

Л.П. Романова и И.И. Мальшев

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПЛОИДНОСТИ ГЕПАТОЦИТОВ ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ ПЕЧЕНИ ПЛОДОВ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ «ТРЕПЕЛ» И «СУВАР»

Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. И.И. Мальшев), Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, e-mail: Malichev_med@mail.ru

Цель работы — изучение влияния биологически активных веществ (БАВ) «Трепел» и «Сувар» на ploидность гепатоцитов в ходе восстановления структуры печени у плодов и новорожденных крыс после механической травмы, нанесенной внутриутробно на 16–17-е сутки развития (n=112), а также установление связи полиплоидизации с другими регенераторными проявлениями. Обнаружено, что при заживлении механической травмы печени у плодов и новорожденных крысят, наряду с пролиферацией гепатоцитов, происходит их полиплоидизация. Это даёт основание полагать, что полиплоидизация является одним из проявлений регенераторного процесса. В работе также показано, что использованные БАВ активизируют и пролиферацию гепатоцитов, и их полиплоидизацию. Авторы полагают, что стимулирующий эффект этих БАВ связан с их ростостимулирующим действием, приводящим к изменению гормонального статуса организма крыс.

Ключевые слова: *печень, регенерация, полиплоидизация, механическая травма, плоды и новорожденные*

Механизмы восстановления структуры печени после воздействия дестабилизирующих факторов, в частности после механических повреждений, остаются до конца не выясненными. Частота последних в настоящее время колеблется от 20 до 50% от всех травм брюшной полости, в большинстве случаев (до 90%) они наблюдаются у людей молодого и раннего детского возраста [5], но встречаются и у плодов, и у новорожденных.

В связи с этим интерес представляет изучение регенерации печени в раннем периоде онтогенеза. По мнению А.А. Заварзина, знание закономерностей восстановительных процессов, происходящих в тканях и органах до рождения, является необходимой основой для понимания регенераторных процессов, осуществляющихся в организме на протяжении всей дальнейшей жизни [6].

Большинство работ по изучению регенерации печени плодов млекопитающих связано с ее исследованием в условиях *in vitro* [3, 19]. Поэтому актуальным является изучение тканевых реакций печени во внутриутробном периоде в естественных условиях живого организма.

Из средств стимуляции регенерации печени в последнее время интерес привлекают природные цеолиты [13, 17, 18], которые оказывают положительное воздействие на многие стороны жизнедеятельности организма животных [4, 7]. Применение их в ветеринарной диетологии и нутрициологии привело к улучшению многих показателей у продуктивных животных, что связывают с их рост- и иммуностимулирующим действием [1,

4]. Особенно эффективно действие цеолитов в сочетании с другими биологически активными веществами (БАВ) [1, 12, 16]. Цеолиты постепенно находят применение и в медицине [8].

Совместное использование цеолитов Алатырского месторождения Чувашской Республики в виде БАВ «Трепел» и «Сувар» стимулирует пролиферацию гепатоцитов у плодов и новорожденных крысят после механической травмы [9].

При изучении регенерации органов отмечена полиплоидизация их клеток [10], однако биологическое значение этого явления остаётся не выясненным. Предполагают, что полиплоидизация является вариантом клеточного размножения [2]. Учитывая сказанное, можно считать целесообразным изучение ploидности гепатоцитов в ходе регенерации печени после механической травмы у крысят в условиях стимуляции БАВ.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния БАВ «Трепел» и «Сувар» на ploидность гепатоцитов в ходе восстановления структуры печени у плодов и новорожденных крысят после механической травмы и установление связи полиплоидизации с другими регенераторными проявлениями.

Материал и методы. Эксперименты поставлены на 28 белых беременных самках крыс массой 259–306 г и их потомстве. Объектом исследования явилась печень 112 плодов крыс после ее механической травмы на 16–17-е сутки развития [11]. После послеродового разреза кожи и мышц передней брюшной стенки беременной самки в операционную рану

выводили матку с находившимися в ней плодами, которые в эти сроки беременности хорошо видны через истонченную стенку матки. Плоды в матке осторожно поворачивали на 90° таким образом, чтобы переднебоковая поверхность их брюшной стенки находилась в месте предполагаемого прокола и была хорошо видна. Стальной иглой с ограничителем [12] выполняли прокол стенки матки, затем — брюшной стенки плода в правом подреберье в месте проекции печени. Исследования проводили с соблюдением приказа Министерства высшего и среднего образования СССР от 13.11.1984 г «О правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных». Гистологическое исследование печени проведено в сроки от 1-х до 30-х суток после операции. В ранние сроки после операции (1–3-и сутки) плоды извлекали из матки с помощью кесарева сечения. Начиная с 5-х суток, оперированные в матке плоды рождались самостоятельно. Родившиеся крысят росли и развивались нормально.

Начиная с 1-х суток после операции, в основной рацион самок добавляли БАВ «Трепел» из расчета 1,25 мг/кг и «Сувар» — 50 мг/кг. Планируя эксперимент, мы также учитывали работу А.Н. Тарасова [15], в которой он показал, что скормливание цеолитов влияет на качество молока за счёт содержания в нём БАВ. Начиная с 16–18-х суток с момента рождения, крысят начинали сами, наряду с молоком, употреблять в пищу корм с добавками БАВ.

В качестве контроля были использованы 96 плодов и родившихся крысят, которым в аналогичных условиях производили прокол печени, однако после операции БАВ самкам в рацион не добавляли. Как в опыте, так и в контроле использовали не менее 9 особей на каждую временную точку.

Печень оперированных животных после выделения при вскрытии фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Изготавливали серийные гистотопографические срезы толщиной 5–6 мкм, которые окрашивали гематоксилином — эозином, по Ван-Гизону, ставили реакцию Фельгена. Пролиферативную активность печени оценивали с помощью подсчета фигур митоза и двуядерных гепатоцитов (на 7000 клеток при увеличении 900). Содержание ДНК в ядрах гепатоцитов определяли в микроскопе Биолам-70 (ЛМО, Россия) с помощью фотометрирования с использованием микрофотонасадки ФМЭЛ-1 и фотометра ФЭУ-79А в проходящем свете с запирающим светофильтром с максимумом светопропускания на длине волны 570 нм с подаваемым напряжением 900 В. Диплоидным эталоном служили лимфоциты периферической крови и малые лимфоциты лимфатических узлов. Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием программы «Статистика» и с привлечением пакета программ Microsoft office (Word Excel) Pentium 166 ММХ. Статистическую значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Морфометрическое исследование показало, что при заживлении травмы печени митотическая активность гепатоцитов у плодов и новорожденных крысят и в опыте, и в контроле возрастает. Однако митотически делящиеся гепатоциты подопытных крысят наблюдаются дольше, по 20-е сутки включительно. Пик митотической активности приходится на период с 3-х по 5-е сутки — в контроле и с 3-х по 9-е — в опыте (табл. 1).

Таблица 1

Доля митотически делящихся гепатоцитов у плодов и новорожденных крысят в опыте и контроле ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Время после операции (сутки)	Опыт	Контроль
1-е	2,6±1,2	1,8±0,4
3-и	6,5±2,4	4,5±1,4
5-е	8±4*	6,1±1,9
7-е	7±5*	2,1±0,8
9-е	6,4±2,8*	1,0±0,4
11-е	6,4±2,8	0
15-е	3,6±1,9	0
20-е	0,81±0,10	0

* Различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,001$.

После механической травмы печени у плодов крыс происходит значительное увеличение и количества двуядерных гепатоцитов. Оно начинается с 7-х суток (табл. 2). Именно с этого срока у животных постепенно уменьшается митотический индекс.

Таблица 2

Доля двуядерных гепатоцитов у плодов и новорожденных крысят в опыте и контроле ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Время после операции (сутки)	Опыт	Контроль
1-е	15,0±1,7	14,6±2,7
3-и	15,2±2,6	15,3±2,4
5-е	16,3±2,5	15,2±2,6
7-е	21±5	18,6±1,9
9-е	25±5*	18,7±2,8
11-е	27±5*	19,6±2,7
15-е	26±4*	16±4
20-е	23,5±2,8*	17±4
30-е	25,4±2,8*	18,1±1,9

* Различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,01$.

В ходе заживления механической травмы органа выявлено изменение ploидности ядер гепатоцитов. Динамика изменения этого показателя в опыте и контроле представлена в табл. 3.

Обсуждение полученных данных. Заживление механической травмы у плодов и новорожденных крысят протекало аналогично тому, что имело место у 18-дневных крысят после механической травмы печени [12]. Отличием было то, что у подопытных животных соединительная ткань на месте травмы возникала на 11-е сутки, а в контроле — на 9-е сутки (у 18-дневных крысят соответственно на 15-е и 11-е сутки).

Таблица 3

Доля ядер гепатоцитов различной ploидности у плодов и новорожденных крысят в опыте и контроле (%)

Время после операции (сутки)	Диплоидные ядра		Тетраплоидные ядра		Октаплоидные ядра		16-плоидные ядра	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
1-е	60,3	63,4	39,4	36,6	0,2	0	Единичные	0
3-и	47,4	67,3	42,3	32,7	8,3	0	1,9	0
5-е	31,8	60,9	56,1	39,1	9,1	0	3,0	0
7-е	30,6	54,6	58,1	45,4	8,6	0	2,7	0
9-е	31,7	56,3	59,2	43,7	7,0	0	2,4	0
11-е	39,2	58,2	53,5	41,8	3,3	0	0,9	0
15-е	40,5	57,0	56,4	43,0	2,6	0	0,5	0
20-е	50,4	59,1	48,2	40,9	1,2	0	0	0
30-е	53,3	54,5	45,8	45,4	0,9	0	0	0

У подопытных крысят воспалительная реакция вокруг очага травмы была выражена слабо, число фибробластов здесь было небольшим, и появлялись они в клеточном инфильтрате позднее; развитие соединительной ткани на месте дефекта печени запаздывало по сравнению с контролем. Аналогичные результаты были получены и у 18-дневных крысят [12]. Таким образом, влияние БАВ «Трепел» и «Сувар» на заживление механической травмы у крысят в раннем периоде онтогенеза имеет не случайный характер — оно закономерно.

Центральным звеном механизма регенерации печени после механической травмы является пролиферация гепатоцитов. По мере снижения их митотической активности увеличение числа двуядерных гепатоцитов ранее было отмечено многими авторами [10, 14].

Полученные данные свидетельствуют о том, что БАВ «Трепел» и «Сувар» у плодов и новорожденных крысят, снижая воспалительную реакцию вокруг очага травмы, замедляют развитие на этом месте соединительной ткани и стимулируют пролиферацию гепатоцитов. Механизм влияния БАВ на заживление механической травмы печени, на наш взгляд, связан с их ростостимулирующим действием и изменением гормонального фона у животных [11].

Кариометрическое исследование показало, что после механической травмы печени у плодов и новорожденных крысят происходит увеличение количества тетраплоидных ядер гепатоцитов, а также встречаются единичные октаплоидные и 16-плоидные ядра, которые полностью отсутствуют у контрольных животных (см. табл. 3). Сравнительный анализ данных пролиферации гепатоцитов и полиплоидизации показывает, что увеличение доли полиплоидных клеток происходит с 5-х суток; к 7-м суткам увеличивается и

доля двуядерных гепатоцитов. Сам факт наличия положительной динамики изменения ploидности ядер гепатоцитов в ответ на травму и её связь с увеличением числа двуядерных клеток дают основание утверждать, что полиплоидизация принимает участие в регенерации повреждённой печени. У подопытных животных полиплоидизация выражена в большей степени, чем в контроле, что в комплексе с данными о пролиферации гепатоцитов свидетельствует о том, что БАВ «Трепел» и «Сувар» активизируют регенерацию печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова М.Н. Становление и развитие функциональных систем у боровков в биогеохимических условиях Чувашского центра с назначением биогенных соединений: Автореф. дис.... канд. биол. наук. Чебоксары, 2008.
2. Бродский В.Я. и Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М., Наука, 1981.
3. Гичев Ю.П. и Граудиня Ж.П. Культура ткани печени в гепатологии. Новосибирск, Наука, 1986.
4. Григорьев С.Г. Становление и развитие морфофизиологического состояния продуктивных животных в биогеохимических условиях Чувашской Республики: Автореф. дис...-д-ра биол. наук. Чебоксары, 2009.
5. Досмамбетова К.К. Морфология раны печени и реакция регионарных лимфатических узлов при применении геля «Луросом»: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2004.
6. Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. М., Л., Медицина, 1947.
7. Иванов Г.И. и Григорьева Т.Е. Результаты исследований Чувашского отдела НИВИ Нечерноземной зоны РФ по применению трепелов Первомайского месторождения в животноводстве и ветеринарии. В кн.: Изучение и использование кремнистых пород Чувашии. Чебоксары, Изд-во Чувашск. гос. ун-та им. И.Н. Ульянова, 1998, с. 49–54.
8. Колотилова М.Л. и Иванов Л.Н. Цеолитсодержащий трепел в медицине. Чебоксары, Изд-во Чувашск. гос. ун-та им. И.Н. Ульянова, 2003.

9. Малышев И.И., Романова Л.П. и Воробьева О.В. Микроскопическая морфология заживления механической травмы печени у плодов и новорожденных крысят при применении биологически активных веществ «Трепел» и «Сувар». Вестн. Чувашск. государственного педагогического ун-та им. И.Я. Яковлева, 2010, т. 68, № 4, с. 117–121.
10. Романова Л.К. Регуляция восстановительных процессов. М., Изд-во Московск. ун-та, 1984.
11. Романова Л.П. и Малышев И.И. Патент № 2262135. Способ моделирования механического повреждения печени у лабораторных животных для дальнейшего изучения регенерации. Заявка от 10.10.2005 г. Бюл. изобрет., 2010, № 24, с. 3.
12. Романова Л.П. и Малышев И.И. Регенерация печени после её механической травмы у крыс на фоне применения биологически активных веществ «Трепел» и «Сувар». Морфология, 2011, т. 140, вып. 4, с. 38–41.
13. Скребков Г.П. О месторождениях и свойствах трепелов Чувашии. В кн.: Применение местных сырьевых ресурсов в народном хозяйстве. Чебоксары, Изд-во Чувашск. гос. ун-та им. И.Н. Ульянова, 1997, с. 6–13.
14. Солопаев Б.П. Регенерация нормальной и патологически изменённой печени. Горький, Волго-Вятск. кн. изд-во, 1980.
15. Тарасов А.Н. Влияние природных цеолитов Алатырского месторождения на молочную продуктивность и качество молока. Инф. листок Чувашского ЦНТИ № 82–082–01. Чебоксары, 2001.
16. Шуканов А.А., Кабиров А.С. и Тихонов А.С. Параметры морфометрии структуры надпочечников, семенников и качества спермы у быков в условиях скормливания «Трепела» и «Суvara». В кн.: Материалы II Междунар. симпозиума «Современные проблемы ветеринарной диетологии и нутрициологии». СПб., Изд-во Гос. акад. ветеринарной медицины, 2003, с. 97–99.
17. Ярован Н.И. Использование хотинецких природных цеолитов Орловской области для нормализации свободнорадикального окисления у свиней. В кн.: Материалы III Междунар. симпозиума «Современные проблемы ветеринарной диетологии и нутрициологии». СПб., 2005, с. 170–171.
18. Poulsen H. and Oksbjerg N. Effects of dietary inclusion of zeolite (clinoptilolite) on performance and protein metabolism of young growing pigs. Anim. Feed Sci. Technol., 1995, v. 53, p. 297–303.
19. Zucali J.R., McGarry M.P. and Mirand E.A. Stimulation of erythropoiesis in a grafted animal by mouse fetal liver culture media. Exp. Hematol., 1977, v. 5, p. 103–108.

Поступила в редакцию 17.02.2011
Получена после доработки 08.07.2011

DYNAMICS OF HEPATOCYTE PLOIDY CHANGES AFTER MECHANICAL INJURY OF THE FETAL LIVER UNDER THE CONDITIONS OF APPLICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE DRUGS «TREPЕL» AND «SUVAR»

L.P. Romanova and I.I. Malyshev

The aim of this study was to evaluate the effect of biologically active drugs (BAD) «Trepel» and «Suvar» on the hepatocyte ploidy during the restoration of liver structure in rat fetuses and newborn pups after mechanical injury, inflicted on days 16–17 of intrauterine development (n=112), and to determine the association of polyploidization with the other manifestations of regeneration. It was found that during the healing of mechanical liver injury in fetuses and newborn rat pups, along with hepatocytes proliferation, their polyploidization occurred. This suggests that polyploidization is one of manifestations of a regenerative process. This study has also shown that BAD «Trepel» and «Suvar» activated both hepatocyte proliferation and their polyploidization. The authors believe that the stimulating effect of these substances is associated with their growth-stimulating effect which results in the change in hormonal status of rat organism.

Key words: *liver, regeneration, polyploidization mechanical trauma, fetuses and newborns*

Department of Pathological Anatomy, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary