

© Коллектив авторов, 2017
УДК 611.36.018.019:599.323.4

С.П.Мозолева, А.П.Надеев, С.В.Позднякова, С.В.Залавина

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПЕЧЕНИ И ЗВЕЗДЧАТЫХ МАКРОФАГОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИЙ СВА И С57В1/6

Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. А.П.Надеев), ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ

С использованием электронно-микроскопического и морфометрического методов изучены морфологические особенности печени и ультраструктуры звездчатых макрофагов (клеток Купфера) у новорожденных мышей (n=20) двух оппозитных линий — СВА и С57В1/6 в условиях физиологической нормы. Структурная организация печени и звездчатых макрофагов генетически обусловлена. У мышей линии С57В1/6, по сравнению с мышами линии СВА, отмечены более высокие уровни физиологической регенерации печени. Межлинейные различия выявлены и в ультраструктурной организации звездчатых макрофагов. Так, у мышей С57В1/6 в этих клетках имелись более развитая сеть цистерн гранулярной эндоплазматической сети и большее число прикрепленных к ним рибосом, что отражает их более высокую синтетическую активность. Содержание первичных лизосом также выше в звездчатых макрофагах у животных этой линии.

Ключевые слова: новорожденные мыши линий СВА и С57В1/6, печень, звездчатые макрофаги, электронная микроскопия

Звездчатые макрофаги (ЗМ) (клетки Купфера) играют ключевую роль в процессах формирования различных (острых и хронических) патологических изменений в печени, воспалительной реакции при развитии бактериальной, вирусной инфекции, а также при повреждении этого органа ксенобиотиками, радиацией и при стрессе [6, 10–12, 15]. При этом как активированные, так и супрессированные ЗМ взаимодействуют с гепатоцитами и другими клетками печени [10], секретируя различные биологически активные вещества [9]. Медиаторы ЗМ способны влиять на гепатоциты противоположным образом: они могут повреждать гепатоциты и даже вызывать их гибель или же защищать эти клетки от повреждения [9], стимулировать их пролиферацию, уменьшать апоптоз эндотелиальных клеток синусоидов [10], интенсивность фиброобразования [13, 14].

Важным вопросом в медицинских и биологических исследованиях является генетическая детерминация проявлений индивидуальной чувствительности особей к экстремальным факторам и особенностей реагирования их систем и органов. Для этих целей проводят исследования на генетически однородных животных разных линий. В частности, мыши линий СВА и С57В1/6 являются противоположными по целому ряду биологических параметров их органов и регуляторных систем [4–8].

Больше внимание уделяется патологии перинатального периода, поскольку спектр и степень влияния материнских и перинатальных факторов впоследствии определяют особенности формирования постнатальной заболеваемости и развития инвалидизирующей патологии [4]. В этой связи исходное морфофункциональное состояние печени плода и новорожденного может повлиять в последующие периоды жизни на особенности реагирования печени (компенсаторные реакции, масштабы деструктивных изменений, воспалительные проявления) как защитного органа, что отражается на состоянии организма в целом.

Однако морфофункциональное состояние ЗМ в перинатальный период развития с учетом их ключевой роли в поддержании гомеостаза печени, в патогенезе развития заболеваний в этом органе, а также значимость этих клеток в обеспечении индивидуальных особенностей организма недостаточно исследованы. Поэтому цель настоящего исследования — сравнительное изучение морфологических особенностей печени и ультраструктуры ЗМ у новорожденных мышей двух оппозитных линий в условиях физиологической нормы.

