная инфильтрация стромы и портальных трактов; сохранялся выраженный полиморфизм ядер гепатоцитов и их гипертрофия.

При чрезмерном охлаждении отмечалась аналогичная тенденция: на 8-е и 16-е сутки охлаждения отмечено выраженное увеличение размеров ядер и присутствие в ядрах липидных включений. К 16-м суткам выявлено усиление литических повреждений гепатоцитов, обширные некрозы паренхимы и формирование в очагах некроза моноклеарных инфильтратов; усиление склеротических процессов. При чрезмерном общем охлаждении зарегистрированы более выраженные, чем при умеренном охлаждении, нарушения гемодинамики – полнокровие вен и синусоидов, отек стромы портальных трактов.

Изменения пространственной организации тканевого микрорайона печени при низких температурах носили в основном стереотипный характер. Зарегистрировано увеличение объемной и поверхностной плотности ядер гепатоцитов на 37 и 19% ($p < 0,05$) через 6 нед. умеренного охлаждения и на 30 и 22% через 8 сут чрезмерного охлаждения, что обусловило достоверное снижение их поверхностно-объемного отношения в обеих моделях (соответственно на 14 и 7%) и свидетельствовало о гипертрофии и усилении функциональной активности ядер. При чрезмерном и умеренном охлаждении выявлены однонаправленные изменения ядерно-цитоплазматических отношений в гепатоцитах: происходило увеличение ядерно-цитоплазматического отношения на 6-й и 8-й неделе умеренного охлаждения на 32 и 14% ($p < 0,05$) и на 8 и 16-е сутки чрезмерного охлаждения на 33 ($p < 0,01$) и 19% ($p < 0,05$), соответственно. Важным моментом пространственной реорганизации тканевого микрорайона печени при умеренном общем охлаждении через 6 и 8 нед. эксперимента было уменьшение объемной (на 31 и 23%) и поверхностной (на 24 и 10%) плотности синусоидов. Это приводило к снижению объемного отношения синусоидов к гепатоцитам в эти сроки (на 35 и 26%, $p < 0,05$) и уменьшению поверхностно-объемного отношения синусоидов к гепатоцитам (на 28 и 13%). Особенностью умеренного охлаждения являлось снижение объемного отношения стромы к паренхиме на 6-й и на 8-й неделях эксперимента на 28 и 22% ($p < 0,05$).

При чрезмерном общем охлаждении организма через 16 сут воздействия отмечено увеличение объемного (на 14%), поверхностно-объемного (на 21%, $p < 0,05$) отношения синусоидов к гепатоцитам и увеличение объемной плотности неклеточной компоненты соединительной ткани (на 43%, $p < 0,05$). Такие изменения основных компонентов стромы обусловили увеличение (на 21%) стромально-паренхиматозного отношения к 16-м суткам чрезмерного общего охлаждения.

Общее перегревание организма. Наиболее выраженные морфофункциональные изменения в печени крыс Вистар наблюдались на 3-и сутки после однократного общего перегревания – значительные изменения гемодинамики в виде полнокровия вен и синусоидных капилляров, на фоне которых развивались дистрофические и некробиотические повреждения гепатоцитов; усиление регенераторной активности отдельных гепатоцитов (появление двуядерных гепатоцитов в состоянии митоза с четко оформленным хроматином в виде жгутов, а также слияние ядер). На 7-е сутки происходило в основном восстановление гистологического строения печени, но оставались крупные очаги атрофированных гепатоцитов, окруженные моноклеарными клетками; в строме портальных трактов и в очагах некроза происходило увеличение количества фибробластов. К 14-м суткам посттепловой реституции в перипортальной зоне происходило увеличение количества крупных очагов моноклеарных инфильтратов, окружавших дегенерирующие гепатоциты; в строме портальных трактов и в очагах некроза фиксировалось большое количество фибробластов; регистрировалось усиление регенераторной активности двуядерных гепатоцитов (формирование хроматиновых нитей и сближение ядер).

Пространственная реорганизация тканевого микрорайона печени наиболее существенно изменялась на 3-и сутки после перегревания – происходило увеличение объемной плотности гепатоцитов на 5% ($p < 0,05$) и снижение поверхностно-объемного отношения гепатоцитов на 16% ($p < 0,05$), что свидетельствовало об увеличении их размеров (гипертрофии). Снижение объемной (на 8%) и поверхностной (на 26%, $p < 0,05$) плотности синусоидов и увеличение объемной плотности гепатоцитов в этот же срок обусловило уменьшение объемного (на 13%, $p < 0,05$) и поверхностно-объемного (на 29%, $p < 0,05$) отношения синусоидов к гепатоцитам. Уменьшение объемной плотности основных компонентов стромы – синусоидов, клеток, волокон и основного вещества соединительной ткани в этот же срок обусловило снижение объемного отношения стромы к паренхиме

(соответственно на 23 и 18%, $p < 0,05$). На 7-е сутки после перегревания было зафиксировано усиление процессов тканевой перестройки печени – снижение объемной (на 4%, $p < 0,05$) и поверхностной (на 18%, $p < 0,05$) плотности гепатоцитов, что было обусловлено усилением дистрофических и некробиотических процессов; увеличение объемной плотности синусоидов (на 20%, $p < 0,05$), что приводило к увеличению объемного отношения синусоидов к гепатоцитам (на 24%, $p < 0,05$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что в печени животных под действием экстремальных экологических факторов (контрастных температурных воздействий) развиваются стереотипные морфофункциональные изменения: выраженные нарушения крово- и лимфообращения, дистрофия и некробиоз гепатоцитов с резорбцией их мононуклеарными клетками. Причем морфофункциональные изменения печени при общем охлаждении не вызваны снижением температуры тела, а обусловлены общим адаптационным синдромом и перераспределением пластических и энергетических ресурсов для достижения оптимального уровня теплопродукции [7, с. 10–12]. В результате усиления термогенеза и перераспределения пластических веществ при общем охлаждении организма в печени замедляются регенераторные процессы и постепенно снижается тканеспецифический белковый синтез, приводя к развитию дистрофических и некробиотических повреждений гепатоцитов и реактивным изменениям со стороны соединительной ткани. Общей закономерностью пространственной реорганизации печени на тканевом уровне при действии экстремальных экологических факторов является диспропорциональный характер изменений объемных и поверхностных плотностей основных тканевых компарментов, что приводит к «атипичной» регенерации, которая характеризуется нарушением тканевой архитектоники.

