

УДК: 616.36-018.1-06:616.381-002-021.4]-07-092.9

Волошина О.В., Григоренко А.С., Донець І.М

МЕТОДИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ АСЕПТИЧНОМУ ПЕРИТОНІТІ

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Основну частину властивих функцій печінки виконують клітини гепатоцити, які становлять 80% усіх клітин печінки. Гепатоцити відповідальні за синтез, розщеплення і зберігання великої кількості різних речовин. Вони відіграють центральну роль у вуглеводному, і жировому обміні всього організму, виробляють більшу частину білків, що втримуються в плазмі крові, зберігають зв'язок з просвітом кишечника та через систему дрібних каналців виділяють у кишечник відходи метаболізму і емульгуючу речовину – жовч, яка полегшує усмоктування жирів. Враховуючи вагомі функціональні особливості гепатоцитів, метою нашого дослідження є розробка експериментальної моделі асептичного запалення у тварин з можливою корекцією ушкоджених гепатоцитів кріоконсервованою плацентою. Матеріали і методи. Експерименти на тваринах проведені відповідно до „Загальних принципів експериментів на тваринах”, схваленими V Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2013) і погодженими з положеннями „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей” (Страсбург, 1986), а також Законом України №3447-IV від 21.06.2006 року „Про захист тварин від жорстокого поводження” та Гельсінською декларацією про гуманне відношення до тварин. Робота виконувалася на 140 статевозрілих щурах – самцях лінії „Вістар”, масою 180-200г. Тварини були розділені на чотири групи: інтактна група (контроль) і три дослідні (по 45 тварин у кожній групі). Тваринам II групи вводили підшкірно кріоконсервовану плаценту за методом, розробленим в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків). У тварин III групи моделювали гострий експериментальний асептичний перитоніт шляхом введення внутрішньочеревно 5 мг л-карагінену (Sigma, США) в 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду на один тварину. Тваринам IV групи, у яких розвився гострий асептичний перитоніт, вводили підшкірно кріоконсервовану плаценту. Після евтаназії у тварин забирали шматочок печінки для морфологічного дослідження ділянки печіночної сполучнотканинної стромы, судин, печінкової триади, печінкових клітин – гепатоцитів. Вивчали кількість, вид і форму клітин, їх ядра, ядерце, цитоплазму, її колір, наявність глибок глікогену, Купферові клітини, їх величину, форму, ядра, цитоплазму. Морфологічне дослідження проводилося відповідно до загальногістологічних методів: виготовляли парафінові зрізи для вивчення стану гепатоцитів як в інтактних тварин, так і в умовах експерименту у всіх групах тварин в залежності від терміну експерименту. Висновки. Таким чином, застосовані експериментальні методи дозволили моделювати гострий асептичний процес у черевній порожнині тварин. Реакція гепатоцитів можлива на будь-яке втручання в організм тварини, а також і на запальний процес, що нам покажуть морфологічні дослідження. Застосування шляхом оперативного втручання ККП дозволить нам одержати можливу корекцію структури гепатоцитів при подальшому вивченні морфологічних препаратів тканин печінки.

Ключові слова: гепатоцити, експеримент, асептичний перитоніт, кріоконсервована плацента, морфологія.

Вступ

Основну частину властивих функцій печінки виконують клітини гепатоцити, які становлять 80% усіх клітин печінки. Гепатоцити мають багатокутну форму, одне або два ядра. Ядра великі, сферичні з перевагою еухроматину і 1-2 ядерцями. Цитоплазма зерниста, містить численні мітохондрії, лизосоми, пероксисоми, ліпідні краплі, частки глікогену, добре розвинені аЕПС і грЕПС, множинні розосереджені елементи комплексу Гольджі [1;2].

Поверхня гепатоцитів характеризується наявністю зон з різною структурно-функціональною спеціалізацією та бере участь в утворенні комплексів міжклітинних з'єднань, жовчних капілярів, ділянок зі збільшеною поверхнею обміну між гепатоцитами і кров'ю.

Функціональна активність гепатоцитів проявляється в їхній участі в захопленні, синтезі, накопиченні та хімічному перетворенні різноманітних речовин, які надалі можуть виділятися в кров або жовч [1;2].