Материал и методы. Исследования проведены на 20 новорожденных мышках оппозитных линий СВА и С57В1/6. Животные-производители были получены из лаборатории разведения экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Взрослых животных содержали в пластмассовых клетках (по 5 мышей — 1 самец и 4 самки) в стандартных условиях

Сведения об авторах:

Мозолева Софья Павловна (e-mail: mozzes83@gmail.com), *Надеев Александр Петрович* (e-mail: nadeevngma@mail.ru),

Позднякова Светлана Васильевна (e-mail: svetpоздняkova@yandex.ru), *Залавина Светлана Васильевна* (e-mail: zalavinasv@mail.ru),

кафедра патологической анатомии, Новосибирский государственный медицинский университет, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

вивария при естественном освещении на гранулированном комбикорме «ПК 120-3» (Лабораторснаб, Россия) и воде *ad libitum*. Все манипуляции с лабораторными животными проводили, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Страсбург, 1986), принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС), «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р53434–2009 от 01.03. 2010 г. идентичен GLPOECD). Новорожденных мышей (1-е сутки жизни) декапитировали под эфирным наркозом.

Для светооптического исследования образцы печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в этаноле возрастающей концентрации с последующей заливкой в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, по Ван-Гизону, аргирофильные волокна выявляли путем импрегнации нитратом серебра по Гордону—Свиту [2] и исследовали под световым микроскопом Axioscopstar plus (Zeiss, Германия), изображения были получены при помощи цифровой видеокамеры Axiosam ICs 3 (Zeiss, Германия).

В 10–15 полях зрения каждого препарата от 10 мышей в каждой группе, используя окулярные морфометрические сетки, состоящие из 25 и 289 тестовых точек [1], определяли объемную плотность (V_v) очагов экстремедуллярного кроветворения, аргирофильных волокон, гибнущих гепатоцитов, двуядерных гепатоцитов и гепатоцитов с вакуолизированной цитоплазмой; численную плотность (N_a) двуядерных гепатоцитов, гепатоцитов в состоянии митоза, мегакариоцитов.

Для электронно-микроскопического исследования образцы печени объемом 1 мм³ в количестве 7–8 от одного животного, фиксировали в 1% водном растворе тетраоксида осмия при температуре 4 °С, обезживали в этаноле возрастающей концентрации, заключали в эпоксидные смолы с использованием компонентов из набора SPI-PON 812 KIT (SIGMA chemical company, Швеция). Срезы толщиной 1 мкм окрашивали (при нагревании) 1% раствором метиленового голубого в 1% растворе тетрабората натрия. Ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм, изготовленные на ультрамикротоме (ЛКВ, Швеция) последовательно контрастировали в растворах ацетата уранила и цитрата свинца по Reynolds [3]. Электронно-микроскопическое исследование звездчатых макрофагов проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100/ASID/SEGZ (Jeol, Япония) при конечном увеличении 56 000 раз.

Исследование ультраструктур ЗМ осуществляли по негативным изображениям их срезов, спроецированных на многоцелевую квадратную открытую тестовую систему.

На электронно-микроскопических фотографиях ЗМ определяли объемную плотность (V_v) цитоплазмы, первичных и вторичных лизосом, митохондрий, гранулярной эндоплазматической сети (ГЭПС); поверхностную плотность (S_v) мембран митохондрий, ГЭПС, для оценки плотности внутренних мембран митохондрий и ГЭПС рассчитывали соотношение показателей S_v/V_v митохондрий и ГЭПС; численную плотность (N_a) первичных и вторичных лизосом, митохондрий.

Статистическую обработку данных морфометрического исследования проводили с использованием лицензированного пакета программ Microsoft Excel с определением средней величины и ее стандартной ошибки. Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Критическим уровнем значимости считали $P < 0,05$. При расчетах учитывали нормальность распределения исследуемого количественного признака [медиана близка к среднему значению (расхождение не более 20%)].

Результаты исследования. В печени у новорожденных мышей линий СВА и С57В1/6 наблюдали многочисленные очаги экстремедуллярного кроветворения, гепатоциты располагались рыхло, внутри долек печёночные пластинки не были сформированы (рисунк, а), аргирофильные волокна были слабо выражены.

