

Исследование ультраструктурных изменений печени белых крыс при синдроме длительного раздавливания в период 4ч декомпрессии и их коррекция пролином богатым пептидом

Г.Р. Карапетян, Н.С. Кукуртчян, Г.А. Геворкян

*Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: интоксикация, синдром длительного раздавливания (СДР), пролин богатый пептид (ПБП), электронная микроскопия, декомпрессия

Печень является центральным органом химического гомеостаза, где создается обменный и энергетический пул для метаболизма белков, жиров и углеводов. Изменение в гемостазе и периферическом кровообращении является одной из причин повреждения печени, а на фоне гепатоцеллюлярной недостаточности и нарушения белкового обмена развивается выраженная иммунодепрессия [1]. Повреждение печени является широко распространенной причиной болезни и смерти людей. Этиологическую роль в развитии подобных заболеваний могут играть разнообразные стресс-факторы. Как особый вид стресс-фактора, который не является прямой причиной повреждения печени, рассматривается СДР. Последний является особым видом травматического повреждения организма со своеобразной клинической картиной развития патогенеза с высокой летальностью (до 70%). При СДР имеет место развитие иммобилизационного стресса, активатором которого являются те токсические пептиды, которые образуются в ишемизированной мышце [6]. Выброс последних в кровь в период декомпрессии приводит к общей интоксикации организма, зачастую имеющей летальный исход.

Целью данного исследования было выявление ультраструктурных повреждений печени крыс в период 4ч декомпрессии и возможной коррекции последних ПБП.

Материал и методы

Материалом для данной работы послужила печень белых крыс линии Wistar. В эксперименте были использованы 9 особей массой 160-200г. Животные были разделены на 3 группы: I – контрольная

(компрессия в течение 2ч), II – 4 ч декомпрессии, III – 4 ч декомпрессии + ПБП. СДР вызывался путем компрессии мягких тканей с силой раздавливания 100кг/кг массы животного в течение 2 ч. По окончании эксперимента животные были декапитированы под легким эфирным наркозом. Небольшие биоптаты печени, взятые непосредственно после декапитации, были помещены в холодный параформальдегид-глутаральдегидный фиксатор, затем в четырехокись осмия (OsO_4). Дальнейшая обработка материала проводилась по стандартной методике, принятой в трансмиссионной электронной микроскопии: обезвоживание в восходящем ряду спиртов и ацетона с последующим заключением в эпоксидные смолы. Резка препарата осуществлялась на ультратоме “Райхерт”. Полученные ультратонкие срезы были контрастированы уранил ацетатом и цитратом свинца, после чего были просмотрены под электронным микроскопом фирмы “TESLA”.

Результаты и обсуждение

Как показало наше исследование, ультраструктурные изменения печени крыс при 2ч компрессии, 4 ч декомпрессии и после введения ПБП несут разнообразный характер. Во всех исследуемых группах наблюдается процесс агрегации эритроцитов (Эр) в синусоидах и более крупных сосудах, что указывает на выраженное замедление кровотока (рис.1).



Рис.1. Процесс агрегации эритроцитов в кровеносных сосудах. X 15 000

Под действием токсинов, выброшенных ишемизированной мышцей в период декомпрессии, агрегация Эр может нести необратимый характер, приводя тем самым к нарушению микроциркуляции, что в свою очередь может стать причиной развития острой гипоксии и, как следствие, ишемии печени [4,5]. При 2 ч компрессии состав органелл отличается от такового в нормальной ткани, что предположительно может быть связано с изменением метаболических процессов в клетках в ответ на воздействие стресс-факторов. Гепатоциты в основном одноядерные, иногда встречаются двуядерные клетки. Наблюдаемые ядра (Яд) округлой формы, имеет место конденсация хроматина в глыбки. При 4ч декомпрессии в основном встречаются одноядерные гепатоциты, однако размер и форма ядер резко отличаются от таковых при 2 ч компрессии (рис.2).



