

© Коллектив авторов, 2018
УДК 577.3:611.36.018:612.65:599.323.4

А. М. Дуров^{1, 2}, Д. Г. Губин¹, Н. Я. Прокопьев², С. В. Соловьева¹, В. П. Зуевский³

ЦИРКАДИАННЫЙ РИТМ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ, АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКИХ И ЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕПАТОЦИТОВ У МЫШЕЙ НА ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

¹ Кафедра биологии (зав. — д-р мед. наук С. В. Соловьева), ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России; ² кафедра управления физической культурой и спортом (зав. — канд. биол. наук Л. Н. Шатилов), Институт физической культуры, ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет»; ³ кафедра биологии с курсом микробиологии (зав. — проф. В. П. Зуевский), БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия»

Цель — изучение суточной организации важнейших показателей метаболизма печени у мышей в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. Суточные изменения показателей метаболизма печени у мышей изучены с использованием цитохимических методик для выявления РНК и гликогена, цитометрических методик для определения площади клеток печени на срезе, объема ядер и ядрышек, ядерно-цитоплазматического отношения, включения ³H-уридина в гепатоциты, содержания гликогена в печени у мышей зрелого, предстарческого и старческого возрастов.

Результаты. Суточная организация показателей метаболизма печени максимально выражена в зрелом возрасте, когда наблюдаются наибольшие амплитуды суточной динамики — отклонения от среднесуточных уровней. У мышей на поздних этапах онтогенеза (предстарческий и старческий возраст) по сравнению со зрелым возрастом изменяются мезоры (среднесуточный уровень), смещаются акрофазы (время наибольшего значения показателя) и уменьшаются амплитуды колебаний изучаемых показателей.

Выводы. Уменьшение амплитуд показателей метаболизма гепатоцитов свидетельствует о снижении функциональных возможностей печени в старческом возрасте, а также о развитии возрастного десинхроноза на клеточном уровне.

Ключевые слова: печень у мышей, гепатоциты, цитометрия, онтогенез, суточные ритмы

Представляет интерес комплексное исследование показателей биологических процессов с учетом времени суток в конкретные этапы онтогенеза [2, 3, 12, 15]. Одним из центральных органов, принимающим участие в функционировании организма вне зависимости от его состояния, является печень. Состояние работоспособности печени во многом определяет и компенсаторные возможности организма в целом. Это объясняется тем, что печени принадлежит важнейшая роль в межсистемной кооперации, она является центром обмена веществ в организме млекопитающего, и именно это обуславливает её функциональное значение в качестве основного органа, поддерживающего гомеостаз организма [1, 8, 9].

Суточные (циркадианные) ритмы биологических процессов у птиц и млекопитающих формируются на ранних этапах онтогенеза, достигая

высокой степени развития в зрелом возрасте [2, 3, 5, 11, 15]. Показано, что в печени у эмбрионов мышей и мышей первых дней постнатальной жизни, крыс и кроликов не установлено закономерных колебаний показателей внутриклеточного обмена веществ в течение суток [15]. Суточный ритм внутриклеточного метаболизма в печени у мышей и крыс устанавливается только после 3–4-й недели постнатальной жизни. В гепатоцитах низших позвоночных (рыб) в течение суток не прослеживается закономерных колебаний большинства показателей внутриклеточного метаболизма. У амфибий (травяная лягушка) расширен круг показателей обмена веществ, испытывающих закономерный суточный ритм. Однако амплитуды суточного ритма тестов метаболизма невысоки. В клетках печени у рептилий (сухопутных черепах) на фоне низкого уровня обмена

Сведения об авторах:

Дуров Алексей Михайлович (e-mail: amdurov@mail.ru), Губин Денис Геннадьевич (e-mail: dgubin@mail.ru), Соловьева Светлана Владимировна (e-mail: svsolov@mail.ru), кафедра биологии, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 54

Прокопьев Николай Яковлевич (e-mail: pronik44@mail.ru), кафедра управления физической культурой и спортом, Институт физической культуры, ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6

Зуевский Владислав Петрович (e-mail: zvp_surgut@mail.ru), кафедра биологии с курсом микробиологии, БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 628011, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, 40

веществ отмечается ритм с небольшой суточной амплитудой. Лишь в гепатоцитах теплокровных позвоночных (птиц и млекопитающих) отмечается суточный ритм с высокой амплитудой всех изученных показателей обмена веществ (размер клеток и их ядер, реакции на РНК и «суммарные белки», интенсивность включения цитидина, размеры и число ядрышек) [4].

