

Р.В. Янко

Вплив нормобаричної гіпоксії на фізіологічну регенерацію та функціональну активність гепатоцитів

Досліджували вплив дозованої нормобаричної гіпоксії на показники фізіологічної регенерації та функціональної діяльності паренхіми печінки дорослих щурів. Показано, що після 14 і 28 сеансів нормобаричної гіпоксії (12% O₂ в N₂, щодобово протягом 1 год) збільшується кількість гепатоцитів на одиницю площі тканини (особливо двоядерних), ядерно-цитоплазматичне співвідношення і концентрація альбуміну в сироватці крові. Після 28-добового впливу нормобаричної гіпоксії підвищується також активність аланінамінотрансферази, але знижується – аспартатамінотрансферази. Отже, дозована нормобарична гіпоксія підвищує регенераторні властивості паренхіми печінки та впливає на функціональний стан гепатоцитів, підвищуючи вміст альбуміну в сироватці крові та змінюючи активність трансаміназ.
Ключові слова: нормобарична гіпоксія, фізіологічна регенерація, гепатоцит.

ВСТУП

Одним із відносно нових немедикаментозних методів профілактики, лікування і реабілітації в сучасній медицині стала дозована нормобарична гіпокситерапія – тобто застосування модельованого гірського клімату (оротерапії). Доведено її позитивну роль у підвищенні неспецифічної резистентності організму, поліпшенні системної та регіональної гемодинаміки та мікроциркуляції, оптимізації стану нейроендокринної системи, газотранспортної функції крові та її реологічних властивостей [2, 8]. Крім того, відома роль гіпоксії для захисту тканин від пошкоджувальної дії радіаційного впливу [11]. Проте праця, присвячених впливу нормобаричної гіпоксії на процеси фізіологічної регенерації та функціональної діяльності паренхіми печінки обмаль, що зумовлює доцільність проведення досліджень у цьому напрямку. Тим більше, що печінка є основним місцем руйнування екзо- та ендотоксинів. Вона

виконує в організмі захисні, ферментативні, видільні функції, бере участь у травленні, кровотворенні, обміну речовин тощо. Тому дослідження шляхів, які могли б інтенсифікувати фізіологічну регенерацію печінки та запобігати її патології є вельми актуальним. Одним із можливих методів активації регенерації та функціональної діяльності печінки може бути дихання штучними газовими сумішами зі зниженим парціальним тиском кисню [3, 5].

Мета нашої роботи – дослідити вплив дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ) різної тривалості на процеси фізіологічної регенерації та функціональної активності паренхіми печінки.

МЕТОДИКА

Дослідження впливу ДНГ здійснювали протягом 14 та 28 діб на 32 щурах-самцях лінії Вістар віком 6 міс. Перед початком експерименту було сформовано 2 контрольні та 2 експериментальні групи: I, III –

© Р.В. Янко

контрольні групи щурів, що утримувалися в стандартних умовах віварію протягом 14 та 28 діб відповідно; II і IV – групи щурів, що отримували ДНГ з парціальним тиском кисню 90–110 мм рт. ст. (12% кисню в N_2 у герметичному проточному об'ємі) протягом 1 год у неперервному режимі 14 та 28 діб відповідно. Гіпоксичну газову суміш генерували за допомогою апарата гірського повітря “Борей”. Щотижнево контролювали масу тіла кожного щура. Роботу з лабораторними тваринами проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про гуманне відношення до хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей (Страсбург, 1986).

Інтенсивність регенерації та функціональну активність паренхіми печінки досліджували гістологічними, морфометричними та біохімічними методами. Об'єктом досліджень були сироватка крові та зразки тканини з правої і лівої частки печінки.

Зразки тканин печінки фіксували в рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (від 70 до 96°) та діоксані, заливали в парафін. Зрізи, завтовшки 5–6 мкм, виготовляли на санному мікротомі, фарбували за традиційною методикою – гематоксиліном Бемера та еозином, заключали в канадський бальзам [4, 7]. Гістологічні препарати аналізували при збільшенні в 400 разів на світлооптичному мікроскопі за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15х і комп'ютерної програми IMAGE J.

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) у сироватці крові визначали за допомогою уніфікованого методу Райтмана-Френкеля, аспаратамінотрансферази (АСТ) – ензиматично-кінетичним методом (стандартний набір реактивів фірми «Ольвекс Диагностикум», Росія). Концентрацію загального білка та альбуміну в сироватці крові визначали біуретовим методом.