Рис.2. Процесс набухания ядра и увеличения его размеров. X 8000

Ядра крупные, овальной, реже округлой формы. Под воздействием ПБП наряду с одноядерными часто встречаются двуядерные клетки. Размеры ядер приближаются к контролю, форма ядер варьирует. Частыми наблюдениями является фрагментация ядер. Как известно, после воздействия различных препаратов на организм количество двуядерных гепатоцитов резко возрастает [12]. Однако при 2ч компрессии мы не можем считать наличие двуядерных клеток результатом воздействия стресс-фактора, так как 2 ч компрессии является достаточно коротким промежутком времени для подобных ультраструктурных преобразований. Мы можем предположить, что редкие находки

двуядерных гепатоцитов при 2 ч компрессии находятся в пределах нормы. После 4ч декомпрессии в ответ на действие токсинов, образованных в ишемизированной мышце, ядра гепатоцитов претерпевают значительные изменения в размерах. Введение ПБП поддерживает размеры ядер в пределах, близких к норме, способствуя однако образованию большого количества двуядерных клеток, при этом в некоторых клетках наблюдается процесс фрагментации ядер, что может быть запрограммированным ответом клетки на воздействие стресс-фактора. В контрольной группе эндоплазматический ретикулум претерпевает значительные изменения. Имеет место полная редукция гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР) и частичная редукция шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР). Целостные сети ШЭР практически не наблюдаются, хотя иногда встречаются участки сети ШЭР, контактирующие с ядром. Отдельные трубочки ШЭР расширены и расположены в пространстве между митохондриями. В ряде случаев наблюдается процесс везикуляции ШЭР. При 4ч декомпрессии состояние эндоплазматического ретикулума резко отличается от такового в контрольной группе, так же как и в контрольной группе ГЭР не наблюдается. Однако ШЭР находится в процессе фрагментации и везикуляции. Фрагменты последнего местами оплетают митохондрии (Мх) (рис.3, 4).

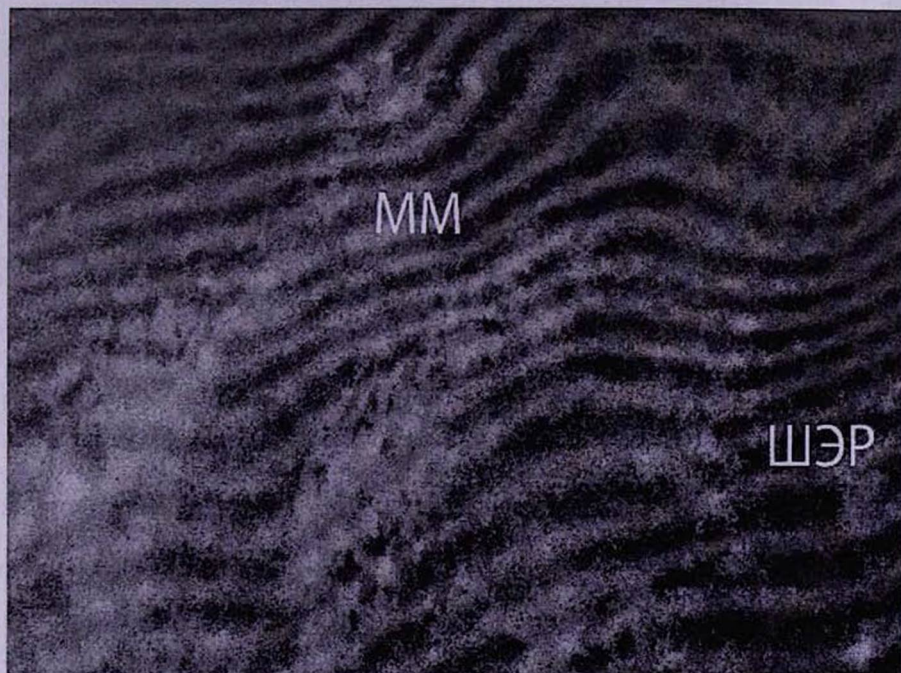


Рис.3. Процесс формирования мегамитохондрий (ММ), фрагментации ШЭР и его везикуляции. X 30 000

