

В.Я. Березовський, Р.В. Янко, І.Г. Літовка

Вплив аліментарної депривації на фізіологічну регенерацію паренхіми печінки молодих і дорослих щурів

Исследовали влияние 40%-го ограничения калорийности суточного рациона на показатели физиологической регенерации печени. Длительность эксперимента – 28 сут. Установлено, что после завершения эксперимента у 3- и 9-месячных крыс увеличивается количество гепатоцитов на единицу площади ткани, увеличиваются их ядра, уменьшается площадь цитоплазмы, а также увеличивается число двуядерных гепатоцитов у 9-месячных животных. Сделан вывод, что краткосрочная дозированная алиментарная депривация активизирует физиологическую регенерацию паренхимы печени.

ВСТУП

Однією з найактуальніших проблем у сучасній біології та медицині є збереження здоров'я людини протягом усього життя. Ключовим питанням, що тісно пов'язано з якістю і тривалістю життя, є здатність як молодого, так і дорослого організму до фізіологічної регенерації органів і тканин. Відомо, що одним із універсальних і безпечних методів впливу на регенерацію і метаболізм тканин може бути дозована аліментарна депривація [8, 9]. Існує загальна біологічна закономірність, яка полягає в тому, що після закінчення будь-якого процесу пригнічення неминуче виникає стадія підйому. Це має пряме відношення до механізму дії дозованого обмеження калорійності раціону, що підвищує інтенсивність процесів фізіологічної регенерації, сприяє оновленню всіх клітин і тканин [11]. Встановлено, що зниження калорійності повноцінного раціону (а не лише якогось одного із інгредієнтів) активує проліферацію клітин. Збільшується майже втричі кількість ретикулоцитів, що свідчить про інтенсифікацію гемопоетичної активності

© В.Я. Березовський, Р.В. Янко, І.Г. Літовка

кісткового мозку, підвищується кількість мітотично активних клітин у кістковому мозку та печінці [6, 14, 15].

Відомо, що печінка ссавців, як і інших хребетних, виконує функцію детоксикації та має високу здатність до самовідновлення [5, 7]. З віком у зв'язку з формуванням епігенетичних змін організму швидкість регенераторних процесів печінки зменшується. Тому дослідження впливу аліментарної депривації на зміни інтенсивності процесів регенерації печінки в молодих і дорослих щурів можуть мати певні відмінності.

Мета цієї роботи – вивчення впливу дозованої аліментарної депривації на процеси фізіологічної регенерації паренхіми печінки молодих і дорослих щурів.

МЕТОДИКА

Обмеження калорійності стандартного добового раціону щурів на 40 % здійснювали протягом 28 діб у 36 щурів-самців лінії Вістар віком 3 (I, II групи) та 9 міс (III, IV групи). Перед початком експерименту було сформовано 4 експериментальні групи: I, III – контрольні групи щурів, що утриму-

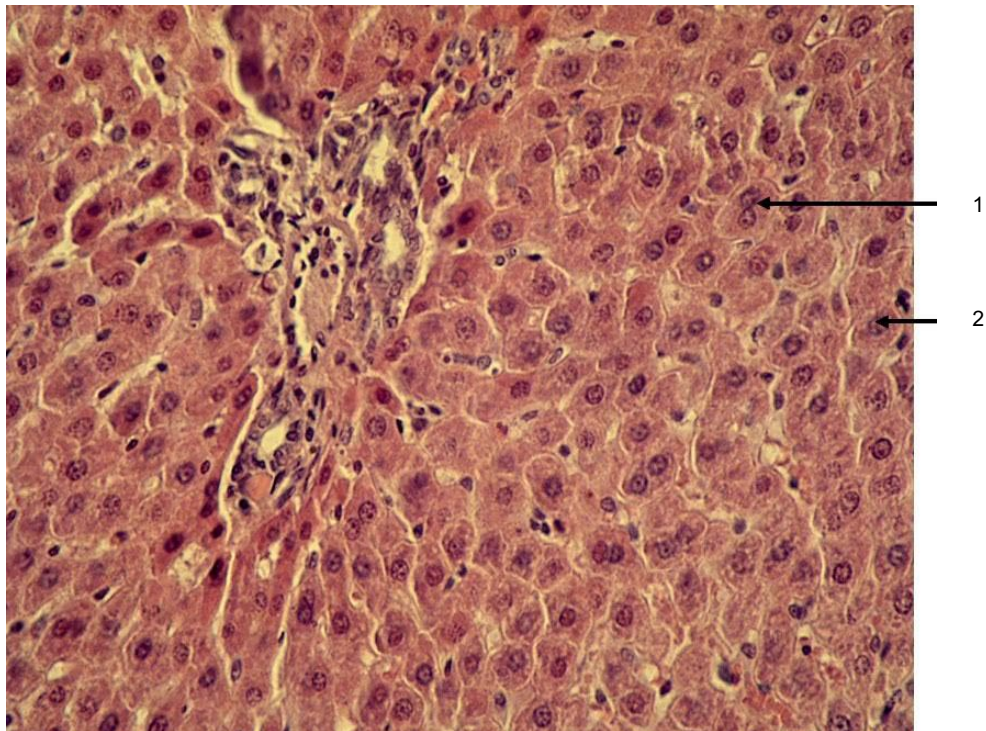
валися на стандартному віварному раціоні харчування; II і IV – 3 та 9-місячні щури, що отримували обмежений раціон харчування. Доступ до води у всіх груп тварин був вільним. Щотижнево визначали масу тіла щурів. Щурів декапітували під раушнаркозом з урахуванням вимог про гуманне ставлення до експериментальних тварин.

Для морфологічних досліджень відбирали зразки тканини з правої та лівої частки печінки, які фіксували в рідині Буена. Зневоднення матеріалу проводили у спиртах зростаючої концентрації (від 70° до 96°) та діоксані. Зразки печінки заливали в парафін. Зрізи завтовшки 5–6 мкм виготовляли на санному мікротомі, фарбували за традиційною методикою – гематоксиліном Бемера та еозином, заключали в канадський бальзам [1, 4, 16].

Гістологічні препарати аналізували на світлооптичному мікроскопі за допомогою

окуляр-мікрометра МОВ-1-15х та комп'ютерної програми IMAGE J. Функціональний стан і регенераторні властивості паренхіми печінки оцінювали на підставі підрахунку загальної кількості гепатоцитів у полі зору, кількості одно- та двоядерних гепатоцитів і вимірювання їх площі, а також площі ядер і цитоплазми, відстані між сусідніми ядрами. Кількість гепатоцитів рахували в 10 полях зору мікроскопа, а вимірювання площі здійснювали виходячи з середнього значення відносно 100 клітин. Морфометричні виміри та підрахунок гепатоцитів проводили в полі зору мікроскопа при збільшенні в 400 разів (рис.1).

Статистичну обробку одержаних морфометричних результатів здійснювали методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за критерієм t Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями досліду при $P < 0,05$.



Мікрофотографія печінки інтактного щура. Забарвлення гематоксиліном Бемера-еозином. Об.40, ок.10: 1 – двоядерний гепатоцит, 2 – одноядерний гепатоцит

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Початкова маса тіла 3-місячних щурів становила 130–160 г, а 9-місячних – 340–370 г. За 28 діб експерименту маса тіла 3-місячних щурів у контрольній групі збільшилася на 74 %, а в групі, що зазнавала впливу аліментарної депривації – на 27 % (табл. 1). Маса тіла 9-місячних щурів контрольної групи за цей самий період часу збільшилася тільки на 7 %, а для тварин дослідної групи навіть зменшилася на 5 %.

Маса печінки 3-місячних тварин, які зазнавали впливу аліментарної депривації була нижчою на 35 %, а 9-місячних – на 31 % порівняно з контрольними групами (див. табл.1).

