В. В. Бойко, П. Н. Замятин, О. Ф. Невзорова, В. П. Невзоров, П. Ф. Щапов, Д. П. Замятин, Н. С. Черняев

ГУ «Институт общей и неотложной хирургии НАМН Украины», г. Харьков

© Коллектив авторов

ДИНАМИКА ДЕФОРМАЦИОННЫХ ТРАНСФОРМАЦИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Резюме. В работе представлена динамика деформаций внутриклеточных мембран, активности синтетических и репаративных внутриклеточных процессов в гепатоцитах, а также ультраструктурных изменений гепатоцитов после экспериментального моделирования травмы у крыс.

Ключевые слова: эксперимент, травма печени, ультраструктура гепатоцитов, процессы репарации, деформация мембран.

Введение

В структуре пострадавших, по данным большинства авторов, повреждения печени при абдоминальной травме встречается в 66–85 % случаев [1, 6, 11]. В современных условиях изолированные повреждения печени встречаются редко, но и они характеризуются высокой летальностью – от 21,6 % до 77,7 % [8].

Среди травм паренхиматозных органов брюшной области повреждения печени занимают первое место и являются наиболее сложным для диагностики и лечения [3].

Печень относится к органам, которые наиболее часто повреждаются при абдоминальной травме, однако их диагностика остается одной из наиболее трудных и актуальных проблем ургентной хирургии. Подтверждением этому является тот факт, что ошибки диагностики и определения показаний к хирургическим вмешательствам достигают 50 %, что приводит к большому числу летальных исходов и тяжелым послеоперационных осложнениям [12].

Посттравматические изменения в паренхиме печени, как и любой патологический процесс, начинают развиваться на субмикроскопическом уровне. Именно там прослеживаются тонкие повреждения органелл, которые клинически не проявляются, однако накопление повреждений внутриклеточных мембран и органелл могут привести к необратимым нарушениям в ткани травмированной печени [4].

Изучение динамики развития патологических процессов после травматического повреждения органа можно использовать для превентивной и послеоперационной коррекции с учётом нарушения метаболических, синтетических и репаративных процессов на клеточном уровне [2, 5, 9, 10].

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на белых крысах линии «Вистар» обоего пола с массой 200-250 г. Травму печени воспроизводили наркотизированным тиопенталом натрия крысам специальным устройством для нанесения травм мелким лабораторным животным с дозировкой силой удара после лапаротомии [7].

Забор кусочков печени производили через 1 час либо в 1, 3, 7, 14 и 21 сутки после травмы.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки ткани печени помещали для предварительной фиксации в 2-4 % забуференный раствор глютарового альдегида на 4-6 часов при температуре 4 °C. Затем ткань промывали в буферном растворе и переносили для окончательной фиксации в 1 % забуференный раствор четырехокиси осмия на 3-4 часа. Обезвоживание проводили в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Ткань пропитывали и заливали в смесь эпоксидных смол (эпон-аралдит) по общепринятым методикам. Полимеризацию блоков проводили в термостате при температуре 60 °C в течение двух суток.

Из полученных блоков на ультрамикротоме УПТП-3М изготовляли ультратонкие срезы, монтировали их на электролитические сеточки и после контрастирования цитратом свинца и уранилацетатом исследовали под электронным микроскопом ЭМВ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Контролем качества гистологической обработки ткани служили кусочки ткани печени интактных животных, взятые тотчас после лапаротомии.

Статистические выводы сделаны на основании данных, полученных при использовании стандартных статистических методов [4].

Результаты исследований и их обсуждение

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктурной организации гепатоцитов и звёздчатых макрофагоцитов интактных животных показало адекватность выбранной методики гистологической обработки материала: субмикроскопическое строение этих клеток соответствовало современным представлениям, а разрушение мембранных структур отсутствовало.

Через 1 час после травмы в печеночных клетках, взятых из зоны непосредственно прилежащей к области нанесения удара, наблюдались изменения ультраструктуры гепатоцитов, характерные для напряжённости метаболических процессов. Наблюдалось умеренное просветление матрикса ядра. Перинуклеарные пространства были умеренно и неравномерно расширены. Цитоплазма гепатоцитов просветлена и имела низкую электронную плотность. В ней выявлялись многочисленные рибосомы, полисомы и гранулы гликогена.