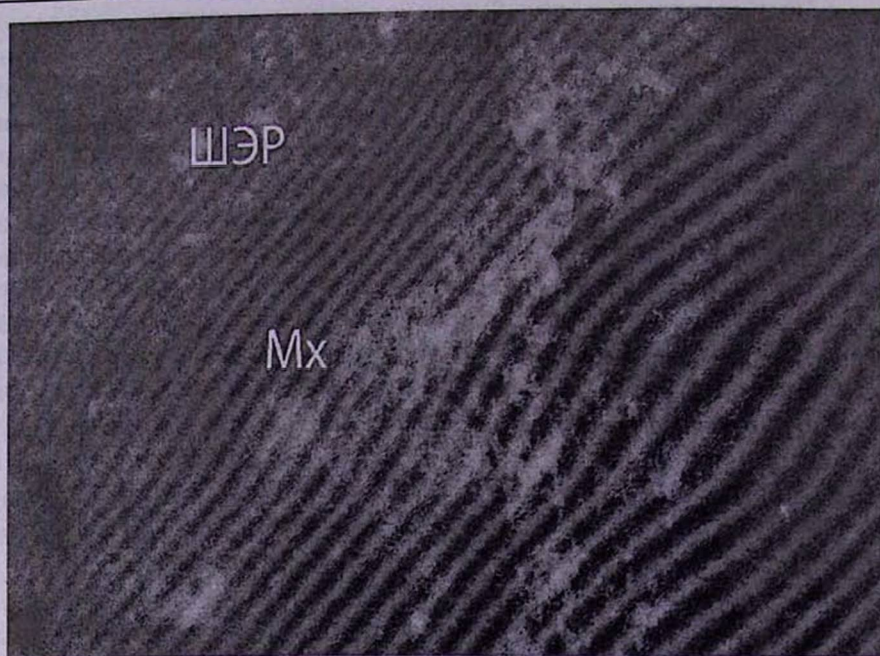


Рис.4. Процесс редукции крист в набухших Мх, везикуляции ШЭР.
Х 60 000

Таким образом, в период интоксикации одним из первых страдает ШЭР. Полное отсутствие сетей ШЭР свидетельствует о нарушении соответствующих метаболических процессов, за которые данные структуры отвечают. В группе с инъекцией ПБП картина наблюдений резко отличается от группы с декомпрессией. Несмотря на то, что ГЭР не встречается, наблюдается улучшение структуры ШЭР. Последний представлен длинными трубочками, оплетающими Мх, с редкими участками фрагментации (рис.5).

Таким образом, можно предположить, что стресс, развивающийся при СДР, приводит к полной деструкции ГЭР без дополнительного воздействия токсинов. Тогда как на структурную целостность ШЭР оказывают негативное влияние токсины, выброшенные ишемизированной мышцей в кровь в период декомпрессии. Введение ПБП оказывает стабилизирующее действие, не позволяя токсинам разрушать структурную целостность ШЭР, тем самым обеспечивая нормальное функционирование последнего. В печени животных контрольной группы Мх представлены группами, иногда цепочками, в которых органеллы плотно контактируют друг с другом, однако изредка встречаются набухшие органеллы. Кристы представлены как в форме трубочек, так и пчелиных сот. При 4ч декомпрессии картина наблюдений существенно отличается от таковых в контрольной группе. Наблюдается

