

РАЗДЕЛ I. БИОЛОГИЯ

УДК 57.054

Арешидзе Д.А, Тимченко Л.Д**, Снисаренко Т.А*, Козлова М.А*.*

**Московский государственного областного университета*

***Ставропольский государственный университет*

ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ, АПОПТИЧЕСКОЙ И НЕКРОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ

D. Areshidze, L. Timchenko**, T. Snisarenko*, M. Kozlova**

**Moscow State Regional University*

***Stavropol State University*

CHARACTERISTICS OF PROLIFERATIVE, APOPTOTIC AND NECROTIC ACTIVITY IN THE LIVER OF RATS OF DIFFERENT AGE DURING REGENERATION

Аннотация. Проведенное исследование показало, что уровень регенеративных способностей печени, определяемый интенсивностью и соотношением митоза, апоптоза и некроза, оказывается более высоким у крыс в возрасте 9 и 18 месяцев по сравнению с животными в возрасте 11 месяцев как при экспериментально патологическом воздействии, так и при биостимуляции. Печень животных в возрасте 9 и 18 месяцев характеризуется близкими величинами исследованных параметров. Это является доказательством большей подверженности организма животных действию патологических и стимуляторных факторов в разные периоды онтогенеза.

Ключевые слова: печень, апоптоз, некроз, пролиферация, гепатоцит, регенерация.

Abstract. The research has shown that the level of regenerative ability of the liver, determined by the intensity and the ratio of mitosis, apoptosis and necrosis, is higher in rats aged 9 and 18 months compared with animals aged 11 months both under pathological experimental conditions and during biostimulation. The liver of animals at the age of 9 and 18 months is characterized by close values of the parameters studied. This is a sufficient demonstration of greater exposure of animals to the action of pathological and stimulatory factors in different periods of ontogenesis.

Key words: liver, apoptosis, necrosis, proliferation, hepatocyte, regeneration.

Развитие организма и его отдельных частей в онтогенезе, нормальное функционирование и поддержание тканевого гомеостаза, патологические изменения – все эти процессы протекают на тканевом уровне за счет двух основных механизмов – пролиферации и апоптоза [15; 20]. Собственно тканевая организация систем предусматривает возможность структурного обновления, адаптационной перестройки и репарации в случае повреждения. Соотношение

митотической и апоптической активности в ткани определяет её регенераторные способности, т. е. по сути определяет её адаптационный потенциал. Благодаря физиологической регенерации поддерживается структурный гомеостаз и обеспечивается возможность постоянного выполнения органами их функций. Репаративная регенерация является реакцией организма, которая вовлекается в течение патологического процесса почти одновременно с началом действия патогенного фактора и сосуществует с дистрофическими и некротическими изменениями в качестве «противовеса» на всем протяжении болезни. Однако успешность протекания регенерации любого типа, иными словами, успешность поддержания тканевого гомеостаза зависит от пролиферативной активности [15]. Регенерационная способность может изменяться на различных этапах онтогенеза не только в степени своего проявления, но и в характере или форме, что зависит от изменений интенсивности пролиферативной и апоптической активности в разные периоды онтогенеза [4; 11]. Компенсаторно-приспособительные процессы в органах обеспечиваются на основе увеличения количества функционирующих структур – пролиферации. Пролиферация как клеток, так и неклеточных структур является частым процессом, наблюдаемым при функционировании клеток как в норме, так и при патологии [15].

Печень – своеобразная «лаборатория», где осуществляется сложнейший синтез ряда жизненно важных веществ. Несмотря на слабую физиологическую регенерацию, печень обладает очень высокой потенцией к репаративной регенерации. Функционирование печени в норме и при патологии определяется сложным взаимодействием гетерогенных субпопуляций клеток, формирующих печень. Они включают в себя клетки печени (гепатоциты), эндотелиальные клетки сосудов, макрофаги-резиденты (клетки Купфера), клетки желчных каналов и тучные клетки (клетки Ито). Печень представляет собой центральный орган химического гомеостаза организма, где создается единый обменный и энерге-