Печінка являє собою ендокринну залозу, то-

му що гепатоцити секретують жовч у жовчні капіляри, звідки вона відводиться по системі проток у кишку.

У цей час відоме, що печінка виділяє у кровотік декілька необхідних організму речовин, що підтверджує її ендокринну функцію. Слід зазначити, що як екзокринна, так і ендокринна функції забезпечуються тими самими спеціалізованими секреторними клітинами – гепатоцитами [1;2].

Усі перераховані функції печінки, зокрема гепатоцитів, а в цілому гепато-біліарної системи, визначають її необхідність для організму, його органів і тканин. По цьому порушенні функцій печінки, що виникають в силу різних причин (віруси, інтоксикації, кишковий дисбактеріоз, стреси і т.п.) приводять до істотних змін в окремих органах.

Гепатоцити відповідальні за синтез, розщеплення і зберігання великої кількості різних речовин. Вони відіграють центральну роль у вуглеводному і жировому обміні всього організму, виробляють більшу частину білків, що втримуються в плазмі крові, зберігають зв'язок з просвітом кишечника та через систему дрібних каналців

виділяють у кишечник відходи метаболізму і емульгуючу речовину – жовч, яка полегшує усмоктування жирів. До інших функцій гепатоцитів відносяться різні перетворення і сполучення одних з'єднань з іншими, що приводить до зменшення токсичності небезпечних речовин, які мають ту або іншу ушкоджуючу дію на тканини.

Багато речовин, починаючи з ліків, що випи-суються лікарем, і закінчуючи хімічними речовинами, що поглинаються з різних джерел, зазнають метаболічних перетворень і детоксикації гепатоцитами [2].

Враховуючи вагомі функціональні особливості гепатоцитів, метою нашого дослідження є розробка експериментальної моделі асептичного запалення у тварин з можливою корекцією ушкоджених гепатоцитів кріоконсервованою плацентою.

Матеріали і методи

Експерименти на тваринах проведені відповідно до „Загальних принципів експериментів на тваринах”, схваленими V Національним конгре-

сом по біоетиці (Київ, 2013) і погодженими з положеннями „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей” (Страсбург, 1986), а також Законом України №3447-IV від 21.06.2006 року „Про захист тварин від жорстокого поводження” та Гельсінською декларацією про гуманне відношення до тварин [3;4;5].

Результати і обговорення

Робота виконувалася на 140 статевозрілих щурах – самцях лінії „Вістар”, масою 180-200г. До початку експерименту тварин утримували в умовах віварію при природньому світловому режимі на стандартному раціоні ad libitum [6].

Експерименти, щоб уникнути впливу сезонних ритмів біологічної активності, проводилися в осінній період.

Тварини були розділені на чотири групи: інтактна група (контроль) і три дослідні (по 45 тварин у кожній групі), як показано в таблиці 1.

Таблиця 1
Розподіл тварин за групами та термінами експерименту

Групи досліджуваних тварин	Строки експерименту, доба										Усього тварин
	1	2	3	5	7	10	14	21	30		
I група (інтактні тварини)											5
II група (ККП)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
III група (ЕП)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
IV група (ОП+ККП)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
Усього	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	140

Як бачимо з таблиці, тварин інтактної групи було 5, в II, III і IV групах було по 45 тварин. Терміни експерименту були: 1, 2, 3, 7, 10, 14, 21 та 30 діб.

Тваринам II групи вводили підшкірно кріоконсервовану плаценту за методом, розробленим в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків) [7;8].

Кріоконсервовану плаценту (ККП) розморожували на водяній бані з дотриманням усіх умов асептики [13;14]. Трансплантацію плаценти робили під наркозом тіопенталу натрію в розрахунках 20 мг/кг (ПАТ Київ медпрепарат, Україна) на одну тварину та вводили його внутрішньочеревно.