Співвідношення між масою печінки і масою тіла (печінковий індекс) у 3-місячних щурів, що зазнавали аліментарної депривації, зменшилося на 12 %, а 9-місячних – на 20 % порівняно з групами тварин, які отримували віварний раціон харчування.

Таким чином, у молодих тварин при обмеженні харчування на 40 % маса тіла та печінки зменшуються більш інтенсивно, ніж у дорослих тварин, а втрати маси печінки в обох випадках переважають над втратами маси тіла. Це відповідає відомим фактам більш інтенсивного енергетичного метаболізму у тварин молодого віку [3].

Кількість гепатоцитів є суттєвим показником функціональної активності та фізіологічної регенерації печінки. Відомо, що як

при фізіологічній регенерації печінки, так і при репаративній, відбувається збільшення загальної кількості гепатоцитів [12–14]. У наших дослідженнях середня кількість гепатоцитів у молодих щурів при обмеженому харчуванні збільшилася на 19 %, а у дорослих тварин – на 20 % порівняно з групами тварин такого ж віку, які отримували стандартний віварний раціон харчування (табл. 2).

Переважає більшість гепатоцитів печінки є одноядерними, рідше зустрічаються двоядерні. Слід відмітити, що середня кількість одноядерних гепатоцитів у молодих і дорослих щурів з обмеженою калорійністю в раціоні вірогідно більша на 20 і 19 % відповідно порівняно з контролем. У 3-місячних щурів спостерігали лише тенденцію до зниження числа двоядерних гепатоцитів. Тоді ж як у 9-місячних тварин цей показник вірогідно перевищує значення контрольної групи на 40 %.

Існує дві достатньо аргументовані, але суперечливі гіпотези відносно кількості двоядерних гепатоцитів при фізіологічній регенерації печінки. В літературі наявні відомості про збільшення числа двоядерних гепатоцитів у результаті незакінченого мітозу чи амітозу. Так, деякі автори доводять, що ці процеси тісно пов'язані між собою [13]. Інші автори вважають, що збільшення кількості двоядерних гепатоцитів свідчить про інтенсивну регенерацію [7]. Співвідношення двоядерні/одноядерні гепатоцити у контрольній групі 3-місячних

Таблиця 1. Показники маси тіла та печінки молодих і дорослих щурів, що зазнавали впливу аліментарної депривації протягом 28 діб (M±m)

Показник	3-місячні щури		9-місячні щури	
	Контроль (n = 6)	Аліментарна депривація (n = 12)	Контроль (n = 6)	Аліментарна депривація (n = 12)
Маса тіла, г	250±14,24	186±8,08*	393±8,58	339±9,05*
Маса печінки, г	9,8±0,56	6,4±0,23*	11,4±0,71	7,9±0,27*
Співвідношення маса печінки / маса тіла, %	3,92	3,44	2,9	2,33

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

Таблиця. 2. Кількість гепатоцитів печінки молодих і дорослих щурів, що зазнавали впливу аліментарної депривації (M±m)

Показник	3-місячні щури		9-місячні щури	
	Контроль (n = 6)	Аліментарна депривація (n = 12)	Контроль (n = 6)	Аліментарна депривація (n = 12)
Загальна кількість гепатоцитів	145±2,12	172±5,37*	149±4,42	179±6,76*
Кількість гепатоцитів				
Одноядерних	138±2,18	166±5,57*	139±3,95	165±6,03*
Двоядерних	7±0,71	6±0,62	10±0,42	14±1,43*
Співвідношення двоядерні / одноядерні гепатоцити, %	5,07	3,61	7,19	8,48
Відстань між сусідніми ядрами гепатоцитів, мкм	12,03±2,54	10,61±0,44	10,73±2,49	9,88±0,35

тварин становить 5,07 %. У дослідній групі цей показник знижується до 3,61 %. У 9-місячних щурів співвідношення двоядерні/одноядерні гепатоцити у контролі становило 7,19 %, а в групі з обмеженим харчуванням воно збільшилося до 8,48 % (див. табл.2).