тический пул для метаболизма белков, жиров и углеводов. Кроме того, она является не только «фабрикой», но и «складом», депо, где накапливаются многие вещества, необходимые для поддержания жизненных функций организма. Печень, участвуя в большинстве физиологических и патологических процессов в организме, пропускает через себя огромное количество крови. В эмбриональном периоде является органом кроветворения. Столь многочисленные и важные функции печени определяют ее значение для организма как жизненно необходимого органа. Поэтому особую важность имеет морфофункциональная полноценность и высокая регенерационная способность печени, испытывающей в современных условиях на протяжении постнатального онтогенеза значительные перегрузки [8; 13; 14]. Сведения, полученные о нарушении гепатобилиарной системы у крыс, важны, поскольку данное животное является очень удобной биологической моделью для изучения многочисленных показателей, в том числе и при изучении морфофункциональных показателей печени [1; 3; 5].

На клеточном уровне восстановление клеток печени при повреждении происходит как за счет пополнения количества клеток (путем их митотического деления), так и за счет гипертрофии, последние клеточные преобразования сопровождаются сложнейшими биохимическими изменениями, направленными как на подготовку клеток к делению, так и на восстановление функции печени. При повреждении печени гистологические изменения, прежде всего, обнаруживаются в клетках паренхимы. В течение нескольких часов клетки теряют запасы гликогена и накапливают липидные капли. Затем в клетках выявляются характерные признаки активации к развитию – увеличиваются размеры ядер и ядрышек, в цитоплазме появляются рибосомы и полирибосомы. Один из наиболее ярко выраженных признаков клеток регенерирующей печени – это высокая степень их полиплоидии. Даже в нормальном развитии полиплоидия этих клеток является скорее правилом, чем исключением. Регенерация стимулирует процесс по-

липлоидизации, что выражается в появлении в печени возрастающего числа клеток с более высоким значением плоидности

В настоящее время также получены доказательства того, что апоптоз – очень частое проявление патологически измененной печени. Считается, что апоптоз, являясь одним из важнейших механизмов развития, в норме имеет значение в процессе физиологического обновления гепатоцитов. Одним из критериев интенсивности гибели клеток в органе являются некроз. Считается, что некроз часто сопровождает апоптоз на завершающих его стадиях. Интересно, что зоны некроза могут быть окружены зонами апоптоза, и это позволяет считать, что речь идет об ассоциированном феномене [2; 4; 6; 7; 12; 13]. Таким образом, регенерация печени – это комплекс жестко регулируемых физиологических процессов правильной пролиферации гепатоцитов, непаренхиматозных клеток и восстановления нарушенной функции органа после его повреждения.

Для определения эффективности воздействия биологически активных веществ на особенности пролиферативной, апоптической и некротической активности в печени крыс разного возраста при регенерации печени нами было проведено исследование влияния четыреххлористого углерода на орган в различные периоды онтогенеза, а также при коррекции повреждения печени ферментативным гидролизатом Хлорофитума хохлатого. Показаны гепатопротективные свойства ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого, что позволяет продолжать целенаправленное изучение влияния гидролизата на регенераторный потенциал печени млекопитающих. Однако проведенные эксперименты на животных разных возрастных групп показали неоднозначные результаты [1; 10; 11]. В эксперименте было использовано 150 белых крыс линии Вистар. В соответствии с задачами исследования нами было сформировано 3 экспериментальных возрастных группы, в состав которых входили крысы в возрасте 9, 11 и 18 месяцев. Каждая возрастная группа была разделена на 2 подгруппы:

– животные, ингалируемые четыреххлористым углеродом по 2 мин. в сутки в течение 6 дней;

– животные, ингалируемые четыреххлористым углеродом по 2 мин. в сутки в течение 6 дней, но одновременно получавших с питьем ферментативный гидролизат Хлорофитума хохлатого в дозе 0,6 мг на 100 г массы тела.

Выбор четыреххлористого углерода (CCl_4) в качестве агента, действующего на печень, объясняется тем фактом, что это вещество является прямым печеночным ядом, широко используемым в экспериментальной медицине и биологии [13]. Выбор продолжительности токсического и гепатопротективного воздействия определяется тем, что применение четыреххлористого углерода по данной схеме обеспечивает возникновение и развитие обратимых изменений в печени на тканевом и органном уровне [8]. Разделение каждой возрастной группы на 2 подгруппы позволяло исследовать как зависимость эффекта токсического действия четыреххлористого углерода от возраста подопытных животных, так и зависимость эффекта применения ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого от того же фактора.

