



УДК: 611.36-018.1+1616.36-018.1-06:616.379-008.64-039.361-019-08

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ НА ПОЗДНИХ ЭТАПАХ ПРОТЕКАНИЯ

Ю.Р. СОГУЙКО¹
Ю.Я. КРИВКО¹
Е.Н. КРИКУН²

¹ Львовский национальный
государственный университет имени
Данила Галицкого, г. Львов, Украина

² Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: krikun@bsu.edu.ru

В работе изучена ультраструктурная характеристика печени крысы в норме и при экспериментальном сахарном диабете на поздних этапах протекания. Проведен забор материала с целью исследования и описание печени на ультрамикроскопическом уровне. Определено расположение структурных элементов печени, их форма и размер в норме и при диабете. Констатируется, что при сахарном диабете в печени крыс происходят изменения во всех структурных компонентах по сравнению с нормой. Полученные результаты в дальнейшем станут базой для сравнения с данными изменений печени при сахарном диабете в практической медицине.

Ключевые слова: сахарный диабет, ультрамикроскопия, печень, стрептозотцин, крыса.

Введение. Известно, что характерной чертой сахарного диабета (СД) 2 типа является повышенная продукция глюкозы печенью в результате угнетения гликолиза и усиление глюконеогенеза. Именно эти процессы ответственны за гипергликемию у больных СД 2 типа натошак. В то же время рост концентрации глюкозы в крови после приема пищи (постпрандиальной гликемии) связан с торможением утилизации глюкозы периферическими тканями, в первую очередь мышцами [1]. Это обусловлено нарушением синтеза гликогена в результате снижения активности гликогенсинтазы и ослабление процессов окисления глюкозы вследствие дефекта в пируватдегидрогеназном комплексе. Кроме того, нарушения секреторной функции панкреатических бета-клеток, что проявляется в торможении первой фазы инсулинового ответа, также вносит свой вклад в развитие гипергликемии как натошак, так и после приема пищи [2, 3].

Целью исследования было изучение сравнительной характеристики ультраструктуры печени в норме и при экспериментальном сахарном диабете на поздних этапах его протекания.

Методы. Забор и подготовка материала для электронной микроскопии проводили на половозрелых крысах – самцах массой 100 – 130 г линии "Вистар". Перед забором материала подопытное животное усыпляли внутривенным наркозом с использованием тиопентала (из расчета 25 мг/кг). С помощью лезвия отрезали небольшую часть ткани печени крыс, которую помещали сразу в большую каплю 2% раствора четырехоксида осмия на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,36) с сахарозой. После этого, обезжиренным в ацетоне лезвием вырезали полоски ткани печени размером 0,8 x 0,1 x 0,1 см и быстро переносили их в другую каплю фиксирующего раствора, размещенного на кусочке зубо-врачебного воска ледяной плиты. Из полосок вырезали блоки ткани печени кубической формы размером 1 мм³. Тканевые блоки фиксировали 2% раствором четырехоксида осмия на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,36) с добавлением сахарозы в течение 2 ч на ледяной бане. После этого их отмывали буферным раствором данного состава (4 свежие порции по 15 минут в каждой) [4]. Для дегидратации и подготовки к пропитке, водонерастворимые смолами и отмывые от остатков фиксаторов тканевые блоки, проводили через спирты восходящей концентрации и абсолютный ацетон. Схема проведения в растворах этилового спирта: 40% – три свежие порции по 10 минут, 70% – три свежие порции по 10 минут, 96% – две свежие порции по 20 минут. Схема проведения в ацетоне: ацетон марки "особо чистый" – шесть свежих порций по 15 минут. Затем материал помещали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Состав водонерастворимых заливных смол содержал эпон 812 – 5 мл, аралдит М – 3 мл, DDSA – 11 мл, дибутилфталат – 0,4 мл, ДМП – 30–15 капель [5]. Тканевые блоки помещали в эпон-аралдит путем проведения через растворы возрастающей концентрации (схема проведения: смесь ацетона и смолы в соотношении 3:1 – одна свежая порция на два часа; смесь ацетона и смолы в соотношении 1:1 – одна свежая порция на два часа; смесь ацетона и смолы в соотношении 3:1 – одна свежая порция на два часа; чистая смола – одна свежая порция на двенадцать часов при комнатной температуре). Для лучшей пропитки материал вместе со смесью смолы – ацетон ставили в гнезда электровертушки [6]. Затем блоки помещали в эпон-аралдит, находящийся в глицериновых капсулах. Полимеризацию материала проводили поэтапно при разных