Полученные данные о прогрессивном развитии суточного ритма обмена веществ в клетках печени в ряду позвоночных как в онто-, так и в филогенезе, позволяют более глубоко и всесторонне изучить биоритмику обменных процессов на поздних этапах онтогенеза.

Цель настоящего исследования — изучение суточной организации важнейших показателей метаболизма печени у мышей в постнатальном онтогенезе, включая старческий возраст.

Материал и методы. Экспериментальные исследования проводились на самцах мышей (нелинейные животные и мыши линии C57BL/10). В работе использовали возрастную периодизацию лабораторных животных, включающую следующие периоды: молочное кормление, неполовозрелый, репродуктивный и выраженных старческих изменений. Были изучены мыши следующих возрастов: молодого, зрелого, предстарческого и старческого (по 80 животных каждого возраста, всего 320 особей). Исследования проводились 4 раза в сутки: в 3, 9, 15 и 21 ч (по 10 животных на каждую временную точку). В работе соблюдались «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации (протокол № 53 от 18.12.2013 г. решения комитета по этике ТГМА). Обезболивание мышей проводили с использованием хлороформа, который подавали индивидуально по капле в специальной камере.

В исследованиях на клеточном уровне изучали морфологические показатели обмена веществ в гепатоцитах у мышей с использованием цитохимических методик для выявления РНК (метод Браше), гликогена (ШИК-реакция); цитометрических методик для изучения площади клеток печени, объема ядер и ядрышек, ядерно-цитоплазматического отношения. С целью изучения суточных колебаний синтеза РНК в гепатоцитах у мышей молодого, зрелого и старческого возраста проведено гистоавтографическое исследование с использованием ^3H -уридина (всего проанализировано 7200 клеток печени). Для подтверждения результатов цитохимических исследований проведено изучение содержания гликогена в гомогенатах печени у мышей. В работе применяли программу «Косинор», которая позволяет рассчитать параметры ритма: мезор (среднесуточный уровень), амплитуду (отклонение от мезора), акрофазу (время наибольшего значения показателя).

Результаты исследования. Установлено, что у мышей молодого и зрелого возраста в ночные и утренние часы в печени происходит накопление гликогена, увеличение размеров гепатоцитов и их ядер, уменьшение содержания РНК. В дневные и вечерние часы обнаружены противо-

положные изменения. У нелинейных и линейных мышей репродуктивного возрастного периода по всем исследуемым показателям установлен значимый суточный ритм с высокой амплитудой. Широкий диапазон колебаний показателей внутриклеточного метаболизма печени у мышей зрелого возраста свидетельствует о больших функциональных возможностях печени, ее высокой способности перестраиваться к изменяющимся факторам внешней среды. В онтогенезе у мышей установлены определенные изменения структуры суточных ритмов (мезоров, амплитуд и акрофаз), характерной для репродуктивного периода. Изменения по среднесуточному уровню (мезору) в онтогенезе у мышей весьма разнообразны. Мезоры одних показателей (площадь клеток, объем ядер) увеличиваются на поздних этапах онтогенеза по сравнению со зрелым возрастом, по другим (интенсивность включения ^3H -уридина в ядро, цитоплазму гепатоцитов) — не изменяются или уменьшаются (содержание гликогена в печени).

В онтогенезе у мышей изменению подвержены не только мезоры, но и акрофазы суточных ритмов. У мышей C57BL/10 зрелого, предстарческого и старческого возраста площадь клеток печени максимальна в 9 ч. Объем ядер гепатоцитов во все изученные возрасты достигает максимума в ночные и утренние часы (3, 9 ч). Ядерно-цитоплазматическое отношение в течение суток изменяется неодинаково у мышей в разные возрастные периоды. Так, если у мышей зрелого возраста ядерно-цитоплазматическое отношение наибольшее в 21 ч, то у мышей предстарческого возраста — в 3 ч, а у животных старческого возраста — в 15 ч. Наименьшее ядерно-цитоплазматическое отношение отмечается у мышей всех возрастов в 9 ч. По содержанию гликогена в печени отмечается эпифазия — запаздывание акрофаз в старческом возрасте относительно зрелого.

Анализ амплитуд суточных ритмов позволил выявить общую закономерность их изменений в онтогенезе. Практически по всем исследуемым показателям на поздних этапах онтогенеза амплитуды уменьшаются относительно зрелого возраста (таблица).