Митохондрии гепатоцитов набухшие, кристы укорочены и дезорганизованы. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума расширены, а содержимое цистерн электронно-прозрачно (рис. 1-а, б).

Из рис. 1 видно, что количество деформаций мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрий и ядра увеличива-

ется. Пластический цитоплазматический комплекс Гольджи умеренно гипертрофирован.

В цитоплазме звездчатых макрофагоцитов большое количество рибосом, полисом, включений липидов и фагоцитированного материала. Гранулярный эндоплазматический ретикулум развит хорошо. Ядра звёздчатых макрофагоцитов имели типичную форму и содержали деконденсированный хроматин. Ядерная мембрана чётко контурирована, без очагов деструкции. Митохондрии содержали большое количество крист, матрикс имел мелко гранулярную структуру и среднюю электронную плотность. Цитоплазматическая мембрана не содержала очагов разрыхления и зачастую образовывала микроворсинки.

Ядерная и цитоплазматическая мембраны подвергаются множественным деформациям. Так, через сутки после моделирования травмы и её хирургической коррекции дистрофические нарушения органелл гепатоцитов переходят в деструктивную фазу (рис. 2 a, б).

Ядра гепатоцитов приобретают электронно-прозрачный матрикс, ядерная мембрана подвержена разрыхлению. Перинуклеарные



Рис 1. Ультраструктура клеток печени крыс через 1 час после травматического повреждения органа: а – набухание митохондрий и расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети гепатоцитов. × 34000; б – увеличение числа рибосом и полисом в цитоплазме звёздчатых макрофагоцитов. × 42000



Рис 2. Ультраструктура клеток печени крыс через сутки травматического повреждения печени: а – лизис наружных мембран и крист митохондрий гепатоцитов. Увелич. × 33000; б – крупные аутофагосомы в цитоплазме гепатоцитов. Увелич. × 37000

пространства сильно и заполнены электронно-прозрачным веществом.

Матрикс митохондрий просветлён и содержит разрушенные кристы и очаги лизиса наружных мембран.

Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума сильно расширены, количество связанных с его мембранами рибосом снижено. Существенно снижается количество деформированных мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, пластинчатого комплекса Гольджи и митохондрий. В цитоплазме располагалось небольшое количество свободных рибосом, полисом и гранул гликогена.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи умеренно редуцирован. Параллельная ориентация его гладких мембран нарушена. В области локализации пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи обнаруживались крупные вторичные лизосомы.

На мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулума локализовались многочисленные рибосомы. В цитоплазме звездчатых макрофагоцитов обнаруживались вторичные лизосомы с фрагментами фагоцитированных мембранных стриктур. Митохондрии содержали большое количество крист и мелкозернистый матрикс. Ядерная мембрана образовывала неглубокие инвагинации.

На третьи сутки после моделирования травмы сохранялись изменения, описанные выше. Однако наблюдалось появление очагового разрушения внутриклеточных мембранных структур гепатоцитов (рис. 3-а, б).

Хроматин ядра находился в деконденсированном состоянии. Перинуклеарные пространства расширены. Ядерная мембрана гладкая без участков деформаций. Матрикс митохондрий приобретает грубо волокнистое строение. Кристы дезорганизованы с очагами лизиса. Цистерны гранулярной эндоплазматической сети вакуолизированы (рис. 3а).

В отдельных гепатоцитах наблюдалась фрагментация мембран эндоплазматического ретикулума. Мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума сглажены, цистерны приобретают округлую форму. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи незна-







Рис. 4. Ультраструктура клеток печени крыс через 7 суток после травматического повреждения печени: а — вакуолизация цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума гепатоцитов. × 34000; б — гипертрофия пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи гепатоцитов. × 38000

чительно редуцирован и представлен небольшим количеством дезорганизованных гладких мембран и крупных электронно-прозрачных вакуолей. В цитоплазме присутствовали многочисленные первичные и вторичные лизосомы, а также липидные включения (рис. 3 б).

Существенных изменений ультраструктурной организации звездчатых макрофагоцитов печени не выявлено. Органеллы этих клеток развиты хорошо. В цитоплазме выявлялись многочисленные рибосомы, полисомы и включения фагоцитированного материала. Внутриклеточные мембраны подвержены очаговой деформации.