температурах – 36, 45 и 60 С° в течение 24 часов. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме УМТП – 3М с помощью стеклянных ножей, изготовленных на приборе ССН – 1. Для исследования отбирали срезы серебристого или нежно-лимонного цвета. Срезы контрастировали сначала в 2 % – растворе уранилацетата [7], а затем – цитрата свинца [8]. Изучение и фотографирование материала проводили с помощью микроскопа УЕМВ – 100К (Украина) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении на экране микроскопа 2000х – 124000х.

Результаты. У интактных крыс печеночные пластинки построены из гепатоцитов, которые объединены с помощью плотных контактов и образуют желчные каналцы. При ультраструктурном исследовании в цитоплазме гепатоцитов оказываются хорошо выражены каналцы эндоплазматической сети как гранулярной, так и агранулярной, многочисленные лизосомы и пероксисомы, цистерны комплекса Гольджи, расположенные в различных отделах клеток. Митохондрии имеют сферическую или овальную форму от 0,8 до 2 мкм в диаметре, небольшую численность крист и электронноплотный матрикс в котором расположены митохондриальные гранулы. В цитоплазме гепатоцитов находятся включения гликогена и липидов. Гранулы гликогена местами образуют агрегаты в виде розеток, тогда как липидные гранулы имеют переменную электронную плотность и не окружены мембранами. Ядра, как правило, расположены в центре гепатоцитов и имеют овальную или сферическую форму, хроматин в них просветленный. В ядрах оказываются 1-2 ядрышка, имеющих широкопетлистую ретикулярную структуру (рис.1). Эндотелиоциты отделяли пространства синусоидов от перисинусоидальных пространств и имели продолговатую форму, их ядра расположены в центре. Вокруг полюсов ядра находится компактная зона органелл с цистернами комплекса Гольджи, каналцами агранулярной и гранулярной эндоплазматической сети и многочисленными митохондриями. Наибольшую протяженность имеет периферийная зона, в которой расположены немногочисленные органеллы, она изящна и имеет многочисленные плазмолемные везикулы, среди которых различают связанные с базальной и адлюменальной поверхностями плазмолемы. В периферийной части эндотелиоцитов расположены фенестры, не затянутые диафрагмами. В месте контактов эндотелиоциты имеют многочисленные отростки, благодаря которым образуются ситообразные зоны в стенке синусоидов. Базальная мембрана вокруг эндотелиальных клеток не образует сплошного слоя. Как правило, ее фрагменты выявляются вокруг периферической зоны эндотелиоцитов. В просветах синусоидов и между эндотелиоцитами расположены звездчатые макрофагоциты. Они имеют многочисленные псевдоподии и складки мембраны. Их ядра бобообразной формы. Вблизи вогнутой поверхности ядра, находятся цистерны комплекса Гольджи и многочисленные лизосомы. В просветах синусоидов обнаруживаются печеночные клетки-убийцы. Они имеют сферическую форму, электронноплотные ядра и своими отростками фиксировались к плазмолемме эндотелиоцитов. Их цитоплазма содержала гранулы с электронноплотным центром, а также пено-и фагоцитарные пузырьки. При ультраструктурном исследовании порталных триад обнаруживаются междольковые артерии, вены, желчные протоки, а также лимфатические сосуды. Стенка междольковых артерий состоит из трех оболочек. Во внутренней оболочке находится сплошной пласт эндотелиальных клеток, расположенных на базальной мембране. В подэндотелиальном слое расположены малодифференцированные клетки, эластичные и коллагеновые волокна. В междольковых артериях хорошо выражена внутренняя эластическая мембрана. Средняя оболочка включает 1-2 слоя гладких миоцитов. Внешняя оболочка состоит из адвентициальных клеток. Вокруг артерий расположены фибробласты, коллагеновые и эластичные волокна. В просветах междольковых вен иногда оказываются моноциты и лимфоциты. В средней оболочке гладкие миоциты не образуют сплошного слоя. Внешняя оболочка состоит из рыхлой соединительной ткани. В их периваскулярном пространстве расположены фибробласты, коллагеновые и эластичные волокна, а также одиночные лимфоциты. Стенка междольковых желчных протоков состоит из кубических клеток с электронно светлой цитоплазмой и ядрами, расположенными в центре. Вокруг желчных протоков находятся фибробласты, коллагеновые и эластичные волокна, а также единичные лимфоциты (рис. 2).