Для определения характера и интенсивности регенерационных процессов в печени крыс проведено гистологическое исследование по общепринятой технологии с окраской гематоксилин-эозином и суданом-III [16]. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили общую структурную оценку ткани.

Некротический индекс вычисляли по формуле [21]:

$$НИ = N_n / N \times 1000,$$

где N_n – количество некротических клеток; N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

Все исследованные органы отбирались после усыпления животных под эфирным наркозом. После фиксации материала 10% нейтральным забуференным формалином

для части органов проводилась проводка по общепринятой методике с последующей заливкой в парафин. При проведении исследований органов, залитых в парафин, готовились серийные срезы толщиной 5-6 мкм. Проводилось патоморфологическое исследование органа. Окраска гематоксилин-эозином осуществлялась по общепринятой методике. Окрашенные срезы заключали в бальзам. Для выявления апоптических клеток полутонкие срезы окрашивались метиленовым синим-азуром II с докраской фуксином [12].

Апоптический индекс вычисляли по формуле [19]:

$$AI = N_a / N \times 1000,$$

где N_a – количество апоптических клеток; N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

Митотический индекс определяли по формуле [19; 20]:

$$MI = N_m / N \times 1000,$$

где N_m – число митозов; N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

При патоморфологическом исследовании печени крыс, подвергшихся воздействию четыреххлористого углерода в возрастах 9 и 18 месяцев, нами была обнаружена сходная картина. Печень животных в этих возрастах имела красный цвет, иногда с желтоватым или серым оттенком. У 20% крыс в возрасте 9 месяцев и у 15% 18-месячных крыс печень была пятнистой. Орган рыхлый, легко рвется, на разрезе сочится кровь. При гистологическом исследовании у крыс обоих возрастов отмечается четко выраженная дисконплексаия печеночных балок. Гепатоциты набухшие, цитоплазма их мутная, границы клеток не четкие, ядра также набухшие, светлые, со смазанными контурами. В гепатоцитах отчетливо наблюдаются прозрачные вакуоли. В 65% случаев в 9 месяцев и 80% случаев в 18 месяцев в вакуолях гепатоцитов выявляются липиды. В печени крыс обеих возрастных подгрупп отдельные гепатоциты – в

состоянии зернистой дистрофии. При этом в 9 месяцев преобладает центрлобулярная дистрофия, а в 18 месяцев – перилобулярная дистрофия. Сосуды печени в различных участках среза неравномерно расширены и кровенаполнены, в области триад и периваскулярно – признаки слабой мезенхимальной реакции. Обнаруженные изменения свидетельствуют о развитии у животных обеих возрастных подгрупп типичной токсической дистрофии печени. Однако у некоторых крыс в возрасте 18 месяцев установленная микрокартина характерна для развития очагового альтеративного воспаления.

Картина изменений в результате действия четыреххлористого углерода в печени крыс в возрасте 11 месяцев существенно отличается от таковой в других возрастных подгруппах. Цвет органа у этих животных различен: печень охряно-красная, светло-коричневая с множественными кровоизлияниями, у 30% животных светло-серые участки чередуются с темно-красными. По структуре печень в большинстве случаев рыхлая, в отдельных случаях с уплотненными участками. У большинства крыс на разрезе печень сухая, кровь не выступает, в ряде случаев кровь на разрезе выступает умеренно. При микроскопическом исследовании у животных в возрасте 11 месяцев отмечено нарушение структуры печеночной паренхимы, дольчатое строение паренхимы не сохранено. Отмечаются соединительнотканые прослойки. Среди клеток большое количество лейкоцитов, макрофагов. В гепатоцитах большое количество вакуолей, в том числе липидных. Отдельные клетки очень крупные и фактически представляют собой сплошную вакуоль. В 70% случаев обнаружены множественные очаги некрозов разных размеров, в которых структурные элементы отдельных клеток не визуализируются, а ткань печени представляет собой гомогенную бесструктурную массу. В 30% случаев отмечаются обширные некрозы. Кровеносные сосуды (центральные вены, капилляры) в печени этих животных расширены (гиперемия кровеносных сосудов), проницаемость стенок для клеток крови повы-

шена, отмечаются очаговые кровоизлияния. В целом, у подавляющего большинства крыс отмечена картина острого токсического гепатита с достаточно высокой интенсивностью повреждения тканей (альтеративный гепатит). У части животных определяется гепатоз с выраженным некротическим компонентом.