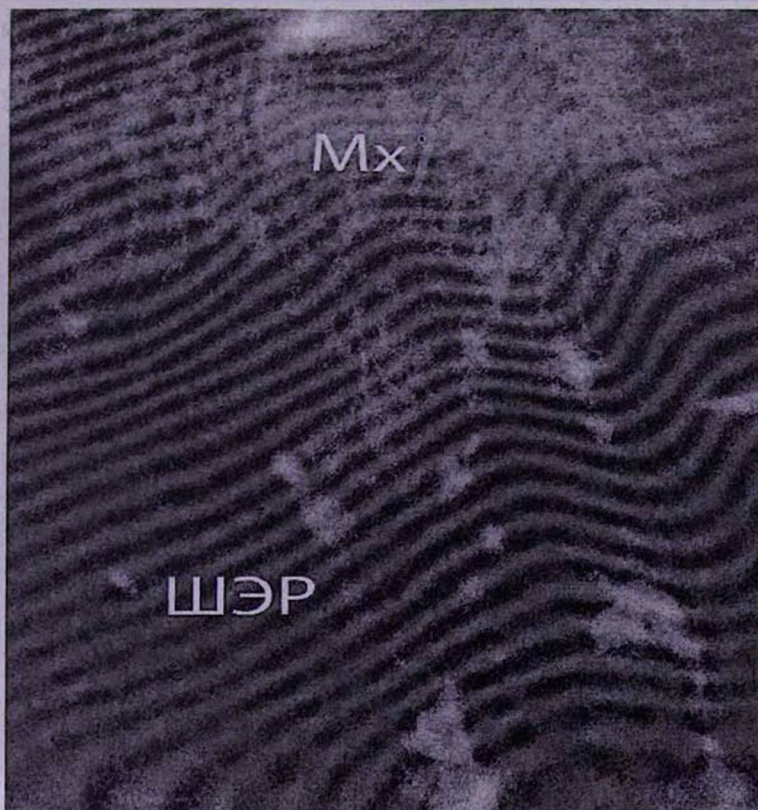


Рис.5. Сети ШЭР, оплетающие Мх. X 60 000

вариация размеров и форм Мх. Последние представлены группами с фрагментами трубочек ШЭР между ними, выражено набухание Мх. Характерным для данной группы является отсутствие крист в Мх. В редких случаях наблюдается тенденция к формированию гигантских Мх. Последние, вероятно, образуются путем слияния и набухания небольших по размеру органелл. В группе с инъекцией ПБП подобные деструктивные изменения, присущие 4ч декомпрессии, не наблюдаются. Мх в основном небольших размеров, расположены группами, оплетены ШЭР (рис.6, 7). Кристы трубчатые, либо в форме пчелиных сот. Мх данной группы практически не отличаются от Мх контрольной группы. Функции Мх отражаются на их структуре и морфологии [7,9,10,11]. Мх могут легко адаптироваться к переменам энергетических потребностей путем изменения метаболизма, который сопровождается изменениями внутренней мембраны. Морфология Мх в основном трубчатая и зачастую зависит от деления и слияния [8]. Сохранность точной морфологии Мх является необходимым условием для нормального функционирования клеток [2]. При увеличении митохондриального деления и слияния имеет место дезорганизация внутренней мембраны

Мх, которая формирует кристы в форме трубочек либо пчелиных сот. Вариации в архитектуре крист могут быть объяснены различными метаболическими состояниями органелл [3].

