

БИОЛОГИЯ

УДК 612.35.014.43.085.2

Н.В. Репин

СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ГЕТЕРОТЕРМА *CITELLUS UNDULATUS* В РАЗЛИЧНЫХ ФАЗАХ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Данная работа является фрагментом плановой НИР по теме «Дослідити структурно-метаболический і функціональний стан клітин фетоплацентарного комплексу після криоконсервування і гіпотермічного зберігання» 0106U002170.

Вступление. Выработанная организмами гетеротермных животных способность повышать свою резистентность к действию пониженной температуры не за счет интенсификации метаболизма, а наоборот, путем значительного его снижения, закрепились генетически [3, 4].

Детальное изучение особенностей функционирования систем зимоспящего организма, находящегося в различных физиологических состояниях, необходимо для выяснения закономерности развития адаптивных процессов при холодом воздействии.

Цель исследования. В настоящей работе проведен сравнительный анализ морфофункционального состояния клеток печени гетеротермов при различных физиологических состояниях животного.

Объект и методы исследования. Объект исследования гепатоциты в составе фрагментов печени, взятые сразу после декапитации длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*), в активном (АС), гибернарующем (ГС) и пробуждающемся (ПС) состояниях. Электронно-микроскопические (ЭМ) исследования проводили, как изложено в [1]. Ультраструктуру клеток печени исследовали с помощью ЭМ ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ, снабженного системой съема и анализа изображения САИ - 01А (АО "SELMI", г. Сумы) на основе ССД камеры DX-2 и пакета программ фирмы «КАРРА», Германия.

Результаты исследований и их обсуждение. По данным оптической микроскопии паренхима печени гибернарующего животного слегка обезвожена, что проявляется в ее уплотнении. Она содержит относительно однородные уплотненные темные, так называемые «спокойные» гепатоциты с гиперхромными ядрами. Клетки содержат значительное количество гликогена и следы нейтральных жиров. Функционально активными являются стромальные элементы орга-

на, однако разрастаний соединительной ткани в печени не наблюдается, ее небольшие прослойки встречаются только в зоне триад. Структура печени животных в состоянии гибернации представлена полигональными гепатоцитами, с крупнодисперсной цитоплазмой и, преимущественно, округлыми, уплотненными ядрами. Показательным морфологическим ориентиром для данного состояния животного является наличие большого количества гепатоцитов в различных стадиях жирового перерождения, располагающихся диффузно в паренхиме или группами, преимущественно в зонах триад, в отличие от печени активного животного.

Данные электронно-микроскопического исследования показали, что в состоянии гибернации в гепатоцитах наблюдаются выраженные структурные изменения-перестройки, затрагивающие как ядро, так и цитоплазму, что позволило выявить ряд отличий ультраструктуры клеток АС от клеток животного, находящегося в АС и ПС. Отмеченные особенности заключались в возрастании объемной доли гетерохроматина ядра, жировых включений и гликогена, уменьшении среднего размера митохондрий при соответствующем достоверном увеличении их количества, появлении большего числа лизосомоподобных структур, частичной деструкции сетчатого аппарата.

Нами проведена оценка геометрических параметров (площадь, периметр, максимальный и минимальный размеры, а также отношение площади к периметру) внутриклеточных оргanelл гепатоцитов для трех состояний животного. Представленные на рис.1 гистограммы анализа компонентов ультраструктуры гепатоцитов достаточно хорошо коррелируют с наблюдаемыми качественными различиями в ультраструктуре гепатоцитов. В частности, увеличение в клетке доли конденсированного хроматина и повышение плотности кариоплазмы, свидетельствующие о снижении активности ядерного аппарата [2], являются характерным проявлением реакции клеток на различные экстремальные воздействия. Сохранение размеров областей гетерохроматина ядра и через 0,5-1 час после пробуждения на том