Регенераторні властивості та функціональний стан паренхіми печінки оцінювали на підставі підрахунку загальної кількості

гепатоцитів у полі зору мікроскопа, співвідношення числа двоядерних до одноядерних гепатоцитів, активності АСТ і АЛТ у сироватці крові, концентрації загального білка та альбуміну. Крім того, вимірювали площу гепатоцитів, їх ядер і цитоплазми, відстань між сусідніми ядрами. Кількість гепатоцитів визначали в 10 полях зору мікроскопа, а вимірювання площі здійснювали для кожної клітини з підрахунком середнього значення відносно 100 клітин. Всі морфометричні виміри та підрахунок гепатоцитів проводили в полі зору мікроскопа при збільшенні в 400 разів [1, 12].

Статистичну обробку морфометричних результатів здійснювали методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за критерієм t Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями дослідів при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Маса тіла 6-місячних тварин, як контрольних, так і дослідних груп за 14 та 28 діб експерименту вірогідно не змінюється. Тоді, як маса печінки щурів після 14 і 28-ми сеансів ДНГ знижується на 28 та 12 % відповідно, порівняно з контрольними групами (табл. 1).

Співвідношення маси печінки і маси тіла (вказує скільки відсотків від загальної маси тіла становить маса печінки) у щурів, які отримували ДНГ, має тенденцію до зниження порівняно з контролем.

Таким чином, після 14 та 28 сеансів нормобаричної гіпоксії спостерігається зниження маси печінки, водночас маса тіла залишається сталою. Це може означати, що тканини печінки, які інтенсивно споживають кисень, в умовах дозованої гіпоксії реагують активніше, ніж інші тканини.

У проведених нами дослідженнях показано, що у щурів після 14 сеансів ДНГ загальна кількість і кількість одноядерних

Таблиця 1. Маса тіла та печінки щурів після 14 та 28 сеансів дозованої нормобаричної гіпоксії (M±m, n=8)

Схема досліджу	Маса тіла, г		Маса печінки, г	Співвідношення маса печінки/маса тіла, %
	до сеансу	після сеансу		
Контроль, 14 діб	362±5,25	378±7,75	12,7±0,41	3,3
Гіпоксія, 14 діб	302±6,01	298±9,35	9,1±0,58*	3,1
Контроль, 28 діб	295±4,31	330±7,26	10,0±0,55	3
Гіпоксія, 28 діб	321±5,23	328±4,05	8,8±0,21	2,7

Примітка. Тут і в табл. 2 і 3 *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем.

гепатоцитів мала тенденцію до підвищення, тоді як кількість двоядерних гепатоцитів вірогідно збільшувалася на 50 % порівняно з контролем. Після 28-добового впливу ДНГ відзначали вірогідне підвищення загальної кількості гепатоцитів (на 20 %), а також числа одноядерних (19 %) та двоядерних (40 %). Відстань між сусідніми клітинами мала тенденцію до зниження (табл. 2).

Співвідношення двоядерні/одноядерні гепатоцити у контрольних групах становить в середньому 3,5 %. У тварин II і IV груп це співвідношення збільшується до 4 і 5 % відповідно (див. табл. 2). За літературними даними збільшення кількості гепатоцитів як одноядерних, так і двоядерних свідчить про активацію регенераторних процесів паренхіми печінки [6, 9].

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів є одним із важливих показників регенераторного стану паренхіми печінки. Площа гепатоцита та цитоплазми мала лише тенденцію до зниження після 14

сеансів ДНГ, а після 28-сеансів впливу гіпоксичної газової сумішші вірогідно знизилася на 15 і 17 % відповідно порівняно до контролю. Площа ядра залишилася на рівні контрольних значень. У щурів, які зазнавали впливу ДНГ протягом 14 та 28 сеансів, ядерно-цитоплазматичне співвідношення збільшилося на 14 і 19 % відповідно (табл. 3). Це може свідчити про підготовку клітин до мітозу, який супроводжується посиленням синтезом нуклеїнових кислот і білків. Збільшення розмірів ядер гепатоцитів також може бути зумовлене підвищенням плоідності клітин, оскільки в процесі регенерації збільшується кількість тетра- і октаплоїдних гепатоцитів [6, 14, 15].

Альбумін – це основний білок, який синтезується гепатоцитами. Концентрація його в сироватці крові вказує на активність синтетичної функції печінки та є показником білкового обміну. Після 14 сеансів гіпоксичної газової сумішші концентрація альбуміну в сироватці крові вірогідно зростала на 38 % порівняно до контролю.