Обсуждение полученных данных. В 1990-х годах господствовало представление о том, что циркадианные ритмы всех периферийных органов подчинены супрахиазматическим ядрам (СХЯ). В настоящее время доказано, что печень обладает значительной автономией, и на ее цикл в значительной мере влияет периодичность питания. Мыши и крысы — ночные животные,

**Оценка амплитуд (%) морфологических показателей у мышей
в различные возрастные периоды**

Возраст	Зрелый	Предстарческий	Старческий
Площадь гепатоцитов	33	24	21 *
Объем ядер	25	10 *	13 *
Ядерно-цитоплазмное отношение	36	21	29
Число ядрышек на 1 ядро	30	11 *	
Суммарный объем ядрышек на 1 ядро	17	8 *	
Включение ³ H-уридина в ядро	4,3		1,6 *
Включение ³ H-уридина в цитоплазму	5,6		1,4 *
Гликоген печени	15		8 *

* Различия статистически значимы относительно зрелого возраста при $p < 0,05$.

и основной прием пищи у них приходится на темное время суток. Однако, если животные питались только днем, то циркадианный цикл печени сдвигался на 12 ч [14]. Полученные данные свидетельствуют о том, что у мышей молодого и зрелого возраста по всем изученным показателям установлен выраженный суточный ритм с высокой амплитудой. Широкий диапазон колебаний показателей внутриклеточного метаболизма гепатоцитов у мышей репродуктивного возрастного периода говорит о больших функциональных возможностях печени. Анализируя архитектуру суточных ритмов на поздних этапах онтогенеза у мышей, можно сказать, что не всегда происходит изменение мезоров с возрастом или смещение акрофаз. Наиболее общей для изученных показателей закономерностью является уменьшение амплитуд колебаний в старческом возрасте. Затухание осцилляций с возрастом более выражено у линейных мышей по сравнению с неллинейными. Вероятно, обусловленный генетическим полиморфизмом различный индивидуальный биоритмологический статус накладывает свой отпечаток на общую биологическую закономерность, несколько ее гасит и делает менее выраженной. О том, что индивидуальные различия бывают существенными, говорится в работе [6]. У некоторых видов животных высокоамплитудные ритмы в печени сохраняются до старости и взаимосвязаны с высокой продолжительностью жизни [10]. Это доказывает необходимость изучения роли индивидуального биоритмологического статуса у человека и животных, а также необходимость установления роли и степени влияния ведущих факторов синхронизации на суточную динамику показателей жизнедеятельности [13]. Объяснение механизмов возникновения ритмичности биологических процессов в печени у мышей рассмотрено в работе [7].

Полученные в работе результаты указывают на то, что каждому возрастному периоду присуща своя архитектура суточных ритмов показателей метаболизма печени. Представленные данные на примере различных возрастных периодов онтогенеза у мышей подтверждают сформулированную Г. Д. Губиным концепцию «волчка» [2–4, 11, 12]. Согласно ей, весь онтогенез представляется в форме спирали с постепенно возрастающими ее оборотами (наращивание амплитуд). В зрелом возрасте регистрируются максимальные амплитуды ритмов, а на поздних этапах онтогенеза отмечается сокращение оборотов спирали (затухание осцилляций).

Полученные нами хронобиологические данные свидетельствуют о том, что функциональные возможности печени у мышей (которые оцениваются нами в основном по амплитудам ритмов) достаточно медленно уменьшаются на поздних этапах онтогенеза. Следовательно, печень по своим ведущим морфологическим и биохимическим показателям — весьма медленно стареющий орган. Поэтому по мезорам и акрофазам показателей метаболизма печени не всегда выявляются изменения на поздних этапах онтогенеза. Лишь снижение амплитуд колебаний размеров клеток, ядер, ядерно-цитоплазмного отношения, показателей ядрышкового аппарата, включения ³H-уридина в гепатоциты, содержания гликогена в печени свидетельствуют о затухании функциональных возможностей печени в старческом возрасте.

Подробный обзор комплексных механизмов постепенной утраты синхронизации суточной динамики молекулярно-генетических, клеточных, тканевых, системных и организменных процессов на поздних этапах онтогенеза был нами подробно представлен в ряде недавних работ [2, 3, 6, 11, 12].