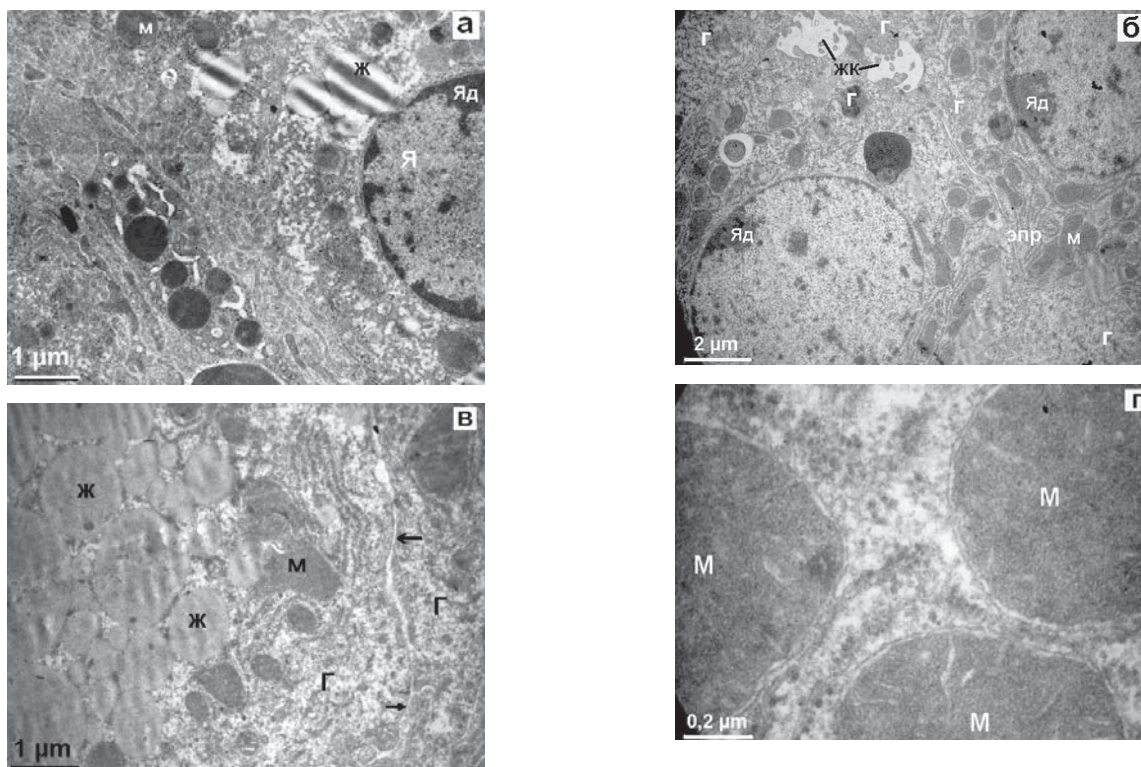


Рис. 1. Ультраструктура гепатоцита фрагмента печени суслика в активном (а) и гибернирующем (б) состоянии. Обширное скопление жировых включений (ж) в периферической части гепатоцита (в) и состояние митохондрий печени суслика в спящем состоянии. Обозначения: Г – гепатоцит, М – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Яд – ядрышко.

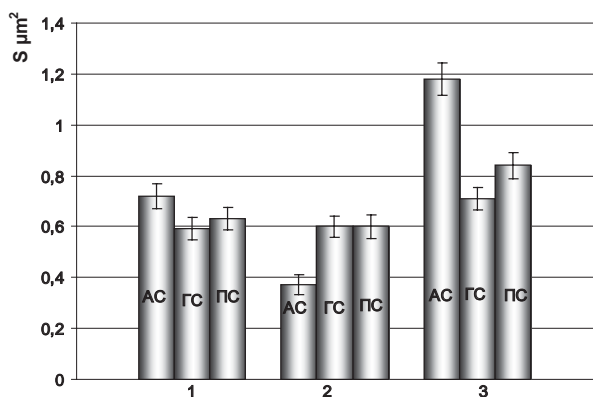


Рис. 2. Исходные значения средней площади митохондрий (1), областей гетерохроматина ядра (2) и ЭПР (3) для трех (АС, ГС и ПС) состояний суслика.