Через 8 недель развития экспериментального СД нами отмечено увеличение численности и размеров жировых включений в цитоплазме гепатоцитов и уменьшение включений гликогена. Возрастает число митохондрий со сплошной внешней мембраной и увеличивается гетерогенность в структуре ядер. При этом встречаются сферические ядра со структурой хроматина и ядрышек подобных интактным животным, но с увеличенной численностью гиперхромных ядер и конденсированным по краям хроматином. Перинуклеарные пространства вокруг таких ядер значительно расширены. Обнаруживались гепатоциты с пикнотическими ядрами, которые имели причудливую форму. Межклеточные пространства гепатоцитов видоизменены и расширены, в них выявляются коллагеновые фибриллы и фибробласты. Перисинусоидальные пространства расширены, заполнены коллагеновыми волокнами, среди которых обнаруживали многочисленные фибробласты, звездчатые макрофагоциты и редко перисинусоидальные жировые



накопительные клетки, в цитоплазме которых находились гигантские удлинённые митохондрии червеобразной формы с многочисленными плотноупакованными кристами (рис. 3).

Диаметри синусоидов сужены, часто встречается сладж эритроцитов, а также многочисленные звездчатые макрофагоциты и тромбоциты, которые контактируют с плазмолемой эндотелиоцитов. Эндотелиоциты в периферийной зоне утолщены. Их цитоплазма имела неоднородную электронную плотность, где содержались темные и светлые клетки, вакуоли, каналы ЭПС, а также расширенные комплексы Гольджи и полиморфные митохондрии. Часто обнаруживались просветленные митохондрии с деструктурированными кристами. Плазмолемальных везикул в таких клетках было мало по сравнению с интактной группой животных. Ядра в эндотелиоцитах часто отечны, осмиофильные. Вокруг эндотелиоцитов обнаруживается базальная мембрана (рис. 4). В портальных трактах – выраженный склероз. Стенки артериол утолщены, эндотелиальная выстилка в них не сплошная. В средней оболочке наблюдаются процессы гипертрофии и гиперплазии гладких миоцитов. Стенка вен склерозирована и утолщена с наличием деструктивных фибробластов. Пространство желчных протоков расширено и заполнено остатками эпителиоцитов. Вокруг желчных протоков наблюдается гистиолимфоцитарная инфильтрация, расширение диаметров лимфатических сосудов и отечными эндотелиоцитами.

Через 10 недель эксперимента, наряду с вышеуказанными изменениями, отмечается увеличение числа деструктурированных митохондрий и крупных жировых включений в гепатоцитах с уменьшением в них содержания гликогена (рис.5). При этом возрастает количество пикнотичных и формализованных ядер в гепатоцитах, расширяются их межклеточные и пересинусоидальные пространства и просветы в желчных капиллярах. Обнаруживаются разрастания коллагеновых волокон с гипертрофией и гиперплазией фибробластов. Возрастает численность снежных макрофагоцитов, суживаются синусоидальные капилляры и уменьшается численность пересинусоидальных жиронакопительных клеток. В них часто обнаруживается сладж эритроцитов и лейкоцитов. Эндотелиальные клетки в стенке синусоидных капилляров полиморфны. Их цитоплазма неоднородна с малым количеством органелл и деструктурированными митохондриями. Ядра часто выступают в просвет синусоидов, в них наблюдается маргинальная агрегация хроматина, ядрышки не определяются. Вокруг зоны органелл часто образуется базальная мембрана в отличие от интактной группы животных (рис.6). В портальных трактах наблюдается склероз и гиперплазия фибробластов. При этом стенки междольковых артерий утолщены и склерозированы, в их просветах часто появляются пристеночные тромбы. Диаметры междольковых желчных протоков расширены, их стенки утолщены, лимфатические сосуды расширены.

Выводы. Таким образом на поздних этапах развития экспериментального СД происходят изменения в артериолах, характеризующиеся деструкцией эндотелиоцитов, гипертрофией и гиперплазией гладких миоцитов, сужением просвета и гиперплазией фибробластов в наружной оболочке артериол, а также гиперемией центральных и междольковых вен. В синусоидах, наряду с деструктивными изменениями в эндотелиоцитах, происходят процессы активации и увеличение численности макрофагоцитов и их миграция в пересинусоидальные пространства, что приводит к трансформации жиронакопительных клеток в фибробласты и разрастанию коллагеновых волокон. Расширение пересинусоидальных пространств приводит к утолщению барьера между кровью и гепатоцитами с нарушением обмена веществ.

Литература

1. Joslin's diabetes mellitus. – 14 ed. / Edited by C. R. Kahn, G.C. Weir, G.L. King et al. – Lippincott, Williams&Wilkins, 2006. – 328 p.
2. Zierath J. R. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle / J.R. Zierath, A. Krook, H. Wallberg-Henriksson // *Diabetologia*. – 2000. – Vol. 43, № 7. – P. 821-835.
4. Kahn S.E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes / S.E. Kahn // *Diabetologia*. – 2003. – Vol. 46, № 1. – P. 3–20.
5. Кривко Ю.Я. Ультроструктурні зміни ендотеліоцитів і міозитів в стінці артеріол сідничного нерва щурів з стрептозотоциніндукованою діабетичною нейропатією і їх корекція нікотинамідом / Ю.Я. Кривко // *Вісник морфології*. – 2003. – Е.9, №9. – С. 255-257.
6. Glauert A. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens // A. Glauert // *Practical methods in electron microscopy*. – Nort-Holland:American Elsevier, 1975. – 207 p.
7. Согуйко Ю.Р. Ультроструктурні особливості печінки щура в нормі та експериментальному цукровому діабеті на ранніх етапах перебігу в динаміці / Ю.Р. Согуйко, Ю.Я. Кривко // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. – 2010, №4. – С. 12-19.
8. Stempac J.G. An improved staining method for electron microscopy / J.G. Stempac, R.T. Ward // *J. Cell Biol.* – 1964. – Vol.22. – P.697-701.
9. Reynolds E.S. The of lead at high pH as an electrnpague stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – Vol. 17. – P.208-212.



ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF RAT'S LIVER IN NORM AND IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS ON LATE TERMS OF RUN

Yu.R. SOGUJKO¹

Yu.Ya. KRIVKO¹

E.N. KRIKUN²

*¹Danylo Halysky Lviv National Medical
University, Lviv, Ukraine*

²Belgorod National Research University

e-mail: krikun@bsu.edu.ru

We studied the ultrastructural characteristics of rat's liver in norm and in experimental diabetes mellitus on late terms of run. We described the investigation of livers electronmicroscopy. We determined the place of liver's structural elements, their form and size in norm and in diabetes. We found out the changes of all structural components in rat's liver in diabetes mellitus comparing with the norm liver. The results of this investigation will become the base for comparison of change dynamics in diabetes mellitus liver in practical medicine.

Keywords: diabetes mellitus, ultramicroscopy, liver, streptozotocin, rat.