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1) суточная динамика показателей метаболизма печени у мышей, изученная с использованием цитохимических, цитометрических и гистоавтографических методик, максимально выражена в зрелом возрасте;

2) функциональные возможности печени у мышей медленно уменьшаются на поздних этапах онтогенеза. Печень в соответствии с характером суточных колебаний морфологических и биохимических показателей на разных этапах

постнатального онтогенеза — весьма медленно стареющий орган;

3) практически по всем исследованным морфологическим показателям на поздних этапах онтогенеза амплитуды статистически значимо уменьшаются по сравнению со зрелым возрастом, что свидетельствует о снижении функциональных возможностей печени в старческом возрасте.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: А. М. Д.

Сбор, анализ и хронобиологическая обработка материала: А. М. Д., Д. Г. Г.

Статистическая обработка: В. П. З.

Анализ полученных данных: Н. Я. П.

Написание и редактирование текста: С. В. С.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Арешидзе Д.А. Морфологические и гистохимические показатели адаптации обменных процессов в гепатоцитах крыс с экспериментальным гипер- и гипопаратиреозом при инверсии светового режима: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2002. 177 с. [Areshidze D.A. Morphological and histochemical indicators of adaptation of metabolic processes in hepatocytes of rats with experimental hyper- and hypoparathyroidism due to inversion of the light regime: Avtoref. diss. biol. sciences. Stavropol, 2002. 177 p. In Russ.].
- Губин Д.Г., Вайнерт Д. Динамика временной организации в процессе старения. 1. Центральные и периферические механизмы // Успехи геронтологии. 2015. Т. 28, № 2. С. 257–268 [Gubin D.G., Weinert D. The Dynamics of temporal organization in the aging process. 1. Central and peripheral mechanisms // Uspekhi gerontologii. 2015. Vol. 28, № 2. P. 257–268. In Russ.].
- Губин Д.Г., Вайнерт Д. Динамика временной организации в процессе старения. 2. Системные механизмы и способы коррекции возрастного десинхронизма // Успехи геронтологии. 2015. Т. 28, № 3. С. 423–434 [Gubin D.G., Weinert D. The Dynamics of temporal organization in the aging process. 2. System mechanisms and methods of correction of age-related DS // Uspekhi gerontologii. 2015. Vol. 28, № 3. P. 423–434. In Russ.].
- Губин Д.Г., Губин Д.Г. Филогенез и онтогенез как процессы динамики степени неравновесности открытой системы (в свете синергической парадигмы) // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование XXI века». 2006. Т. 8, № 5. С. 210–211 [Gubin D.G., Gubin D.G. Phylogeny and ontogeny as a process of dynamics of the degree of non-equilibrium open system (in the light of synergetic paradigm) // Elektronnyi nauchno-obrazovatel'nyi vestnik «Zdorov'e i obrazovanie XXI veka». 2006. Vol. 8, № 5. P. 210–211. In Russ.].
- Губин Д.Г., Губин Д.Г., Менделян Ш. Закономерности живого как итог цикличности планета Земля в Солнечной системе мира // Успехи современного естествознания. 2008. № 10. С. 46–47 [Gubin D.G., Gubin D.G., Mendelian S. The patterns of living as a result of cyclical Earth in the Solar system // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2008. № 10. P. 46–47. In Russ.].
- Дуров А.М., Губин Д.Г., Денежкина В.Л., Назаренко М.А. Сравнительный анализ циркадианных ритмов показателей кардиореспираторной системы и биологического возраста у лиц, проживающих на юге и севере Тюменской области // Фундаментальные исследования. 2015. № 1–4. С. 730–734 [Durov A.M., Gubin D.G., Denezhkina V.L., Nazarenko M.A. Comparative analysis of circadian rhythms in indices of cardio-respiratory system and biological age in individuals living in the South and the North of the Tyumen region // Fundamental'nye issledovaniya. 2015. № 1–4. P. 730–734. In Russ.].
- Подколюжный Н.А., Твердохлеб Н.Н., Подколюдная О.А. Анализ циркадианного ритма биологических процессов в печени и почках мыши // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21, вып. 8. С. 903–910 [Podkolodny N.A., Tverdokhle N.N., Podkolodnaya O.A., Analysis of circadian rhythm of biological processes in the liver and kidney of the mouse // Vavilovskii jurnal genetiki i seleksii. 2017. Vol. 21, issue 8. P. 903–910. In Russ.].
- Шилкина Е.С. Циркадные, годовые ритмы функциональных показателей печени в условиях токсичной нагрузки у крыс // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016. № 7 (131). С. 56–61 [Shilkina E.S. Circadian, annual rhythms of the functional parameters of the liver in terms of toxic loading in rats // Experimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya. 2016. № 7 (131). P. 56–61. In Russ.].
- Шмерлинг М.Д., Белкин В.Ш., Филюшина Е.Е. и др. Морфометрическая характеристика гепатоцитов при адаптации к экстремальным факторам Антарктиды // Морфология. 2008. Т. 134, вып. 6. С. 46–50 [Shmerling M.D., Belkin V.S., Filushina E.E. et al. Morphometric characteristic of the hepatocytes during adaptation to extreme factors of Antarctica // Morphologiya. 2008. T. 134, № 6. P. 46–50. In Russ.].
- Froy O., Chapnik N., Miskin R. Relationship between calorie restriction and the biological clock: Lessons from long-lived transgenic mice // Rejuvenation Res. 2008. Vol. 11. P. 467–471.
- Gubin D.G., Cornelissen G., Weinert D., Vetoshkin A.S., Gapon L.I., Shurkevich N.P., Poshinov F.A., Belozerova N.V., Danilova L.A. Circadian disruption and vascular variability disorders (VVD): Mechanisms linking aging, disease state and Arctic shift-work: Applications for Chronotherapy // World Heart J. 2013. Vol. 5, № 4. P. 285–306.
- Gubin D., Weinert D., Bolotnova T.V. Age-dependent changes of the Temporal Order — Causes and Treatment // Current Aging Sci. 2016. Vol. 9, №1. P. 14–25.
- Gubin D.G., Weinert D., Rybina S.V., Danilova L.A., Solovieva S.V., Durov A.M., Prokopiev N.Y., Ushakov P.A. Activity, sleep and ambient light have a different impact on circadian blood pressure, heart rate and body temperature rhythms // J. Chronobiol. Int. 2017. Vol. 34, № 5. P. 632–649.
- Stokkan K.A., Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y., Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding // Science. 2001. Vol. 291. P. 490–493.
- Weinert D. Ontogenetic development of the mammalian circadian system // Chronobiol. Int. 2005. Vol. 22, № 2. P. 179–205.