Применение гидролизата Хлорофитума хохлатого при одновременной ингаляции CCl_4 у животных в возрасте 9 и 18 месяцев приводит к тому, что патологические изменения в печени носят значительно меньшую выраженность. Так, в печени всех животных прослеживается балочное и дольчатое строение. При этом немногочисленные очаги дистрофии чередуются с участками, представленными неповрежденными и двуядерными гепатоцитами (признаки регенерации) или гепатоцитами в состоянии начального этапа зернистой дистрофии. Жировая дистрофия встречается в 15% и 20% случаев в 9 и 18 месяцев соответственно. Так же существенно меньше гепатоцитов в состоянии некрозов. Отмечено отсутствие очаговых кровоизлияний, межбалочные капилляры умеренно гиперемированы, отсутствуют и признаки отека. Сосуды в области триад умеренно расширены. При этом в 28% гепатоцитов в обеих возрастных группах отмечены мелкие вакуоли. В печени крыс в возрасте 11 месяцев применение ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого также приводит к улучшению морфологического состояния органа, но при этом тенденция к улучшению выражена в меньшей степени, что проявляется в большем, чем в других возрастных подгруппах, количестве некротизированных клеток, количестве очагов некрозов, гепатоцитов в состоянии жировой и зернистой дистрофии.

Исследование митотической, некротической и апоптической активности печени крыс с модельным токсическим повреждением показало, что печень животных в возрасте 9 и 18 месяцев характеризуются сходными параметрами. Так, величина МИ составила $2,4 \pm 0,041\%$ и $2,6 \pm 0,04\%$ соответственно, АИ – $6,2 \pm 0,2\%$ и $5,7 \pm 0,4\%$, НИ – $4,0 \pm 0,01\%$ и $5,1 \pm 0,2\%$ соответственно в 9 и 18 меся-

цев. Параметры, состояние печени крыс в возрасте 11 месяцев отличаются от таковых двух других возрастных групп. МИ составляет $0,8 \pm 0,04\%$, а АИ – $2,3 \pm 0,2\%$, НИ – $15,1 \pm 0,041\%$. Применение ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого при экспериментальном токсическом повреждении печени приводит к тому, что исследованные показатели печени животных в возрасте 9 и 18 месяцев фактически возвращаются к возрастным нормам. Так, в возрасте 9 месяцев МИ составляет $9,75 \pm 0,5\%$, АИ – $0,7 \pm 0,2\%$, НИ – $2,1 \pm 0,2\%$. Печень крыс в возрасте 18 месяцев характеризовалась величиной МИ – $6,0 \pm 0,4\%$, АИ – $1,5 \pm 0,4\%$, НИ – $1,9 \pm 0,2\%$. Печень одиннадцатимесячных крыс характеризовалась величиной МИ, равной $2,4 \pm 0,041\%$, АИ – $6,2 \pm 0,2\%$, НИ – $7,5 \pm 0,22\%$.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что, несмотря на одинаковую дозу применяемого патогена, тяжесть патологических изменений в органе, а также характер изменений энергоинформационных параметров печени крыс в возрасте 11 месяцев носит более тяжелый характер, чем в 9 и 18 месяцев. На основании вышесказанного можно утверждать, что тяжесть поражения печени токсином находится в зависимости от возраста животных. В то же время применение ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого эффективно во всех рассмотренных возрастных периодах, но протективный эффект значительно выше в возрасте 9 и 18 месяцев, а в возрасте 11 месяцев имеющийся гепатопротективный эффект ниже и не столь выражен. Это свидетельствует о наличии зависимости эффективности применения биостимулятора от периода онтогенеза и целесообразности проведения биостимуляции именно в чувствительные для нее этапы развития. Различная эффективность патологического воздействия четыреххлористого углерода и гепатопротектора в разные возрастные периоды является подтверждением того, что периоды онтогенеза, в которые происходит изменение направленности энергоинформационных параметров, являются критическими, и в эти возрастные