При вимірюванні відстані між ядрами гепатоцитів визначено тенденцію до її зменшення як у молодих, так і у дорослих тварин з обмеженим харчуванням у порівнянні з контрольними групами (див. табл.2). Це може свідчити про певну активацію метаболізму печінки.

Серед морфометричних показників функціонального стану і регенераторного

процесу відіграє значну роль ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів (індекс Гертвіга). При вимірюванні площі гепатоцитів, їх ядер та цитоплазми у дорослих і у молодих тварин з обмеженою калорійністю раціону спостерігали тенденцію до зниження цих показників порівняно з контрольними групами (табл.3).

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у тварин, які зазнали впливу обмеження калорійності раціону, збільшувалося: у 3-місячних на 23 %, а у 9-місячних на 43 % щодо контрольних значень. Це вказує на відносне збільшення ядер гепатюцитів тварин II і IV груп. На нашу думку, це може свідчити про підготовку клітин до мітозу,

Таблиця. 3. Розміри гепатоцитів, їхніх ядер і цитоплазми печінки молодих і дорослих щурів під впливом аліментарної депривації (M±m)

Показник	3-місячні щури		9-місячні щури	
	Контроль (n = 6)	Аліментарна депривація (n = 12)	Контроль (n = 6)	Аліментарна депривація (n = 12)
Площа, мкм ²				
гепатоцита	371,1±32,87	271,9±24,02*	313,2±38,08	222,9±23,88
ядра	43,3±2,5	38,1±1,43	38,9±1,96	36,7±1,75
цитоплазми	328,7±26,98	233,7±25,72*	276,1±34,78	186,1±25,4
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,13±0,02	0,16±0,01	0,14±0,02	0,2±0,01*

який супроводжується синтезом нуклеїнових кислот і білків. За гіпотезою деяких дослідників збільшення ядра зумовлене підвищенням плоідності клітин, оскільки у процесі регенерації збільшується кількість тетра- та октаплоїдних гепатоцитів [10, 17].

У молодих тварин при обмеженні харчування на 40 % маса тіла і печінки зменшувалися більш інтенсивно, ніж у дорослих тварин. Тобто це може вказувати, що дорослі щури більш витриваліші до дії голодування порівняно з молодими тваринами. Короткотривале обмеження раціону як у молодих, так і дорослих тварин активує ЦНС і пошукову діяльність щурів, функціональну діяльність і фізіологічну регенерацію печінки. Збільшується кількість одно- та двоядерних гепатоцитів, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, що вказує на відносне збільшення ядра, і може свідчити про підвищення функціональної активності та підготовку гепатоцита до мітозу.

Група українських дослідників встановила, що короткотривале голодування викликає покращення субмікроскопічної організації ендотеліоцитів, зірчастих і ріт-клітин печінки щурів, що супроводжувалося підвищенням їх функціональної активності [2]. Показано також, що розвантажувально-дієтична терапія має дезінтоксикаційний ефект (дозоване голодування очищає організм від токсинів із клітин і міжклітинного простору), гемодинамічний ефект (внаслідок перерозподілу крові від шлунка і кишечника розкриваються спазмовані та нефункціонуючі капіляри, що призводить до збагачення кров'ю судин мозку, серця, шкіри тощо), аутолітичний ефект (при голодуванні організм переходить на ендогенне харчування, в результаті чого піддаються розпаду тканини, змінені хворобливим процесом, а також спайки, ліпоми, пухлини тощо) [8].

ВИСНОВКИ

1. Обмеження калорійності раціону на 40 %

протягом 28 діб збільшує кількість гепатоцитів та ядерно-цитоплазматичний індекс у печінці молодих і дорослих щурів, активуючи регенерацію гепатоцитів.

2. Активуюча дія аліментарної депривації на фізіологічну регенерацію паренхіми печінки проявляється як у 3-місячних, так і у 9-місячних щурів, незважаючи на різницю у віці та інтенсивності енергетичного метаболізму.

V.A. Berezovskiy, R.V. Yanko, I.G. Litovka

THE ALIMENTARY DEPRIVATION EFFECTS ON PHYSIOLOGY REGENERATION DIFFERENT AGE RATS OF LIVER PARENCHYMA

It was studied the effects of alimentary deprivation during 28 days on functional state and physiological regeneration of liver. In 3 and 9-month rats it was shown an increase in the amount of hepatocytes per unit of area of tissue, their nuclei were hypertrophied, the area of cytoplasm was decreased, the number of binucleitic hepatocytes in 9-month animals was increased. Thus, our study suggests that a short term 40% food limitation stimulates physiological regeneration of liver parenchyma.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 385 с.
2. Боднар Я.Я., Кузів О.І., Дмитренко О.В. Вплив повного голоду на ультраструктуру синусоїдів печінки щурів. – В кн.: Розвантажувально-дієтична терапія і низькокалорійна дієта в клініці внутрішніх захворювань. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – С. 22–24.
3. Божков А.И., Длубовская А.И., Малеев В.А. Сдерживающая рост диета вызывает различные стратегии адаптации организма молодых и взрослых животных // Успехи геронтологии. – 2006. – №19. – С. 36–43.
4. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
5. Воробьева О.В. Влияние экспериментального цирроза печени у самок крыс на патологию и регенерацию печени у потомства. – Автореф. дисс. к-да мед наук.: 14.00.15. – Чуваш. гос. ун-т им. И.Н. Ульянова. – Ульяновск, 2007. – 23 с.
6. Датхаев Р.Ю. Морфологическая характеристика печени белых крыс при алиментарном голодании в условиях высокогорья. – Душанбе: Даниш, – 1993. – 90 с.
7. Карапетян А.Ф., Живанян К.А. О регенераторном потенциале печени озерной лягушки RANA RIDI-

- BUNDA после частичной гепатэктомии // Цитология, 2003 – 48, № 4. – С.346–354.
8. Кузів П.П. Розвантажувально-дієтична терапія в клініці внутрішніх хвороб: історія, обґрунтування, застосування, оцінка ефективності та перспективи розвитку. – В кн. Розвантажувально-дієтична терапія і низькокалорійна дієта в клініці внутрішніх захворювань. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – С. 8–14.
 9. Николаев Ю.С., Нилов Е.И., Черкасов В.Г. Голодание ради здоровья. - М.: Советская Россия, 1988. – 90 с.
 10. Оболенська М.Ю.Регенерація печінки у щурів: молекулярно-біологічні процеси та їх регуляція. – Автореф. дис... д-ра біол. наук: 03.00.03. Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України. – К., 1999. – 34 с.
 11. Полежаев Л.В. Регенерація путем индукции. – М.: Медицина, 1977. – 184 с.
 12. Сакута Г. А., Кудрявцев Б.Н. Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени крыс. Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов // Цитология, 2005 – 47. №5. – С.379–387.
 13. Слинко М.С. Морфофункциональные показатели печени нутрий в постнатальном онтогенезе. – Автореф. дис. ... канд. биол. наук.: 16.00.02. Ставропол. гос. аграр. ун-т. – Ставрополь, 2007. – 23 с.
 14. AlvizouriAlvizouri-Mucoz M., Angeles-Angeles A., Orozco Estívez H., Larriva-Sahd J. Rapeseed diet and hepatocyte hypertrophy: an experimental morphometric study // Rev Invest Clin. – 1992. – 44, №2. – P.187–192.
 15. Eberle J., Diebold J., Reichlmayr-Lais AM., Kirchgessner M. Bone marrow morphology and various hemolytic markers in growing rats with alimentary lead deficiency // Z Ernährungswiss. – 1996. – 35, №4. – P. 332–340.
 16. Gerlyng P., Stokke T., Huitfeldt H.S. Analytical methods for the study of liver cell proliferation // Cytometry. – 1992. – 13, №. 4. – P.404–415.
 17. Rozga J. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure // Med. Sci. Monit. – 2002. – 8, №2. – RA 32–38.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: biolag@bigmir.net

Матеріал надійшов до редакції 14.05.08