На 7 сутки после моделированной травмы в субмикроскопической организации гепатоцитов обнаруживались признаки активации репаративных внутриклеточных процессов (рис. 4-а, б).

Существенно снижается степень просветления матрикса ядра. Очаги лизиса ядерной мембраны отсутствуют, она становится четко контурированной. Митохондрии гепатоцитов умеренно набухшие, содержат большое количество крист, наружная мембрана без очагов деструкции, матрикс мелкозернистый, умеренной электронной плотности. В отдельных гепатоцитах обнаруживаются делящиеся формы митохондрий и митохондрии подвержены деформации.

Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума расширены и представляли собой электронно-прозрачные вакуоли различной формы и размеров, на мембранах выявляются многочисленные рибосомы (рис. 4 а).

Мембраны его имеют многочисленные деформации. В цитоплазме возрастает количество свободных полисом, рибосом и гранул гликогена.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи умеренно гипертрофирован, вокруг его мембран много мелких вакуолей, заполненных субстанцией различной электронной плотности (рис. 4 б).

На 14 сутки после моделирования травмы печени субмикроскопическая архитектоника гепатоцитов и эндотелиоцитов синусоидных капилляров восстанавливается. Характерным для этого срока наблюдения, является гиперплазия мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, множественные очаги деформации его мембран, а также увеличение количества связанных рибосом. В цитоплазме возрастает число свободных полисом, рибосом и гранул гликогена (рис. 5).

Ультраструктурная организация звездчатых макрофагоцитов печени крыс на 14 сутки после травмы практически не отличалась от таковой у интактных животных. Субмикроскопическая организация после травмы к 21 суткам представлена на рис. 6.



Рис. 5. Ультраструктура гепатоцитов печени крыс через 14 суток после хирургической коррекции травматического повреждения печени. Гиперплазия мембран гранулярной эндоплазматической сети. × 35000



Рис. 6. Ультраструктура гепатоцитов печени крыс через 21 сутки после хирургической коррекции травматического повреждения печени. Типичная ультраструктура гепатоцитов. × 28000

К 21 суткам эксперимента ядра гепатоцитов содержали деконденсированный хроматин. Субмикроскопическая организация митохондрий, эндоплазматического ретикулума и пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи имела типичное для этих клеток строение. В цитоплазме гепатоцитов содержалось большое количество гранул гликогена, рибосом и полисом.

Таким образом, анализ состояния субмикроскопической архитектоники гепатоцитов укладывается в схему установленного нами феномена, заключающегося в высокой функциональной активности внутриклеточных мембранных структур, сопровождающейся увеличением количества деформаций мембран ядра, эндоплазматической сети, митохондрий и плазмолеммы. Исходя из этого, становится понятной наблюдаемая активация органелл гепатоцитов, которая сопровождается увеличением деформаций внутриклеточных мембранных комплексов.

Выводы

Через один час после травматического повреждения в гепатоцитах наблюдается повышение метаболической активности органелл гепатоцитов с повышением числа деформаций их мембран, что объясняется развитием компенсаторно-адаптационных процессов.

Максимально выраженные дистрофические и деструктивные изменения ультраструктурных компонентов гепатоцитов развиваются на 3 сутки после экспериментального моделирования травмы, что структурно подтверждается уменьшением числа деформаций и многочисленными очагами деструкции мембран ядра, митохондрий, эндоплазматической сети, а также редукцией пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи и появлением в цитоплазме гепатоцитов вторичных лизосом и включений липидов.

Седьмые сутки характеризуются нарастанием активности синтетических и репаративных внутриклеточных процессов и увеличением количества деформаций мембран гепатоцитов, что подтверждается наблюдаемой гиперплазией мембран гранулярной эндоплазматической сети, появлением делящихся форм митохондрий, гипертрофией пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи, увеличением числа рибосом и гранул гликогена.

К концу эксперимента ультраструктура гепатоцитов и звездчатых макрофагоцитов приобретают типичное строение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ клинических данных в медицинских исследованиях на основе методов вычислительного интеллекта / В. В. Бойко [и др.]. – Х., ТО Эксклюзив, 2008. – 121 с.