Таблиця 2. Кількість гепатоцитів печінки щурів після 14 та 28 сеансів дозованої нормобаричної гіпоксії (M±m, n=8)

Показник	14 діб		28 діб	
	Контроль	Гіпоксія	Контроль	Гіпоксія
Загальна кількість гепатоцитів	138±2,48	141±2,81	130±3,63	156±5,57*
Кількість одноядерних гепатоцитів	134±2,35	135±3,15	125±3,15	149±5,16*
Кількість двоядерних гепатоцитів	4±0,35	6±0,61*	5±0,55	7±0,63*
Співвідношення двоядерні/одноядерні гепатоцити, %	3	4	4	5
Відстань між сусідніми ядрами гепатоцитів, мкм	12,3±0,13	11,7±0,26	12,8±0,18	11,5±0,30

Таблиця 3. Розміри гепатоцитів, їхніх ядер і цитоплазми печінки щурів після 14 та 28 сеансів дозованої нормобаричної гіпоксії ($M \pm m$, $n=8$)

Показник	14 діб		28 діб	
	Контроль	Гіпоксія	Контроль	Гіпоксія
Площа, $\mu\text{м}^2$				
гепатоцита	424,1 \pm 21,31	418,5 \pm 15,01	431,8 \pm 15,45	367 \pm 16,31*
ядра гепатоцита	51,1 \pm 1,20	55,4 \pm 0,76	58,1 \pm 1,35	57,6 \pm 2,76
цитоплазми	373 \pm 20,91	363,1 \pm 14,41	373,7 \pm 14,57	309,1 \pm 16,9*
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,14 \pm 0,008	0,16 \pm 0,004*	0,16 \pm 0,006	0,19 \pm 0,02*

А після 28-добового отримання ДНГ концентрація білка залишалася на рівні контрольних значень. Концентрація загального білка, після 14 та 28 діб отримання ДНГ, не мала вірогідних розбіжностей щодо контролю (рис. 1).

У гепатоцитах синтезуються ферменти АЛТ і АСТ, вміст яких в сироватці крові може свідчити про цілісність гепатоцитів, а також може вказувати на рівень інтенсивності білкового обміну та на ступінь включення амінокислот у реакції вуглеводного обміну. Нами показано, що активність АЛТ після 14 сеансів ДНГ мала тенденцію до зниження, а після 28-добового отримання гіпоксичної газової суміші навпаки – вірогідно збільшилася на 64 % у порівнянні з контрольними значеннями. Активність

АСТ після 14 та 28 сеансів ДНГ знизилася на 9 і 53 % відповідно порівняно з контролем (рис. 2).

Позитивний саногенний вплив помірної ДНГ на паренхіму печінки спостерігали і інші дослідники. Показано, що ядра гепатоцитів щурів, які дихали 12%-ю гіпоксичною газовою сумішю, збільшувались у розмірі і мали ознаки підвищеної функціональної активності. Автори відмітили домінування дифузного хроматину, збільшення розмірів ядерця і наближення їх до каріолеми, кількості пор в останній, а також числа двоядерних гепатоцитів [5]. Показано збільшення насиченості клітини структурами, з якими пов'язані енергетичні функції: мітохондріями, пероксисомами, мембранами ендоплазматичного ретикулума, лізосомальними та ліпофусциновими утвореннями

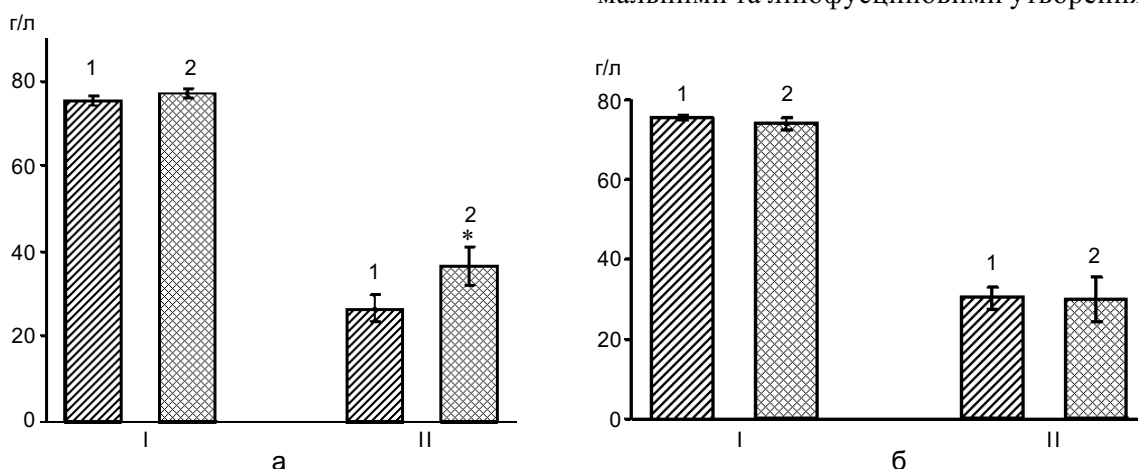


Рис. 1. Концентрація загального білка (I) та альбуміну (II) у сироватці крові щурів, які отримували сеанси дозованої нормобаричної гіпоксії протягом 14 (а) та 28 (б) діб експерименту: 1 – контроль, 2 – дослід.