этапы происходит изменение регенераторно-адаптационного потенциала органов, определяемое интенсивностью исследованных процессов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Арешидзе Д.А. Влияние ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого на морфофункциональную целостность печени при токсическом поражении у крыс в возрасте трёх месяцев / Д.А. Арешидзе, Козлова М.А., Снисаренко Т.А., Мутыгуллина Ю.Р. // Вестник МГОУ. – М., 2009. – № 4. – С. 80-84.
2. Астауров Б.Л. Методы биологии развития / Б.Л. Астауров. – М.: Медицина, 1974. – 590 с.
3. Балаж А. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации / А. Балаж, И. Блажек. – М.: Мир, 1982. – 320 с.
4. Борисов И.Н. Филогенетические основы тканевой организации животных / И.Н. Борисов, П.В. Дунаев, А.Н. Бажанов. – Новосибирск: Наука, 1986. – 237 с.
5. Бродский В.Я. Клеточная полиплоидия, пролиферация и дифференцировка / В.Я. Бродский, И.В. Урываева. – М.: Наука, 1989. – 259 с.
6. Данилов Р.К. Гистогенез и регенерация тканей / Р.К. Данилов, Б.А. Григорян // Морфология. – 1996. – № 1. – С. 110-111.
7. Жижина Г.П. Роль апоптоза в нормальном онтогенезе, патогенезе и старении / Г.П. Жижина // Клиническая геронтология. – 2002. – Т. 8. – № 4. – С. 4-10.
8. Калинская Н.С. Особенности физиологической и репаративной регенерации печени крыс в репродуктивном периоде онтогенеза под влиянием биопрепаратов на основе Каллизии душистой. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Н.С. Калинская. – Ставрополь, 2009. – 22 с.
9. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей / А.А. Клишов. – Л.: Медицина, 1984. – 232 с.
10. Козлова М.А. Влияние ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого на печень крыс при токсическом повреждении / М.А. Козлова, Д.А. Арешидзе, Ю.Р. Мутыгуллина, Т.А. Снисаренко // Вестник Московского государственного областного университета. – 2009. – № 3. – С. 37-41.
11. Козлова М.А. Морфофункциональная характеристика печени трёхмесячных крыс при экспериментальном токсическом повреждении печени и его коррекции ферментативным гидролизатом Хлорофитума хохлатого / М.А. Козлова // Вестник Московского государственного областного университета. – 2010. – № 2. – С. 69-74.
12. Лушников Е.Ф. Гибель клетки / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов. – М.: Медицина, 2001. – 160 с.
13. Подымова С.Д. Болезни печени. Руководство для врачей / С.Д. Подымова. – М.: Медицина, 1993. – 544 с.
14. Полежаев Л.В. Утрата и восстановление регенерационной способности у животных / Л.В. Полежаева. – М.: Наука, 1986. – 248 с.
15. Саркисов Д.С. Очерки по структурным основам гомеостаза / Д.С. Саркисов. – М.: Медицина, 1977. – 348 с.
16. Сулейманов С.М. Методы морфологических исследований (методическое пособие) / С.М. Сулейманов, П.А. Паршин, Ю.П. Жарова. – Воронеж, 2000. – 64 с.
17. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке патогенетического статуса человека / Л.П. Сычева // Медицинская генетика. – 2007. – Т. 6. – № 11. – С. 3-11.
18. Фильченков А.А. Апоптоз и рак / А.А. Фильченков, Р.С. Стойка. – Киев: МОРИОН, 1999. – 182 с.
19. Duffield J.S. Suppression by apoptotic cells defines tumor necrosis factor-mediated induction of glomerular mesangial cell apoptosis by activated macrophages / J.S. Duffield, C.F. Ware, B. Ryffel, J. Savill // Am. J. Pathol. – 2001–Vol. 159. – P. 1397-1404.