Список литературы

1. Ермолаева Л.А., Дубская Т.Ю., Фомина Т.И., Ветошкина Т.В., Гольдберг В.Е. Токсическое действие противоположного препарата паклитаксела на морфофункциональное состояние печени крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2008. – Т. 145, № 2. – С. 225–228.
2. Калашникова С.А., Горячев А.Н., Новочадов В.В., Щеголев А.И. Тиреоидная модуляция ФНО-зависимого апоптоза и формирование хронической патологии печени при эндогенной интоксикации у крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2009. – Т. 147, № 2. – С. 201–206.
3. Лушникова Е.Л., Молодых О.П., Непомнящих Л.М. Морфологическое исследование печени мышевидных грызунов из районов Алтайского края, подвергнутых радиационному воздействию // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 1997. – Т. 37, вып. 6. – С. 860–869.
4. Молодых О.П., Лушникова Е.Л., Бакулина А.А. Ремоделирование печени крыс при гепатотоксическом воздействии доксорубина // *Бюллетень Сибирского отделения РАН*. – 2008. – № 6. – С. 104–112.
5. Молодых О.П., Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Клиникова М.Г. Апоптоз: снижение общей численности популяции гепатоцитов мышей после гипертермии // *Бюлле-*

тень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 9. – С. 346–350.

6. Непомнящих Л.М., Молодых О.П., Лушникова Е.Л., Сорокина Ю.А. Морфогенез и гистостереологический анализ гепатопатии, индуцированной циклофосфамидом // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2010. – Т. 149, № 1. – С. 113–120.
7. Перепечаева М.Л., Гришанова А.Ю. Индуцируемые холодом активности цитохромов P450 1A1 и 1A2 в печени крыс: возможная роль эндогенных соединений в механизме индукции // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2012. – Т. 154, № 11. – С. 593–597.
8. Солин А.В., Ляшев Ю.Д. Стрессиндуцированные изменения в печени крыс с разной устойчивостью к стрессу // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – Т. 157, № 5. – С. 584–586.
9. Li D., Wang X., Liu B., Liu Y. et al. Exercises in hot and humid environment caused liver injury in a rat model // *PLoS One*. – 2014 (Dec 30). – Vol. 9(12). – P. e111741.
10. Mollica M.P., Lionetti L., Crescenzo R. et al. Cold exposure differently influences mitochondrial energy efficiency in rat liver and skeletal muscle // *FEBS Lett.* – 2005. – Vol. 579(9). – P. 1978–1982.
11. Mininni A.N., Milan M., Ferrareso S. et al. Liver transcriptome analysis in gilthead sea bream upon exposure to low temperature // *BMC Genomics*. – 2014. – Vol. 15. – P. 765.
12. Oda T., Shimizu K., Yamaguchi A., Satoh K., Matsumoto K. Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones // *Cryobiology*. – 2012. – Vol. 65(2). – P. 104–112.

References

1. Ermolaeva L.A., Dubskaya T.Ju., Fomina T.I., Vetoshkina T.V., Goldberg V.E. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2008, vol. 145, no. 2, pp. 225–228.
2. Kalashnikov S.A., Goryachev A.N., Novochadov V.V., Shegolev A.I. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2009, vol. 147, no. 2, pp. 201–206.
3. Lushnikova E.L., Molodykh O.P., Nepomnyashchikh L.M. *Radiatsionnaya biologiya. Radioecologiya*, 1997, vol. 37, no. 6, pp. 860–869.
4. Molodykh O.P., Lushnikova E.L., Bakulina A.A. *Byulleten Sibirskogo otdeleniya RAMS*, 2008, no. 6, pp. 104–112.
5. Molodykh O.P., Nepomnyashchikh L.M., Lushnikova E.L., Klinnikova M.G. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2000, vol. 130, no. 9, pp. 346–350.
6. Nepomnyashchikh L.M., Molodykh O.P., Lushnikova E.L., Sorokina Ju.A. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2010, vol. 149, no 1, pp. 113–120.
7. Perepechaeva M.L., Grishanova A.Ju. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2012, vol. 154, no 11, pp. 593–597.
8. Solin A.V., Lyashev Ju. D. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2014, vol. 157, no. 5, pp. 584–586.
9. Li D., Wang X., Liu B., Liu Y. et al. *PLoS One*, 2014, vol. 9(12), p. e111741.
10. Mollica M.P., Lionetti L., Crescenzo R. et al. *FEBS Lett.*, 2005, vol. 579(9), pp. 1978–1982.
11. Mininni A.N., Milan M., Ferrareso S. et al. *BMC Genomics*, 2014, vol. 15, p. 765.
12. Oda T., Shimizu K., Yamaguchi A., Satoh K., Matsumoto K. *Cryobiology*. 2012, vol. 65(2), pp. 104–112.

Рецензенты:

Селятицкая В.Г., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией эндокринологии и заместитель директора по научной работе, ФГБНУ «НИИ экспериментальной и клинической медицины», г. Новосибирск;

Гуляева Л.Ф., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза, ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск.