

*М.Д. Шмерлинг¹, В.Ш. Белкин³, Е.Е. Филюшина¹, О.Б. Астахов²,
И.И. Бузуева¹ и В.В. Веряскин¹*

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ АДАПТАЦИИ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ФАКТОРАМ АНТАРКТИДЫ

¹ Лаборатория электронной микроскопии (зав. — канд. биол. наук И.И. Бузуева) Научно-исследовательского института физиологии СО РАМН, г. Новосибирск; ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. Р.М. Хайруллин) медицинского факультета Ульяновского государственного университета; ³ кафедра анатомии и антропологии (зав. — проф. Х. Пик) медицинского факультета Тель-Авивского университета, Израиль

С помощью морфометрических методов изучена динамика ультраструктурных преобразований гепатоцитов белых крыс в условиях длительного воздействия экстремальных факторов Антарктиды. Установлено, что в ранние сроки эксперимента (7–45 сут) в гепатоцитах происходят нарушения внутриклеточного структурного гомеостаза вследствие резкого снижения источников энергии и пластических резервов (снижение численной и объемной плотности митохондрий, уменьшение объема гранулярной эндоплазматической сети и расширение ее цистерн, увеличение объема агранулярной эндоплазматической сети). Последующие сроки (до 180 сут) характеризуются практически полным восстановлением энергопластических потенций гепатоцитов. В заключительной стадии эксперимента (270 сут) имеет место истощение энергетических и особенно пластических резервов гепатоцитов (выраженное снижение численной плотности митохондрий и относительно объема гранулярной эндоплазматической сети).

Ключевые слова: гепатоциты, ультраструктура, экстремальные факторы, Антарктида.

Влияние на организм человека комплекса экстремальных факторов Антарктиды изучали на протяжении всего периода освоения материка. При этом предпочтение отдавалось клинко-физиологическим исследованиям [2, 4, 6, 10, 11, 14, 15]. Во время 30-й и 31-й Антарктических отечественных экспедиций был проведен уникальный эксперимент по изучению влияния экстремальных факторов Антарктиды на организм животных — белых крыс, рожденных в северном полушарии. Анализ полученных в этом эксперименте данных позволил оценить уровень иммунной активности организма животных в условиях зимовок в Антарктиде, реакцию периферической крови и некоторых эндокринных органов [1, 10].

В исследованиях, посвященных влиянию на организм различных условий внешней среды, накоплен большой материал о роли печени в процессах адаптации. Печень, как важный гомеостатический орган, во многом определяет энергопластический потенциал органов и систем, от которого в конечном итоге зависит сохранение резистентности организма в экстремальных, стрессовых ситуациях [3, 7]. Цель данной работы — выявление ультраструктурного эквивалента адаптивных реакций гепатоцитов на воздействие экстремальных климато-географических факторов антарктического материка.

Материал и методы. Экспериментальные животные — белые крысы были доставлены из Северного полу-

шария (питомник Рапполово, С.-Петербург) в Антарктиду на прибрежную станцию — обсерваторию «Мирный» на дизель-электроходе. При транспортировке животных и в период пребывания на антарктическом материке животных содержали в специальных клетках на стандартном пищевом рационе. После высадки на материк крысы в течение 15 сут проходили период реабилитации. В течение всего эксперимента через каждый месяц производили взвешивание животных. Эксперименты выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755).

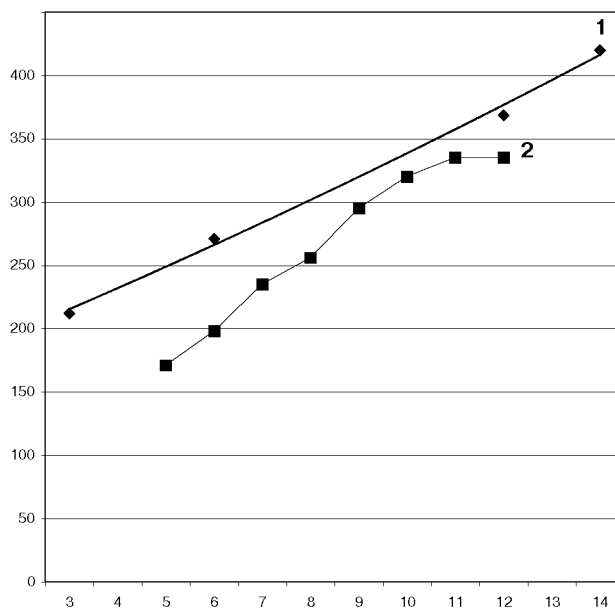
Для морфологических исследований крыс выводили из эксперимента под эфирным наркозом в сроки: 7, 45, 180 и 270 сут (без учета времени реабилитации) путем вскрытия грудной и брюшной полости. В качестве контроля были использованы крысы, проживающие в питомнике Рапполово, в возрасте 3, 6 и 12 мес (серия «С.-Петербург»). Как в эксперименте, так и в контроле исследованы по 6 животных в каждой возрастной группе. Для электронно-микроскопического анализа образцы печени фиксировали в смеси глутар- и параформ-альдегидов, дофигсировали четырехокисью осмия и заливали в эпон—аралдит. Базовые электронно-микроскопические и морфометрические исследования осуществляли в стационарных условиях после возвращения из экспедиций по общепринятым методам. Ультратонкие срезы печени изготавливали на ультратоме LKB-V (Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе JEM-100 SX (Япония). На электронных микрофотографиях, сделанных при увеличении 15 000, с использованием тестовой системы (решетки) определяли относительный объем митохондрий, гранулярной

и агранулярной эндоплазматической сети (ЭПС) и гранул гликогена, а также численную плотность митохондрий. В каждой серии животных исследовали не менее 80 гепатоцитов. Статистическую обработку морфометрических данных выполняли с помощью компьютерной программы «Statistica». Различия считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. Транспортировка крыс (2-месячное океанское плавание) сопровождалась снижением массы их тела по сравнению с контрольными данными (группа «С.-Петербург»). К началу наблюдений на Антарктическом материке 5-месячные крысы имели пониженную массу по сравнению с 3-месячными контрольными животными (171 ± 7 г против 212 ± 8 г) и эта тенденция сохранилась до конца эксперимента (рисунок).

Электронно-микроскопическое морфометрическое исследование гепатоцитов крыс, содержащихся в обсерватории «Мирный», показало, что в первый срок наблюдений (7 сут) численная и объемная плотности митохондрий в гепатоцитах резко снижены относительно контроля (таблица). Во многих митохондриях наблюдаются признаки набухания. Гранулярная ЭПС расширена и представлена преимущественно одиночными цистермами. Лишь изредка цистерны пакетированы. Относительный объем гранулярной ЭПС значительно уменьшен, а агранулярной ЭПС, напротив, — увеличен. Резервы гликогена в гепатоцитах находятся на уровне контрольных значений (см. таблицу).

Спустя 1,5 мес, т.е. после 45 сут пребывания животных в прибрежном регионе Антарктиды, по большинству морфометрических параметров отмечена тенденция к нормализации ультраструктуры гепатоцитов по сравнению с предыдущим сроком (см. таблицу). При этом на фоне значительного увеличения относительного объема митохондрий существенно сниженным по сравне-



Динамика массы тела белых крыс в разные сроки их пребывания в обсерватории «Мирный».

1 — крысы, проживавшие в питомнике Рапполово (серия «С.-Петербург»); 2 — крысы, находившиеся в обсерватории «Мирный» в Антарктиде (опыт). По оси абсцисс — возраст животных (мес); по оси ординат — масса животных (г).

нию с контролем оставался показатель их численной плотности. Объемные показатели гранулярной ЭПС имели тенденцию к повышению, а агранулярной ЭПС — к снижению и оказались сопоставимыми с контрольными данными. Содержание гликогена практически не изменилось. Однако животные по-прежнему отставали от контроля по экстерьерному показателю — массе тела.

Спустя 180 сут пребывания животных в обсерватории «Мирный» большинство морфометрических показателей гепатоцитов, за исключением агранулярной ЭПС, достигло контрольных значений, соответствующих показателям 12-месячных

Морфометрические показатели ультраструктур гепатоцитов в разные сроки адаптации к экстремальным условиям побережья Антарктиды ($\bar{x} \pm s_x$)

Место содержания животных	Сроки эксперимента	Относительный объем митохондрий (%)	Численная плотность митохондрий	Относительный объем (%)		
				гранулярной эндоплазматической сети	агранулярной эндоплазматической сети	гранул гликогена
Санкт-Петербург (контроль)	3 мес	$15,2 \pm 0,9$	$6,9 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,3$	$2,86 \pm 0,28$	$14,3 \pm 1,2$
	6 мес	$19,5 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,3$	$5,78 \pm 0,29$	$2,73 \pm 0,27$	$16,7 \pm 1,3$
	12 мес	$21,2 \pm 0,9$	$5,41 \pm 0,28$	$4,46 \pm 0,26$	$4,1 \pm 0,3$	$13,7 \pm 1,3$
Обсерватория «Мирный»	7 сут	$15,4 \pm 0,8^*$	$4,2 \pm 0,3^*$	$3,49 \pm 0,28^*$	$4,4 \pm 0,3^*$	$17,6 \pm 1,5$
	45 сут	$18,7 \pm 0,8^x$	$3,97 \pm 0,28^*$	$4,6 \pm 0,3$	$3,47 \pm 0,26$	$16,1 \pm 1,5$
	180 сут	$21,4 \pm 1,2$	$4,9 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,4^x$	$14,2 \pm 1,4$
	270 сут	$20,2 \pm 1,4$	$4,01 \pm 0,27^+$	$3,08 \pm 0,26^+ \ x$	$4,0 \pm 0,3$	$11,3 \pm 1,1$

* Различия значимы по сравнению с 6-месячными животными «С.-Петербург»; + различия значимы по сравнению с 12-месячными животными «С.-Петербург»; x различия значимы по сравнению с предыдущим сроком данного эксперимента.

животных группы «С.-Петербург». Значительно увеличилась к этому времени и масса животных, но она по-прежнему отставала от соответствующего возрастного контроля.

В конце эксперимента у животных, находившихся в условиях прибрежного региона Антарктиды 270 сут, выявлена отрицательная тенденция по всем морфометрическим параметрам гепатоцитов. При этом показатели численной плотности митохондрий и относительного объема гранулярной ЭПС снизились как по сравнению с таковыми предыдущего срока, так и контроля (12-месячные крысы группы «С.-Петербург»).

Обсуждение полученных данных. Анализ результатов морфометрического исследования ультрамикроскопической организации гепатоцитов в условиях длительного пребывания животных в Антарктиде на прибрежной станции «Мирный» позволили выявить ряд закономерностей в динамике структурно-функциональных преобразований, характеризующих особенности адаптивного процесса на субклеточном уровне при воздействии на организм дестабилизирующих факторов антарктического материка.

Так, начальный период пребывания животных на станции «Мирный» характеризуется наиболее выраженными изменениями морфометрических параметров гепатоцитов, свидетельствующими о резком снижении энергетического потенциала клеток и угнетении их белоксинтезирующей функции (снижение относительного объема и численной плотности митохондрий, редукция гранулярной ЭПС, изменение соотношения гранулярной и агранулярной ЭПС в пользу последней). Уменьшение гранулярного компонента эндоплазматической сети клеток является, как правило, признаком подавления синтеза рибосомальной РНК и снижения белоксинтезирующего потенциала гепатоцитов [5, 7]. Подобная картина отражает катаболическую направленность обмена веществ в клетке и органе в целом и характерна для состояния стресса [7, 8]. Есть основания полагать, что эти изменения связаны не только с влиянием на организм дестабилизирующих факторов Антарктиды (резкие перепады атмосферного давления, магнитные возмущения, уровень космического излучения, низкая влажность, извращенная сезонная периодика), но и с длительной, в течение 2 мес, морской транспортировкой животных в условиях, близких к экстремальным. Некоторые исследователи [16] рекомендовали после трансконтинентальной транспортировки 2–3-суточный реабилитационный период. Однако, по мнению Van Ruiven и соавт. [17], срок реабилитации дол-

жен быть более продолжительным. Несмотря на то, что в нашем эксперименте срок реабилитации был увеличен до 15 сут, полученные данные свидетельствуют, что и этот отрезок времени, по-видимому, оказался недостаточным для реабилитации. Это подтверждается и ухудшением экстерьерных показателей животных: по прибытии к берегам Антарктиды и до конца эксперимента их масса значительно отставала от показателей контрольных одновозрастных крыс (серия «С.-Петербург») (см. рисунок).

Спустя 45 сут пребывания животных на антарктическом материке отмечена отчетливая тенденция к нормализации таких важных показателей, как относительные объемы митохондрий, гранулярной и агранулярной ЭПС, имеющая адаптационный характер. Тем не менее, низкие, по сравнению с контролем, значения численной плотности митохондрий, а следовательно, и количества митохондриальных мембран, с которыми связывают окислительную способность тканей [7, 9, 13], свидетельствуют о незавершенности адаптационных процессов, т. е. о состоянии структурно-функционального напряжения.

Лишь спустя 180 сут эксперимента все показатели внутриклеточных компартментов достигли контрольных значений, что можно оценить как состояние завершенной адаптационной внутриклеточной реорганизации гепатоцитов.

Однако, как свидетельствует анализ морфометрических данных последнего срока эксперимента, 270-суточное пребывание животных в суровых условиях антарктического материка сопровождалось повторным, резким снижением численной плотности митохондрий и относительного объема гранулярной ЭПС, и не только по сравнению с таковыми в предыдущий срок эксперимента, но и с контрольными данными, означающими дальнейшее истощение внутриклеточных регенераторно-пластических резервов.

Полученные нами экспериментальные данные согласуются с результатами физиологических исследований на участниках Антарктических экспедиций. Действительно, по мнению ряда авторов, признаки разбалансирования функциональных и гормональных систем, характерные для состояния напряжения организма сохраняются у полярников довольно длительное время, даже до 14 мес пребывания их на антарктическом материке [6, 14, 15].

Таким образом, при морфометрическом анализе изменений ультраструктурной организации гепатоцитов белых крыс в течение длительного пребывания их на антарктическом материке отчетливо прослеживаются 3 периода внутрикле-

точной реструктуризации гепатоцитов, отражающие особенности их реакции на дестабилизирующие факторы прибрежного региона Антарктиды.

1-й период — состояние структурно-функционального напряжения — характеризуется нарушением внутриклеточного гомеостаза, обусловленным снижением энергетических и особенно белокпродуцирующих потенциалов гепатоцитов в результате стресса, вызванного длительной транспортировкой животных и воздействием комплекса экстремальных климатогеографических факторов.

2-й период — состояние стабилизации (адаптации) — характеризуется адаптивной компенсацией энергетических и пластических резервов гепатоцитов и восстановлением их структурного гомеостаза.