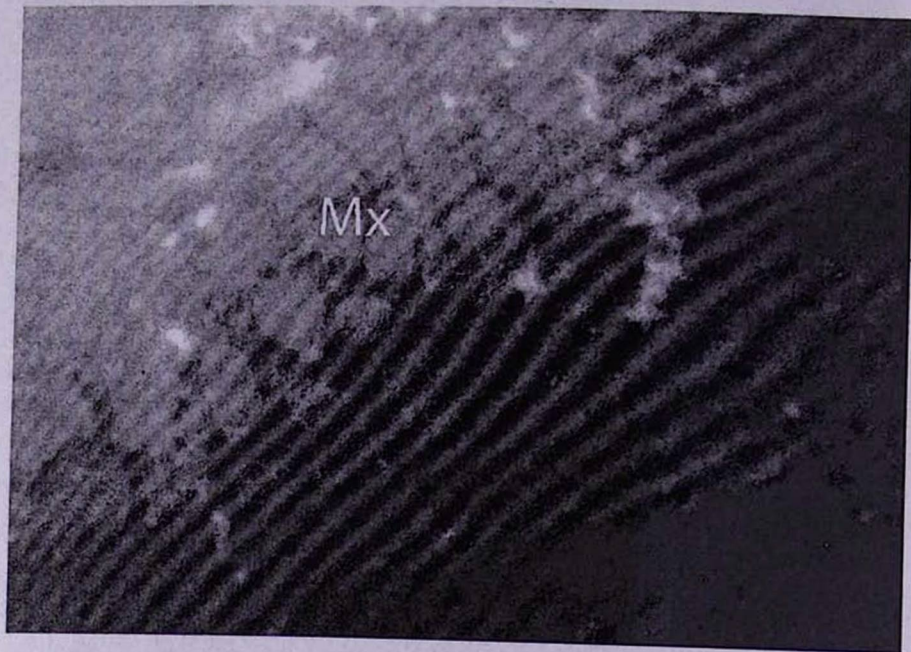


Рис.6. Группа Мх, оплетенная ШЭР. X 24 000

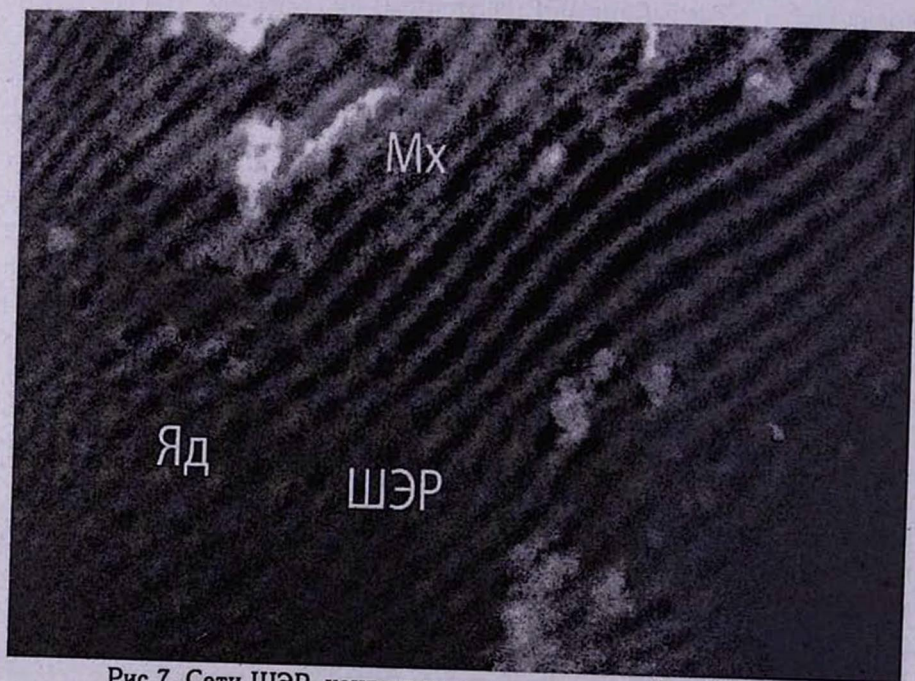


Рис.7. Сети ШЭР, контактирующие с ядром и Мх. X 24 000

Таким образом, разнообразие в архитектуре крист как в контрольной группе, так и в группе с ПБП свидетельствует о наличии адаптационных процессов Мх к изменяющимся энергопотребностям клеток. Тогда как при интоксикации в период декомпрессии Мх, теряя структурную целостность внутренней мембраны, практически лишена способности к адаптации, тем самым выпадая из энергообразующей функции клеток.

Как показало наше исследование, введение ПБП на фоне СДР препятствует развитию токсического поражения печени, резко выраженному при четырехчасовой декомпрессии.

Поступила 11.12.08

**Երկարատև ճգման համախտանիշի 4ժ ետճգման
ժամանակահատվածում սպիտակ առնետների լյարդի
ենթակառուցվածքային փոփոխությունների հետազոտությունը և
վերջիններիս շտկումը պրոլիմոլ հարուստ պեպտիդով**

Գ.Ռ. Կարապետյան, Ն.Ս. Քուրուրտչյան, Գ.Ա. Գևորգյան

Աշխատանքում հետազոտվել է սպիտակ առնետների լյարդի ենթակառուցվածքը 2ժ երկարատև ճգման համախտանիշի (ԵՃՀ), 4ժ ետճգման ժամանակ և նրա շտկումը պրոլիմոլ հարուստ պեպտիդով (ՊՀՊ): Փորձի ավարտից անմիջապես հետո վերցվել են լյարդի մուշկներ էլեկտրոնային մանրադիտակային հետազոտության նպատակով: ԵՃՀ-ի ժամանակ խորը արտահայտված դեստրուկտիվ փոփոխություններ չեն նկատվում, միտոքոնդրիումները (ՄՔ) ունեն լարված բնույթ, տեղի է ունենում հատիկավոր էնդոպլազմատիկ ցանցի (ՀԷՑ) ֆրագմենտացիա, ամբողջական ցանցեր չեն նկատվում: Կորիզները նորմային մոտ սահմաններում են: 4ժ ետճգման ժամանակ նկատվում են վերընշված օրգանելների պարզ արտահայտված դեստրուկտիվ փոփոխություններ: Կորիզները խոշոր են, հաճախ օվալաձև: Մք խիստ ալտուցված են, տեղ-տեղ նկատվում է մեգամիտոքոնդրիումների ձևավորման միտում: ՀԷՑ գտնվում է ֆրագմենտացիայի և վեզիկուլյացիայի գործընթացում: ՊՀՊ ներարկված խմբում մնան դեստրուկտիվ փոփոխություններ չեն նկատվում: Մք ոչ մեծ չափերի են, տեղակայված են խմբերով, ՀԷՑ ներկայացված է ցանցերով, որոնք շրջապատում են Մք և հաղորդակցվում կորիզի հետ: Կորիզները չափերով մոտ են ԵՃՀ-ի խմբում: Այսպիսով, ՊՀՊ-ի ներարկումը ԵՃՀ-ի ֆոնի վրա խոչընդոտում է լյարդի տոքսիկ վնասվածքների զարգացումը, ինչը խիստ արտահայտված է 4ժ ետճգման ժամանակ:

Investigation of white rat liver ultrastructural changes at crush syndrome during 4hr decompression and their correction with prolin-rich peptide

G.R. Karapetyan, N.S. Kukurtchyan, G.A. Kevorkian

There were investigated the morphologic changes in white rat liver at 2hr crush syndrome (CS), 4hr postCS and their correction by prolin-rich peptide (PRP). The specimens of white rat liver were taken at the end of the experiment for further electron microscopic investigation.

The results have demonstrated that at 2hr CS destructive changes of organellas are not present, mitochondria (Mch) are strained, a process of fragmentation of granular endoplasmatic reticulum (GER) on tubules take place, whole nets of the latter are not observed. Nuclei are close to norm. At 4hr post CS there take place deep destructive changes of organellas. Nuclei are large, often of oval shape. Mch are swollen, sometimes showing a tendency to form megamitochondria. GER is in the process of fragmentation and vesiculation. In the group with PRP injection such destructive changes are absent. Mch are in groups, not big in size. GER is presented with nets connected to nuclei and surrounds Mch. Nuclei sizes are close to those of the control group.

The results of the research show that PRP injection on the background of CS blocks progression of liver toxic injury, as it was at 4hr post CS.

Литература

1. Григорян Р.А. О патогенезе синдрома длительного сдавливания мягких тканей. Материалы международного симпозиума " Медицинские аспекты последствий землетрясения в Армении", 1998, Ереван, с. 118.
2. Chen H., Chan D.C. Hum. Mol. Genet., 2005;14: R283-R289.(PubMed)
3. George B. John, Yonglei Shang, Li Li, Christian Renken, et al. Bennett, AND Jiping ZhaThe Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology, Mol. Biol. Cell., 2005 March; 16(3): 1543-1554.
4. Ismailov R.M., Shevchuk N.A., Khusanov H. Mathematical model describing erythrocyte sedimentation rate. Implications for blood viscosity changes in traumatic shock and crush syndrome, Biomed. Eng. Online, 2005, 4, 1, p. 24.
5. Lameire N.H., De Vrise A.S., Vanholder R. Prevention and nondialytic treatment of acute renal failure, Curr. Opin. Crit. Care, 2003, 9, 6, p.481-490.
6. Rawlins M., Gullichsen E., Kuttala K., Peltala O., Niinikoski J. Central hemodynamic changes in experimental muscle crush injury in pigs, Europ. Surg. Res., 1999, 31, 5, p.9-18.
7. Riva A., Tandler B., Loffredo F., Vazquez E., Hoppel C. Am. J. Physiol., 2005; 289: H868-H872.
8. Sesaki H., Jensen R. E. J. Cell Biol., 1999; 147: 699-706. (PubMed)
9. Skulachev V. P. Trends Biochem. Sci., 2001; 26: 23-29. (PubMed)
10. Yoon Y. Cell Biochem. Biophys., 2004; 41: 193-144. (PubMed)
11. Yoon Y. Sci. STKE. 2005; 2005(280): 18. (PubMed)
12. Zhirnova A.A., Ryzhavskii B.Ia., Vasil'eva E.V. Morphometric analysis of changes in hepatocytes of the rabbit liver in experimental hypercholesterolemia and their reversibility, Biull. Eksp. Biol. Med., 1986 May; 101(5): 628-31.