2. Гистологические и гистохимические исследования как основы изучения патогенеза и танатогенеза при травматической болезни. Лабораторные методы исследования в судебной медицине и задачи судебномедицинской науки и практики по их совершенствованию: мат. VIII Всерос. пленума судебных медиков / М. Н. Алиев. – Ижевск, 1994. – С. 40-42.

3. Замятін П. М. Хірургічна тактика у постраждалих з політравмою при домінуючому ушкодженні паренхіматозних органів черевної порожнини / П. М. Замятін // Шпитальна хірургія. – 2004. – № 4. – С. 164-166.

4. Замятин П. Н. Ультраструктурные изменения клеток печени при полиорганной недостаточности в модели травматического шока и политравмы / П. Н. Замятин, О. Ф. Невзорова, В. П. Невзоров /Медицина сегодня и завтра. – 2004. – № 1. – С. 25-28.

5. Изменения электрических параметров клеточных мембран биологических тканей при механических факторных влияниях / В. В. Бойко, П. Н. Замятин, В. И. Жуков [и др.] // Харківська хірургічна школа. — 2012. — № 5 (56). — С. 9-11.

6. Павловський М. П. Травматичні ушкодження паренхімних органів черевної порожнини: хірургічні аспекти / М. П. Павловський, І. Р. Трутяк, І. Д. Герич // Одеський медичний журнал. – 2004. – № 4. – С. 60-62.

7. Патент 6548 Україна, МПК 7 G09B23/28, A61B17/00. Пристрій для відтворювання політравми / П. М Замятін, Г. І. Каплін, О. Л. Чернов. — Заявл. 27.09.04; Опубл. 16.05.05; Бюл. №5.

8. Политравма : руководство для врачей. В 2-х томах (издание 2-е, дополненное). Т.2. / под ред. проф. В. В. Бойко и П. Н. Замятина. – Х.: Фактор, 2011. – 688 с.

9. Современные аспекты диагностики и хирургического лечения повреждений печени / В. В. Бойко, П. Н. Замятин, А. Г. Краснояружский [и др.] // Харківська хірургічна школа. – 2010. – № 6 (1) – С. 73-75.

10. Ультраструктура клеток печени кроликов с моделированным компрессионным синдромом / В. В. Бойко, А. Г. Краснояружский, В. П. Невзоров [и др.] // Харківська хірургічна школа. – 2009, – №4 (38). – С. 45-49.

11. Хирургия повреждений печени / В. В. Бойко, П. Н. Замятин, Н. Н. Удербаев [и др.], – Х., «Торсинг», 2007. – 240 с.

12. Hemostatic Methods for the Management of Spleen and Liver Injuries / S. Uranus, H. J. Mischinger, J. Pfeifer [et al.] // World J. Surg. – 1996. – Vol.20, №8. – P. 1107-1112.

ДИНАМІКА ДЕФОРМАЦІЙНИХ ТРАНСФОРМАЦІЙ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ МЕМБРАН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ МОДЕЛЮВАННІ ТРАВМАТИЧНИХ УШКОДЖЕНЬ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

В. В. Бойко, П. М. Замятін, О. Ф. Невзорова, В. П. Невзоров, П. Ф. Щапов, Д. П. Замятін, Н. С. Черняєв

DYNAMICS OF DEFORMATION TRANSFORMATIONS OF INTRACELLULAR MEMBRANES AT EXPERIMENTAL MODEL OF TRAUMATIC INJURIES OF THE LIVER OF RATS

V. V. Boyko, P. N. Zamyatin, O. F. Nevzorov, V. P. Nevzorov, P. F. Shchapov, D. P. Zamyatin, N. S. Chernyaev **Резюме.** У роботі представлено динаміку деформацій внутрішньоклітинних мембран, активності синтетичних і репаративних внутрішньоклітинних процесів у гепатоцитах, а також ультраструктурних змін гепатоцитів після експериментального моделювання травми у щурів.

Ключові слова: експеримент, травма печінки, ультраструктура гепатоцитів, процеси репарації, деформація мембран.

Summary. In work dynamics of deformations of intracellular membranes is presented, to activity of synthetic and reparative intracellular processes in hepatocytes, and also ultrastructural changes hepatocytes after experimental model of a trauma at rats.

Key words: *experience, injury of a liver, ultrastructure hepatocytes, reparation processes, deformation of membranes.*