Трансплантацію фрагмента ККП тваринам здійснювали під наркозом тіопенталу натрію в розрахунку 20 мг на 1 кг ваги тварини (ПАТ „Київмедпрепарат”, Україна). Препарат вводили внутрішньочеревно в дозі, яку виконували за формулою Ю.Р. Рыболовлева та Р.С. Рыболовлева [2;4;6]:

$$Дщ = r + Дл,$$

де Дщ – доза лікарського препарату для щурів;

Дл – доза лікарського препарату для людини;

r – коефіцієнт видової витривалості для щурів є 3,62;

R – коефіцієнт видової витривалості для людини складає 0,57.

Перед трасплантацією ККП готували операційне поле: вистригали шерсть в ділянці стегна,

обробляли шкіру 70° спиртом та 5% розчином йоду, відгороджували операційне поле стерильним матеріалом. Розріз шкіри робили довжиною 2 см, відсепарували шкіру з одного боку розрізу та моделювали підшкірну кишеню, в яку поміщали шматочок ККП розміром 0,5x0,5x0,5 см, потім рану ушивали вузлуватими швами та закривали асептичною пов'язкою [7;8].

У тварин III групи моделювали гострий експериментальний асептичний перитоніт шляхом введення внутрішньочеревно 5 мг λ-карагінену (Sigma, США) в 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду на одну тварину [9;10;11;12].

Для моделювання гострого асептичного запалення препарат вводили внутрішньочеревно за методикою І.П. Западнюка зі співавторами [2;3;9]: тварину фіксували вниз головою, черевну стінку брали в складку у нижній третині живота, проколювали її і вводили препарат.

Тваринам IV групи, у яких розвився гострий асептичний перитоніт, вводили підшкірно ККП за методом, описаним раніше для тварин II групи. Після етаназії у тварин забирали шматочок печінки для морфологічного дослідження ділянки печіночної сполучнотканинної стромы, судин, печінкової триади, печінкових клітин – гепатоцитів. Вивчали кількість, вид і форму клітин, їх ядер, ядерець, цитоплазму, її колір, наявність глибок глікогену, Купферові клітини, їх величину, форму, ядра, цитоплазму.

Морфологічне дослідження проводилося відповідно до загальногістологічних методів: виготовляли парафінові зрізи для вивчення стану гепатоцитів як в інтактних тварин, так і в умовах експерименту у всіх групах тварин (II, III, IV гр.) в залежності від терміну експерименту; методом виготовлення напівтонких зрізів, методом пластинації, методом електронної мікроскопії для виявлення ультраструктури гепатоцитів, їх ушкодження в умовах гострого запалення та можливої корекції криоконсервованою плацентою у тварин IV групи [13;14;16].

У подальшому забрані фрагменти печінки у інтактних тварин та в II, III і IV групах тварин підлягали морфологічним дослідженням за допомогою загальногістологічних методів: виготовили парафінові зрізи для вивчення різних морфологічних та структурних особливостей гепатоцитів. Метод підготовки напівтонких зрізів готувався для визначення гістотопографії гепатоцитів, комплексів міжклітинних з'єднань, які забезпечували міцний зв'язок та хімічні взаємодії гепатоцитів.

При виявленні показників для кожного визначали середнє значення (M), середнє квадратичне відхилення (σ), стандартну помилку середнього (m).

Вірогідність відмінностей кількісних результатів для різних груп визначалася за допомогою t-критерію Стюдента. Відмінності вважали статистично значущими при загальноприйнятій у медико-біологічних обстеженнях вірогідності помилки $p < 0,05$. Вірогідність помилки оцінювали за таблицями Стюдента.

Висновки

Таким чином, застосовані експериментальні методи дозволили моделювати гострий асептичний процес у черевній порожнині тварин. Реакція гепатоцитів можлива на будь-яке втручання на організм тварини, а також і на запальний процес, що нам покажуть морфологічні дослідження. Застосування шляхом оперативного втручання ККП дозволить нам одержати можли-

ву корекцію структури гепатоцитів при подальшому вивченні морфологічних препаратів тканин печінки.