же уровне, что и у животного в спящем состоянии (рис.2), свидетельствует о меньшей востребованности процессов, происходящих в ядре, нежели в цитоплазме при пробуждении и на первых этапах бодрствования.

Мы проанализировали состояние окислительно-восстановительных ферментов в клетках печени зимоспящих сусликов при их различных физиологических состояниях. Исследованные животные были разделены на четыре группы: активные, впадающие в спячку, спящие и просыпающиеся. Так как группы впадающих в спячку и просыпающихся животных, с меньшей вероятностью могут быть названы представительными, сравнение активности ферментов в клетках печени и почек были проведены только между группами активных и спящих сусликов (табл.).

Таблица

Активность окислительно-восстановительных ферментов в усл. опт. ед. в клетках печени зимних сусликов

Ферменты	Активные животные	Впадающие в спячку животные	Спящие животные	Просыпающиеся животные
СДГ	89,3±1,03	37,1±1,48	74,3±1,37*	66,5±1,54
ЛДГ	116,3±2,15	195,5±2,23	110,4±1,65	99,9±1,89
α-ГФДГ	82,0±1,98	54,0±1,79	60,1±1,91*	91,1±2,22
НАД	55,2±1,44	61,6±2,78	60,2±1,90	54,5±1,83
НАДФ	54,7±0,90	59,6±2,42	81,5±1,48*	60,9±1,74

Примечание: * – достоверное (p < 0,05) отличие по сравнению с активным состоянием.

В таблице представлена активность всех исследованных нами ферментов в клетках печени и почки, выраженная в условных оптических единицах, для 4-х групп животных.

В клетках печени отложения диформаза имела типичный мелкокристаллический характер, с равномерным распределением в цитоплазме клеток. Ни в одном из исследованных состояний животного мы не наблюдали изменение характера зерен, их агрегации, что дало возможность провести цитофотометрическое исследование. Анализ полученных данных и сравнительная оценка результатов исследований свидетельствуют о выраженной динамике в состоянии окислительно-восстановительных ферментов. Среднее значение удельной концентрации диформаза при проведении гистохимической реакции на СДГ в печени активных сусликов составляло $89,3 \pm 1,03$ усл. опт. ед., а в клетках печени спящих сусликов было $74,3 \pm 1,37$ усл. опт. ед., что свидетельствует о достоверном снижении активности СДГ. Удельная концентрация диформаза в реакции на ЛДГ в клетках печени активных сусликов составляла $116,3 \pm 2,15$ усл.опт.ед., а в гепатоцитах спящих животных – $110,4 \pm 1,65$ усл. опт.ед., что также свидетельствует о достоверном снижении активности этого фермента.

Удельная концентрация диформаза в реакции на другой гликолитический фермент – α -ГФДГ в клетках печени активных сусликов составляла $82,0 \pm 1,98$ усл. опт. ед., у спящих сусликов – $60,1 \pm 1,91$ усл. опт.ед., что свидетельствует о достоверном снижении активности α -ГФДГ в печени спящих животных.

Активность коферментов НАД- и НАДФ-дегидрогеназ в клетках печени спящих животных достоверно выше, чем в группе активных сусликов, о чем свидетельствуют значения удельной концентрации диформаза: у активных сусликов НАД-ДГ – $55,2 \pm 1,44$ усл.опт.ед., НАДФ-ДГ – $54,7 \pm 0,90$ усл.опт.ед.; для спящих животных – НАД-ДГ – $60,2 \pm 1,9$ усл. опт. ед., НАДФ-ДГ – $81,5 \pm 1,48$ усл.опт.ед.

Обнаруженные изменения активности ферментов в репрезентативных группах (активные и спящие суслики) свидетельствуют о выраженных структурно-функциональных изменениях в печени. Частично это может быть связано, как отмечалось ранее, со снижением влагосодержания тканей, что представляет собой один из механизмов обратимого перехода организмов из гипобии в активное состояние.