* $P < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем

[10]. Позитивні результати впливу саногенної дозованої гіпоксії було показано також і на зірчастих клітинах печінки, які беруть безпосередню участь у проліферації і рості гепатоцитів [13].

За нашими результатами у 6-місячних щурів після 14 та 28 сеансів нормобаричної гіпоксії спостерігається відносно зменшення маси печінки, тоді ж як маса тіла залишається майже сталою. Тобто при дії ДНГ у печінці відбувається інтенсивне використання відкладених запасів органічних речовин. Збільшення кількості гепатоцитів, особливо двоядерних, і підвищення ядерно-цитоплазматичного співвідношення може свідчити про посилення функціональної активності та підготовку гепатоцита до мітозу. Підвищення концентрації альбуміну в сироватці крові після 14 сеансів ДНГ вказує на посилення синтетичних функцій печінки. Зростання активності АЛТ у сироватці крові після 28 сеансів нормобаричної гіпоксії можна розглядати, як свідчення цитолізу чи апоптозу клітин, під час якого виділяються продукти розпаду клітини. Саме вони є одними з ініціаторів клітинної проліферації. Наведені вище результати дають змогу вважати, що саногенна ДНГ, яка виникає у тварин при диханні газовою сумішшю з парціальним тиском кисню 90–110 мм рт. ст. тривалістю

1 год щодобово протягом 14 та 28 діб, підвищує регенераторні властивості паренхіми печінки та впливає на функціональний стан гепатоцитів, підвищуючи вміст альбуміну в сироватці крові та змінюючи активність трансаміназ.

ВИСНОВКИ

1. Дозована нормобарична гіпоксія саногенного рівня (з парціальним тиском кисню 90–110 мм рт. ст. тривалістю 1 год у безперервному режимі протягом 14 та 28 діб відповідно) впливає на регенераторні процеси в печінці та біохімічні показники в сироватці крові, що характеризують її функціональну активність.

2. Загальна кількість гепатоцитів і число одноядерних гепатоцитів після 14 сеансів гіпоксії має тенденцію до підвищення. Після 28 сеансів гіпоксії ці показники вірогідно збільшуються.

3. Кількість двоядерних гепатоцитів та ядерно-цитоплазматичний індекс паренхіми печінки вірогідно збільшується після 14 та 28 сеансів гіпоксії.

4. Після 14 сеансів гіпоксичної газової суміші концентрація альбуміну в сироватці крові підвищується. Після 28-добового впливу гіпоксії збільшується активність АЛТ, але знижується активність АСТ.

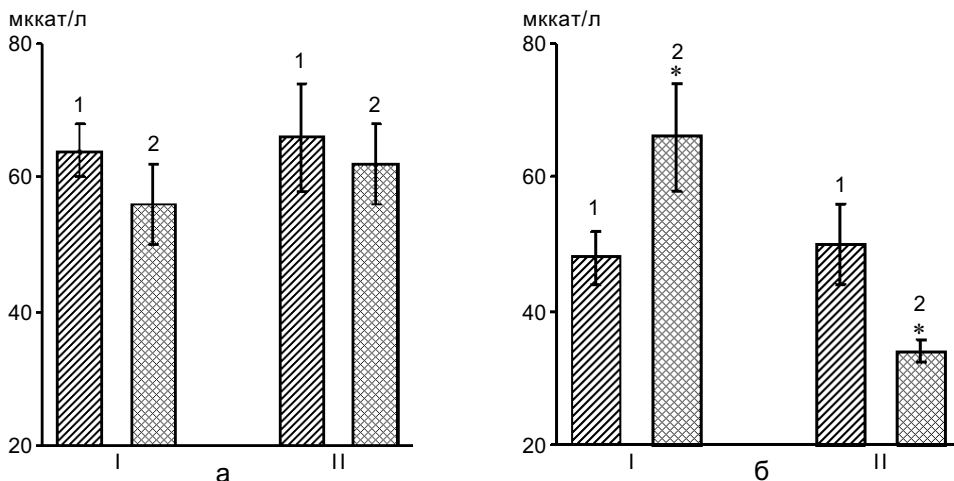


Рис.2. Активність АЛТ (I) і АСТ (II) в сироватці крові щурів, які отримували сеанси дозованої нормобаричної гіпоксії протягом 14 (а) та 28 (б) діб експерименту: 1 – контроль, 2 – дослід. * $P < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем

Р.В. Янко

ВЛИЯНИЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ

Исследовали влияние дозированной нормобарической гипоксии на показатели физиологической регенерации и функциональной деятельности паренхимы печени взрослых крыс. Показано, что после 14 и 28 сеансов нормобарической гипоксии (12 % O₂ в N₂, ежесуточно на протяжении 1 ч) увеличивается количество гепатоцитов на единицу площади ткани (особенно двуядерных), возрастает ядерно-цитоплазматическое соотношение и повышается концентрация альбумина в сыворотке крови. После 28-суточного влияния нормобарической гипоксии увеличивается также активность аланинаминотрансферазы, но снижается – аспаргатаминотрансферазы. Сделан вывод, что после 14 и 28 сеансов дозированной нормобарической гипоксии активируется физиологическая регенерация и функциональная активность паренхимы печени.

Ключевые слова: нормобарическая гипоксия, физиологическая регенерация, гепатоцит.

R.V. Yanko

PHYSIOLOGIC REGENERATION AND FUNCTIONAL ACTIVITY HEPATOCYTES AT NORMOBARIC HIPOXIA

It was studied the effects of dosed normobaric hypoxia during 14 and 28 days on physiological regeneration and functional activity liver of parenhima fenomenas of adult rats. It was shown that after completion of experiment at rats increase sizes nucleus, the area of cytoplasm decrease, and also is increase the hepatocytes amount on tissue area unit. Concentration albumin increased after 14 days of normobaric hypoxia. Activity alanine aminotranferase increased and aspartate aminotransferase activity decreased after 28 days of dosed normobaric hypoxia. Thus our study suggested that normobaric hypoxia stimulate morphological marcers functional action and regenerator liver ability.

Key words: normobaric hipoxia, physiological regeneration, hepatocytes.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, Nathional Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

In-t фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

E-mail: biolag@bigmir.net

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 385 с.
2. Березовский В.А. Аллопатический и гомеопатический принципы в лечении заболеваний, связанных с кислородным голоданием. – В кн.: «Молекулярные аспекты адаптации к гипоксии» – К.: Наук. думка, 1979. – С. 224–231.
3. Березовский В.А., Левашов М.И.. Введение в оротерапию. – М.: Изд-во Академии проблем гипоксии РФ, 2000. – 2-е изд. – 76 с.
4. Волкова О.В., Елецкий Ю.К Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
5. Лебкова Н.П, Чижов А.Я., Бобков Ю.И. Адаптационные внутриклеточные механизмы регуляции энергетического гомеостаза при прерывистой нормобарической гипоксии // Рос. физиол. журн. им. Сеченова. – 1999. – **85**, №3. – С. 403–411.
6. Оболенська М.Ю. Регенерація печінки у щурів: молекулярно-біологічні процеси та їх регуляція: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – К., 1999. – 34 с.
7. Павлович С.І., Макогон Н.В., Алексюк Л.І. Порівняльна характеристика імунного пошкодження печінки мишей Т-клітинного та антитільного генезу // Клін. та експерим. патологія. – 2008. – **7**, №3. – С. 1–11.
8. Сиротинин Н.Н. Гипоксия и ее значение в патологии. – К.: Изд. АН УССР. – 1949. – 22 с.
9. Слинко М.С. Морфофункциональные показатели печени нутрий в постнатальном онтогенезе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 2007. – 23 с.
10. Степанов О.Г. Влияние прерывистой нормобарической гипоксии на состояние гепатобилиарной системы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Краснодар, 1994. – 19 с.
11. Стрелков Р.Б., Чижов А.Я. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. – Екатеринбург: Урал. Рабочий, 2001. – 397 с.
12. Gerlyng P., Stokke T., Huitfeldt H.S. Analytical methods for the study of liver cell proliferation // Cytometry. – 1992. – **13**, №. 4. – P. 404–415.
13. Ping-Sheng C. Wei-Rong Z. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells // World J. Gastroenteral. – 2001. – **7**, №5. – P. 647–651.
14. Rozga J. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure // Med. Sci. Monit. – 2002. – **8**, №2. – P. 32–38.
15. Zimmermann A. Regulation of liver regeneration // Nephrol. Dial Transplant. – 2004. – **19**. – P.6–10.