Література

1. Быков В.Л. Частная гистология человека / В.Л. Быков – СПб: СОТИС, 1999. – 300 с.
2. Скрипник І.М. Клінічна гепатологія / І.М. Скрипник, Т.В. Мельник, М.М. Потяженко – Полтава: Дивосвіт, 2007. – 423 с.
3. Гельсінська Декларація Всесвітньої медичної асоціації // Морфологія. – 2010. – Т.4. – №2. – С. 65-68.
4. Різников О.Г. Загальноетичні принципи експериментів на тваринах / О.Г. Різников // І національний конгрес з біоетики. Ендокринологія. – 2003. – Т.8. – №1. – С. 142-145.
5. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 21 лют. 2006 р. №3447 – IV. Верховна Рада України. Офт. вид. // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – №7. – С. 230.
6. Западнюк І.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария; Изд. 3-е, перераб. и доп. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
7. Грищенко В.И. Влияние различных ресурсов низкотемпературного хранения на содержание гормонов в криоэкстракте плаценты / В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, Н.А. Волкова, О.А. Перчик // Проблемы криобиологии. – 2004. – №4. – С. 8-11.
8. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства и перспективы клинического применения / под ред. В.И.Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Харьков: СГД. Ф.Л. Бровин А.В, 2011. – 292 с.
9. Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности / Ю.Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. – 1979. – Т.247. – №6. – С. 1513-1516.
10. Бондаренко Т.Г. Трансплантация криоконсервированного эндокринного материала как метод коррекции различной патологии у экспериментальных животных / Т.Г. Бондаренко, И.М. Алабедаль-Карим, Г.А. Божок [и др.]. // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15. – №3. – С. 393-397.
11. Shinde V. Effects of human placental extract on age related antioxidant enzyme status in D-galactose treated mice / V. Shinde, K. Dhuewal, A.R. Paradkar, K.R. Mahadik // Pharmacogonyonlins. – 2007. – Vol. 1. – P. 252-261.
12. Umopathy E. An experimental evaluation of Albuca setosa aqueous extract on membrane stabilization protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. / E. Umopathy, E.I. Ndebia, F. Meeme // Journal of Medicinal Plants Research. – 2010. – Vol. 4(9). – P. 789-795.
13. Карупа В.Я. Электронная микроскопия / Карупа В.Я. – К.: Вища школа, 1984. – 208 с.
14. Ноздрачев А.Д. Анатомия крысы / Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. – СПб: Лань, 2001. – 464 с.
15. Свидетельство о рационализаторском предложении №1882; Способ наклейки полутонких срезов на предметное стекло. / Старченко И.И., Ерошенко Г.А.; заявл. 07.09.1999; опубл. 15.09.1999.
16. Свидетельство о рационализаторском предложении №1880; Способ окрашивания полутонких срезов / Старченко И.И., Ерошенко Г.А., Козакова Е.С. заявл. 07.09.1999; опубл. 15.09.1999.

Реферат

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ АСЕПТИЧЕСКОМ ПЕРИТОНИТЕ

Волошина Е.В., Григоренко А.С., Донец И.Н.

Ключевые слова: гепатоциты, эксперимент, асептический перитонит, криоконсервированная плацента, морфология.

Основную часть свойственных печени функций выполняют клетки гепатоциты, которые составляют 80% всех клеток печени.

Гепатоциты ответственны за синтез, расщепление и хранение большого количества разных веществ. Они играют центральную роль в углеводном и жировом обмене всего организма, вырабатывают большую часть белков, содержащихся в плазме крови, сохраняют связь с просветом кишечника и через систему мелких канальцев выделяют в кишечник отходы метаболизма и эмульгирующее вещество – желчь, которая облегчает всасывание жиров.

Учитывая весомые функциональные особенности гепатоцитов, целью нашего исследования является разработка экспериментальной модели асептического воспаления у животных с возможной коррекцией поврежденных гепатоцитов криоконсервированной плацентой. Материалы и методы. Эксперименты на животных проведены согласно «Общим принципам экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), а также Законом Украины №3447-IV от