УДК 612.35.014.43.085.2

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ГЕТЕРОТЕРМА *Citellus undulatus* В РАЗЛИЧНЫХ ФАЗАХ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Репин Н. В.

Резюме. Проведено гистохимическое и ультраструктурное исследования клеток печени *Citellus undulatus* в различных фазах зимней спячки. Данные гистохимического исследования активности ряда окислительно-восстановительных ферментов соотносятся с ультраструктурными особенностями гепатоцитов гибернирующих животных.

Ключевые слова: гепатоциты, окислительно-восстановительные ферменты, ультраструктура.

Представленные в настоящем разделе результаты не в полной мере согласуются с данными других авторов [4], которые указывают на 20-кратное снижение интенсивности метаболизма у зимоспящих в зимний период, а также на 3-кратное уменьшение лактата в клетках мозга и 7-кратное в печени. Гистохимическое изучение, проведенное нами, показало отсутствие столь резких различий при сохранении выраженной тенденции к снижению, а по отношению к кофакторам можно отметить даже достоверное увеличение их активности.

Выводы. Данные гистохимического исследования активности ряда окислительно-восстановительных ферментов находится в хорошем соответствии с отмеченными выше ультраструктурными особенностями гепатоцитов гибернирующих животных.

Для ультраструктуры гепатоцитов спящего животного характерно возрастание объемной доли гетерохроматина ядра, жировых включений и гликогена, уменьшение среднего размера митохондрий при соответствующем достоверном увеличении их количества, появление большего числа лизосомоподобных структур и частичная деструкция сетчатого аппарата.

Перспективы дальнейших исследований. Результаты исследования морфо-функционального состояния печени гетеротермов могут быть использованы для совершенствования режимов гипотермического хранения печени гомойотермных организмов.

Выражаю благодарность ст.н.с. Е.П. Жуликовой и ст.н.с. А. П. Белоножке за помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Репин Н.В. Морфологические и биохимические признаки повреждения печени при гипотермическом хранении в сахарозо-содержащем растворе / Н.В. Репин, Е.Н. Ткачева, О.А. Семенченко [и др.] // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2006. – № 3. – С. 51-56
2. Филюшина Е. Е. Сезонные особенности ультраструктурной организации печени гибернантов и активных зимой животных / Е. Е. Филюшина, Л. В. Адодина // Механизмы природных гипометаболических состояний.- Сб. науч. тр.- Пушино. - 1991. - С. 58-66.
3. Эмирбеков Э. З. Биохимические изменения в крови при искусственной и естественной гипотермии / Э. З. Эмирбеков, С. П. Львова, Н.К. Кличханов// – Проблемы криобиологии.- 1995. – №1.- С. 14-21.
4. Green C. Mammalian hibernation: Lessons for organ preparation? / C. Green // Cryo Letters. -2000.- V. 21, № 2.- P. 91-98.

УДК 612.35.014.43.085.2

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ГЕТЕРОТЕРМА *Citellus undulatus* У РІЗНИХ ФАЗАХ ЗИМОВОЇ СПЛЯЧКИ

Рєпін М. В.

Резюме. Проведені гістохімічне і ультраструктурні дослідження клітин печінки *Citellus undulatus* у різних фазах зимової сплячки. Данні гістохімічного дослідження активності ряду окислювально-відновних ферментів узгоджуються з ультраструктурними особливостями гепатоцитів гібернуючих тварин.

Ключові слова: гепатоцити, окислювально-відновні ферменти, ультраструктура.

UDC 612.35.014.43.085.2

STRUCTURE and FUNCTION of LIVER from *Citellus undulatus* HETEROTHERM and DIFFERENT PHASES of WINTER HIBERNATION

Repin N. V.

Summary. Histochemical and ultrastructural studies of heterotherm *Citellus undulatus* liver under different phases of winter hibernation were carried-out. Data of histochemical study of some redox enzymes' activity are in concordance with ultrastructural peculiarities of hibernating animals' hepatocytes.

Key words: hepatocytes, redox enzymes, ultrastructure.

Стаття надійшла 10.02.2011 р.