Поступила в редакцию 28.06.2017

Получена после доработки 08.02.2018

CIRCADIAN RHYTHM OF HISTOCHEMICAL, AUTORADIOGRAPHIC AND CYTOMETRIC INDICES IN MICE HEPATOCYTES AT THE VARIOUS STAGES OF ONTOGENESIS

A. M. Durov^{1,2}, D. G. Gubin¹, N. I. Prokopyev²,
S. V. Solovyova¹, V. P. Zuyevskiy³

Objective — to study the diurnal organization of the most important parameters of liver cell structure and metabolism in mice during postnatal ontogenesis.

Materials and methods. Diurnal changes in the metabolic indices of the liver of mice were studied using cytochemistry and image cytometry. RNA and glycogen were demonstrated by cytochemical methods. The image cytometry was applied for assessing the area of section occupied by liver cells, the volume of the nuclei and nucleoli, nuclear-cytoplasmic ratio, the incorporation of 3H-uridine in hepatocytes, and glycogen content in the liver of mature, presenile and senile mice.

Results. Diurnal organization of the liver metabolic parameters was strongly pronounced in mature (adult) age. During this period, the largest amplitudes of the daily dynamics – deviations from the average daily levels – were detected. Mice at the later ontogeny stages (presenile and senile age), compared to adult mice, showed changes in mesor (average daily level), acrophases shifts and reduced amplitudes of measured parameters.

Conclusions. The reduction in amplitudes of hepatocyte metabolic parameters indicates the attenuation of the liver functional capacities in the old age and demonstrates age-dependent desynchronization at the cellular level.

Key words: *liver, hepatocytes, image cytometry, ontogeny, circadian rhythms*

¹ Department of Biology of the Tyumen State Medical University, Ministry of Health of Russia, 54 Odesskaya St., Tyumen 625023; ² Department of Physical Culture and Sport Management, Institute of Physical Education, Tyumen State University, 6 Volodarskogo St., Tyumen 625003; ³ Department of Biology with Microbiology Course, Khanty-Mansiysk State Medical Academy, 40 Mira St., Khanty-Mansiysk 628011