При сравнительном морфометрическом исследовании печени мышей линий СВА и С57В1/6 были выявлены межлинейные различия по показателям объемной плотности гибнущих клеток, численной плотности гепатоцитов в состоянии митоза и мегакариоцитов: значения этих показателей были большими у новорожденных мышей линии С57В1/6, чем у мышей линии СВА в 3,9; 2,9; 2,1 раза соответственно. Различий в показателях объемной плотности очагов экстремедуллярного кроветворения и аргирофильных волокон в сравниваемых группах животных не выявлено (табл. 1).

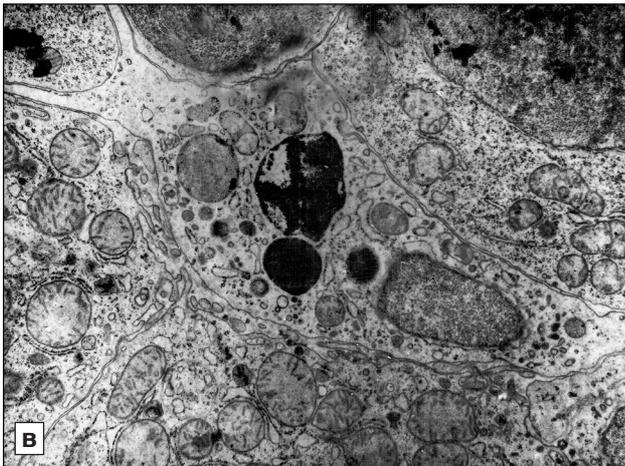
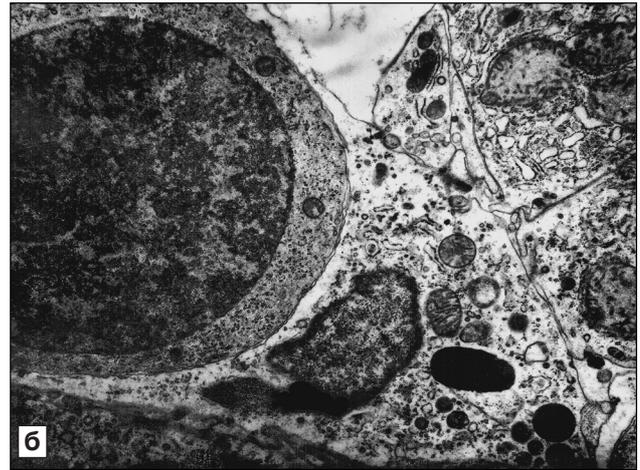
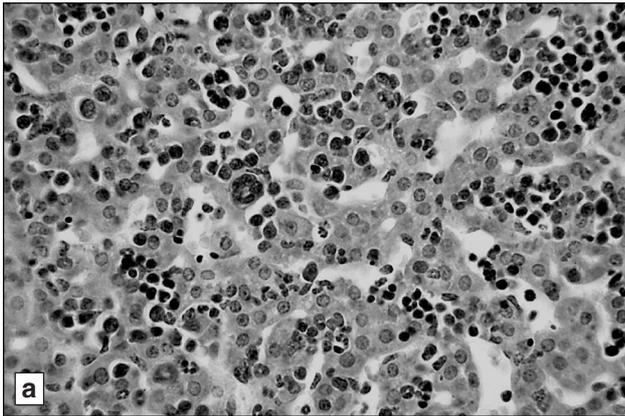
При электронно-микроскопическом исследовании ультраструктур ЗМ (см. рисунок, б, в) в печени у новорожденных мышей сравниваемых линий также были выявлены различия по ряду показателей. Так, величины объемной и поверхностной плотностей ГЭПС были большими у мышей линии С57В1/6, чем у мышей линии СВА, в 1,22, 1,91 раза соответственно, а соотношение величин S_v/V_v ГЭПС — в 1,55 раза. Численная плотность прикрепленных рибосом у мышей линии С57В1/6 превышала в 2,71 раза таковую у мышей линии СВА (табл. 2).