3-й период — состояние дестабилизации (деадаптации) — характеризуется истощением энергетических и пластических потенциалов клеток, означающим срыв адаптационных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Астахов О.Б. Динамика морфометрических показателей яичек крыс при адаптации к высокогорью Антарктиды и последующей деадаптации. *Арх. анат.*, 1990, т. 99, вып. 12, с. 17–19.
- Вашенков В.М., Клонов В.П. и Яковлев В.А. Состояние иммунной системы полярников в Антарктиде. *Антарктика*, 1995, т. 33, с. 176–180.
- Гичев Ю.П. Роль печени в стрессорных реакциях организма. *Успехи физиол. наук*, 1990, т. 21, № 1, с. 23–46.
- Максимов А.Л. и Белкин В.Ш. Характеристика адаптации человека в высокогорье Центральной Азии и Антарктиды. *Физиология человека*, 2002, т. 28, № 6, с. 6–12.
- Молодых О.П., Лушникова Е.Л., Клиникова М.Г. и Непомнящих Л.М. Внутриклеточная реорганизация гепатоцитов при воздействии доксорубина. *Бюл. exper. биол.*, 2006, т. 141, № 5, с. 579–585.
- Сороко С.И., Матусов А.Л. и Сидоров Ю.А. Адаптация человека к экстремальным условиям Антарктиды. *Физиология человека*, 1984, т. 10, № 6, с. 907–920.
- Шкурूपий В.А. Ультраструктура клеток печени при стрессе. Новосибирск, Наука, 1989.
- Шмерлинг М.Д., Бузуева И.И., Филюшина Е.Е. и Сагдиева Ш.С. Особенности ультраструктурной реакции мышечных волокон и гепатоцитов адаптированных к холоду животных на острое охлаждение. *Бюл. СО РАМН*, 1997, № 1, с. 113–117.
- Barre H., Bailly L. and Rouanet J. Increased oxidative capacity in skeletal muscles from cold-acclimated ducklings: A comparison with rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1987, v. 88B, № 2, p. 579–582.
- Belkin V., Astakhov O., Buzueva I. et al. Morphophysiological status of albino rats during prolonged stay in the coastal and highland regions of the Antarctic. *Baltic J. Lab. Anim. Sci.*, 2002, v. 12, p. 200–213.
- Belkin V. and Karasik D. The effect of season occupation and repeated wintering on anthropologic and physiological characteristics in Russian Antarctic staff. *Int. J. Circumpolar Health*, 2000, v. 60, p. 41–51.
- Farrace S., Ferrara M., De Angelis C. et al. Reduced sympathetic outflow and adrenal secretory activity during a 40-day stay in the Antarctic. *Int. J. Psychophysiol.*, 2003, v. 49, № 1, p. 17–27.
- Goglia F., Lanni A., Duchamp C. et al. Effect of cold acclimation on oxidative capacity and respiratory properties of the liver and muscle mitochondria in ducklings. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, v. 106, № 1, p. 95–101.
- Harinath K., Malhotra A., Pal K. et al. Autonomic nervous system and adrenal response to cold in man at Antarctica. *Wilderness Environ. Med.* 2005, v. 16, № 2, p. 81–91.
- Sawhney R., Malhotra A., Nair C. et al. Thyroid function during a prolonged stay in Antarctica. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 1995, v. 72, № 1–2, p. 127–133.
- Toth L. and January B. Physiological stabilization of rabbits after shipping. *Lab. Anim. Sci.*, 1990, v. 40, № 4, p. 384–387.
- Van Ruiven R., Meijer G.W., Wiersma A. et al. The influence of transportation stress on selected nutritional parameters to establish the necessary minimum period for adaptation in rat feeding studies. *Lab. Anim.* 1998, v. 32, № 4, p. 446–56.

Поступила в редакцию 27.04.08

MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION OF HEPATOCYTES DURING ADAPTATION TO EXTREME ANTARCTIC FACTORS

M.D. Shmerling, V.Sh. Belkin, Ye.Ye. Filiushina, O.B. Astakhov, I.I. Buzuyeva and V.V. Veryaskin

The dynamics of ultrastructural changes in the hepatocytes of albino rats after prolonged influence of extreme Antarctic factors had been studied using the morphometric method. It was found that at the early stage of the experiment (7–45 days) the intracellular homeostasis in the hepatocytes was disturbed owing to a pronounced decrease in energy sources and plastic reserves (the decrease in numerical and volume density of the mitochondria, the reduction of the rough endoplasmic reticulum volume and the dilatation of its cisterns, the increase in the volume of the smooth endoplasmic reticulum). The following stages (up to 180 days) were characterized by a practically complete restoration of energy-plastic potential of the hepatocytes; at the conclusive stage of the experiment (270 days) the exhaustion of energy and, especially, of plastic reserves of the hepatocytes was noted (the significant decline in numerical density of the mitochondria and the relative volume of the rough endoplasmic reticulum).

Key words: *hepatocytes, ultrastructure, extreme factors, Antarctic Continent.*

Laboratory of electron microscopy, SB RAMS Scientific Research Institute of Physiology, Novosibirsk; Department of Human Anatomy, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk; Department of Anatomy and Anthropology, Tel-Aviv University, Israel.