21.06.2006 года «О защите животных от жестокого обращения» и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Работа выполнялась на 140 половозрелых крысах-самцах линии «Вистар», массой 180-200г. Животные были разделены на четыре группы: интактная группа (контроль) и три опытных (по 45 животных в каждой группе). Животным II группы вводили подкожно криоконсервированную плаценту по методу, разработанному в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков). У животных III группы моделировали острый экспериментальный асептический перитонит путем введения внутривнутрибрюшинно 5 мг λ -карагинена (Sigma, США) в 1 мл изотонического раствора натрия хлорида на одного животного. Животным IV группы, у которых развился острый асептический перитонит, вводили подкожно криоконсервированную плаценту. После эвтаназии у животных забирали кусочек печени для морфологического исследования части печеночной соединительнотканной стромы, сосудов, печеночной триады, печеночных клеток – гепатоцитов. Изучали количество, вид и форму клеток, их ядер, ядрышек, цитоплазму, ее цвет, наличие глыбок гликогена, Купферовы клетки, их величину, форму, ядра, цитоплазму. Морфологическое исследование проводилось согласно общегистологическим методам: изготавливали парафиновые срезы для изучения состояния гепатоцитов как у интактных животных, так и в условиях эксперимента во всех группах животных в зависимости от сроков эксперимента. Выводы. Таким образом, использованные экспериментальные методы позволили моделировать острый асептический процесс в брюшной полости животных. Реакция гепатоцитов возможна на любое вмешательство на организм животного, а также и на воспалительный процесс, что нам позволят определить морфологические исследования. Применение путем оперативного вмешательства криоконсервированной плаценты позволит нам получить возможную коррекцию структуры гепатоцитов при дальнейшем изучении морфологических препаратов тканей печени.

Summary

METHODS OF EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF HEPATOCYTES DURING ASEPTIC PERITONITIS

Voloshina E.V., Grigorenko A.S., Donets I.N.

Key words: hepatocytes, experiments, aseptic peritonitis, cryopreserved placenta, morphological.

The majority of functions characteristic of the liver is carried out by hepatocytes that make up 80 % of all the liver cells. Hepatocytes are responsible for synthesis, breaking down and storage of large amount of different substances. They play the central role in a carbohydrate and lipid metabolism, participate in producing proteins found in blood plasma, are connected with a intestinal lumen and through the system of small tubules excrete metabolic wastes into the intestine as well as emulsifying substance, bile, which facilitates lipid absorption.

Considering powerful functional peculiarities of hepatocytes, the purpose of our research is to elaborate the experimental model of an aseptic inflammation in animals with possible correction of damaged hepatocytes with cryopreserved placenta. Materials and methods. Experiments on animals are carried out according to «The General principles of experiments on animals», approved by V National Congress on Bioethics (Kiev, 2013) and agreed with positions of «The European convention on protection of vertebrate animals which are used for experimental and other scientific purposes» (Strasbourg, 1986), the Law of Ukraine №3447-IV from 21.06.2006 «About protection of animals against cruel treatment» as well as the Helsinki Declaration on the human and animal research. Work was carried out on 140 adult Wistar male rats weighing 180 – 200 g. The animals were divided into four groups: intact group (control) and three experimental (45 animals in each group). The rats in the 2nd group were injected cryopreserved placenta subcutaneously by the technique developed at the Institute of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv). The animals of the 3rd group were subjected to modelling acute experimental aseptic peritonitis by intra-abdominal introduction of 5 mg of λ -carrageenan (Sigma, the USA) dissolved in 1 ml of isotonic solution of sodium chloride per one animal. The animals of the 4th group which had developed acute aseptic peritonitis were injected with cryopreserved placenta subcutaneously. After the euthanasia, samples of the liver from the rats were taken for morphological study of hepatic connective tissue stroma, vessels, a hepatic triad, and hepatic cells, hepatocytes. We assessed quantity, appearance, shape of the cells, their nuclei, nucleoli, cytoplasm, its colour, presence of glycogene lumps; Kupffer cells, their size, shape, nuclei, cytoplasm. Morphological study was conducted by using conventional hystological techniques: we prepared paraffin sections to evaluate the condition of hepatocytes both at intact animals and in test animals of all groups depending on the term of the experiment. Conclusions. The study has demonstrated hepatocytes can response to any intervention into the animal's body as well as to inflammatory process as evidenced by morphological studies. The application of cryopreserved placenta will allow us to perform possible correction of a hepatocyte structure during the further studying of morphological preparations of the liver tissues.