Численная плотность митохондрий ЗМ, расположенных преимущественно в околядерной области (см. рисунок, б), была в 1,9 раза больше у новорожденных мышей линии СВА, чем у мышей линии С57В1/6. При этом соотношение показателей S_v/V_v митохондрий было больше у новорожденных мышей линии С57В1/6 в 1,69 раза (см. табл. 2).

Численная плотность первичных лизосом также была больше у новорожденных мышей линии С57В1/6 в 1,54 раза, чем у мышей линии СВА (табл. 3). Однако межлинейных различий по численной плотности вторичных лизосом в сравниваемых группах выявлено не было (см. табл. 3).

Объемная плотность цитоплазмы ЗМ у мышей линии СВА в 1,47 раза превышала таковую у мышей линии С57В1/6 (см. табл. 2).

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного сравнительного морфологического и морфометрического исследований структуры печени и ЗМ в условиях физиологической нормы выявлены генетиче-



Печень intactных новорожденных мышей линии C57Bl/6 (а, б) и линии СВА (в).

а — очаги экстрамедуллярного кроветворения, мегакариоциты, двуядерные гепатоциты; б — митохондрии звездчатого макрофага; в — первичные и вторичные лизосомы в звездчатом макрофаге intactных новорожденных мышей линии СВА. а — окраска гематоксилином — эозином. Об. 100, ок. 10; б, в — электронные микрофотографии. Ув. 56 000

Таблица 1

Морфометрические показатели структурной организации печени новорожденных мышей оппозитных линий C57Bl/6 и СВА в условиях физиологической нормы ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Параметры исследования	Линии мышей	
	СВА	C57Bl/6
Объемная плотность (Vv):		
вакуолизированных гепатоцитов	15,5±1,1	17,7±1,9
погибших гепатоцитов	0,30±0,19	1,3±0,4*
двуядерных гепатоцитов	7,9±0,8	8,8±0,8
очагов экстрамедуллярного кроветворения	15,5±1,0	18,1±1,2
аргиروفильных волокон	2,9±0,5	2,9±0,4
Численная плотность (Na):		
двуядерных гепатоцитов	5,60±0,25	5,7±0,3
гепатоцитов в состоянии митоза	0,40±0,09	1,20±0,14*
мегакариоцитов	0,70±0,07	1,40±0,14*

Здесь и в табл. 2 и 3: * различия у мышей линии C57Bl/6 по сравнению с показателями у мышей линии СВА значимы при $P < 0,05$.

ски детерминированные различия у новорожденных мышей линий СВА и C57Bl/6.

Морфофункциональные особенности структуры печени и ЗМ у новорожденных мышей линии C57Bl/6, вероятно, отражают более высокие

уровни как физиологической регенерации (увеличение численной плотности гепатоцитов в состоянии митоза), так и большие темпы физиологической смены популяции гепатоцитов (увеличение численной плотности гибнущих гепатоцитов) у мышей линии C57Bl/6 [10]. Можно допустить, что более активные ЗМ у новорожденных мышей линии C57Bl/6 способствуют гибели наиболее поврежденных гепатоцитов и стимуляции пролиферации неповрежденных [9]. Эти результаты согласуются с данными об устойчивости животных линии C57Bl/6 к воздействию многих факторов, провоцирующих развитие различных патологических состояний [4–8].

Межлинейные различия в ультраструктурной организации ЗМ, прежде всего, касались белоксинтезирующего аппарата (ГЭПС и рибосом) и митохондрий, в меньшей степени — лизосом и фаголизосом.

Более развитая сеть мембран, формирующих ГЭПС, и обилие прикрепленных к ним рибосом в ЗМ у новорожденных мышей линии C57Bl/6, по сравнению с таковой у линии СВА, по нашему мнению, являются отражением состоя-

Таблица 2

**Результаты морфометрического исследования
ультраструктурной организации звездчатых макрофагов
у новорожденных мышей оппозитных линий C57Bl/6 и CBA
в условиях физиологической нормы ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)**

Исследованные параметры	Линии мышей	
	CBA	C57Bl/6
Объемная плотность (Vv) цитоплазмы	18,8±0,5	12,76±0,26*
Численная плотность (Na) митохондрий	2,99±0,29	1,6±0,3*
Объемная плотность (Vv) митохондрий	14,6±1,6	11,4±1,0
Поверхностная плотность (Sv) митохондрий	2,12±0,21	2,25±0,29
(Sv/Vv) митохондрии	0,130±0,010	0,220±0,010*
Объемная плотность (Vv) гранулярной эндоплазматической сети (ГЭПС)	54,2±1,6	65,8±1,3
Поверхностная плотность (Sv) ГЭПС	5,97±0,26	11,4±0,4*
S/Vv ГЭПС	0,110±0,003	0,170±0,003*
Численная плотность (Na) прикрепленных рибосом (тестовая площадь — 0,03 мкм ²)	1,5±0,4	4,2±0,4*

Таблица 3

**Морфометрическая характеристика звездчатых макрофагов
у новорожденных мышей оппозитных линий C57Bl/6 и CBA
в условиях физиологической нормы ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)**

Параметры исследования	Линии мышей	
	CBA	C57Bl/6
Численная плотность (Na) первичных лизосом	0,26±0,10	0,40±0,17*
Объемная плотность (Vv) первичных лизосом	2,4±1,2	3,4±0,8
Численная плотность (Na) вторичных лизосом	4,3±0,8	5,5±1,0
Объемная плотность (Vv) вторичных лизосом	13,8±1,9	17,3±2,3
Численная плотность (Na) фагосом	0,55±0,13	0,80±0,15
Объемная плотность (Vv) фагосом	57±9	58±10
Численная плотность (Na) аутофагосом	0,36±0,14	0,08±0,04
Объемная плотность (Vv) аутофагосом	58±7	42±6

ния их исходно высокой синтетической и секреторной активности. По-видимому, у мышей линии C57Bl/6 ЗМ способны активно за счет медиаторных эффектов выполнять адаптационную функцию в условиях физиологической нормы и патологии. Вследствие этого возможно формирование условий для селекции гепатоцитов по критерию неспецифической резистентности [9].

Численная плотность первичных лизосом, являющихся производными эндоплазматической сети комплекса Гольджи, по нашим данным, оказалась большей у мышей линии C57Bl/6, чем у мышей линии CBA. Это могло стать результатом более развитой сети каналов ГЭПС у мышей данной линии [6].

Продукты лизосомального протеолиза при дефиците источников энергии могут быть использованы для энергетических и пластических потребностей клеток, в этом выражается сущность «реконструктивной» функции лизосом [6]. В этой связи можно предположить, что ЗМ у мышей линии C57Bl/6 могут создавать условия, с одной стороны, для эффективной противoinфекционной защиты за счет элиминации возбудителя в фаголизосомах, с другой — иметь значительный гидролитический потенциал, способный при действии определенных триггерных механизмов привести к повреждению клеток печени [6].

Объемная и поверхностная плотность митохондрий ЗМ значимо не различались у мышей исследованных линий. В то же время, наблюдаемое увеличение соотношения показателей Sv/Vv митохондрий ЗМ у мышей линии C57Bl/6 указывает на потенциально высокую энергообеспеченность клетки, и, вероятно, свидетельствует о более высоких исходных функциональных возможностях ЗМ у новорожденных мышей этой линии. Выявленные закономерности позволяют считать, что в условиях патологии возможно значительное увеличение функциональной активности митохондрий ЗМ у животных линии C57Bl/6 [6].

Полноценность функциональной адаптации организма в значительной степени определяется его исходным состоянием в начале постнатального периода развития. В этой связи, выявленные различия морфометрических параметров звездчатых

фагоцитов и структуры печени у новорожденных мышей оппозитных линий CBA и C57Bl/6, могут способствовать дальнейшему изучению влияния внутриутробной патологии на адаптацию печени и организма в целом в его последующем развитии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990.
2. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники: научное издание. СПб.: СпецЛит, 2010.
3. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: Методическое руководство. СПб.: Наука, 1994.
4. Надеев А.П., Шкурупий В.А., Маринкин И.О. Печень и плацента в пре- и постнатальный периоды при патологии:

- Клинико-экспериментальное исследование. Новосибирск: Наука, 2014.
5. Потапова О.В., Черданцева Л.А., Шаркова Т.В. и др. Морфофункциональные особенности легочных макрофагов у мышей оппозитных линий СВА и С57В1/6 // Фундаментальные исследования. 2010. № 10. С. 34–39.
 6. Шкурулий В.А. Ультраструктура клеток печени при стрессе Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1989.
 7. Шкурулий В.А., Приставка А.А., Надеев А.П., Травин М.А. Патоморфологические изменения почек при системном кандидозе у мышей оппозитных линий и при лечении композицией амфотерицина В с окисленным декстраном // Сиб. мед. обозрение. 2011. № 23. С. 38–42.
 8. Шкурулий В.А., Ткачев В.О., Потапова О.В. и др. Морфофункциональные особенности иммунной системы у мышей линий СВА и С57В1/6g // Бюл. exper. биол. 2010. Т. 150, № 12. С. 2–5.
 9. Элбакидзе Г.М., Меденцев А.Г. Внутриорганные и внутритканевые механизмы регуляторных воздействий клеток Купфера на гепатоциты // Вестн. РАМН. 2013. № 2. С. 50–55.
 10. Chen Y.X., Zeng Z.C., Sun J. et al. Radioprotective effect of Kupffer cell depletion on hepatic sinusoidal endothelial cells // Radiat. Res. 2015. Vol. 183, № 5. P. 563–570.
 11. Gao B., Jeong W.I., Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity // Hepatology. 2008. Vol. 47. P. 729–736.
 12. Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies // Cell. Molec. Immunol. 2016. Vol. 13. P. 316–327.
 13. Lotowska J.M., Sobaniec-Lotowska M.E., Lebensztejn D.M. The role of Kupffer cells in the morphogenesis of nonalcoholic steatohepatitis — ultrastructural findings. The first report in pediatric patients // Scand J. Gastroenterol. 2013. Vol. 48, № 3. P. 352–357.
 14. Pradere J.P., Kluwe J., De M.S. et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice // Hepatology. 2013. Vol. 58. P. 1461–147.
 15. Tu Z., Pierce R.H., Kurtis J. et al. Hepatitis C virus core protein subverts the antiviral activities of human Kupffer cells // Gastroenterology. 2010. Vol. 138. P. 305–314.
- Поступила в редакцию 17.01.2017
- ### LIVER AND STELLATE MACROPHAGE STRUCTURAL ORGANIZATION IN THE NEWBORN CBA AND C57BL/6 MICE
- S.P. Mozoleva, A.P. Nadeyev, S.V. Pozdnyakova,
S.V. Zalavina*
- Using electron microscopic and morphometric methods, the morphological peculiarities of the liver and ultrastructural characteristics of the stellate macrophages (Kupffer cells) were studied in the newborn mice (n=20) of two opposing lines — CBA and C57Bl/6 under the conditions of a physiological norm. The structural organization of the liver and stellate macrophage ultrastructure are genetically determined. C57Bl/6 mice, as compared to CBA mice, had higher levels of physiological liver regeneration. Interlinear differences were found also in the ultrastructural organization of the stellate macrophages. Thus, in C57Bl/6 mice these cells possessed more developed network of cisterns of the granular endoplasmic reticulum and a greater number of attached ribosomes, reflecting their higher synthetic activity. The contents of the primary lysosomes was also higher in stellate macrophages of animals of this line.
- Key words:** *liver, stellate macrophages (Kupffer cells), electron microscopy, newborn CBA and C57Bl/6 mice*
- Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University