

## МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ СИНУСОИДНЫХ КАПИЛЛЯРОВ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ВИБРАЦИИ И В ПЕРИОДЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Елена Петровна КЛЕЩЕВА, Наталья Тихоновна ЯСАКОВА, Наталья Васильевна РАССКАЗОВА,  
Галина Антоновна ВОРОНЬКО, Наталия Петровна БГАТОВА

ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава  
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

В работе представлены результаты исследования ультраструктурной организации эндотелиальных клеток синусоидных капилляров печени крыс в условиях экспериментального вибрационного воздействия и в периоде восстановления. Установлено, что в течение первых 5 суток вибрационного воздействия происходит достоверное снижение объемной плотности суммарных микропиноцитозных везикул и численной плотности рибосом, при этом возрастает объемная плотность лизосом. Данные изменения сохраняются до 30-х суток вибрационного воздействия. Отмечено волнообразное изменение объемной плотности гетерохроматина в ядрах эндотелиоцитов с достоверным снижением на 10-е и 30-е сутки вибрации. Показано, что вибрация оказывает значительное влияние на внутриклеточные процессы и период восстановления в 30 дней является недостаточным для восстановления ультраструктурной организации эндотелиоцитов.

**Ключевые слова:** вибрация, морфометрия, эндотелиоциты синусоидных капилляров печени.

Действие механических колебаний на все живое и на организм человека на протяжении всей биологической эволюции относится к очень важным экологическим факторам. Из данных литературы следует, что механические колебания (шум, вибрация) в настоящее время влияют на живые организмы во много раз интенсивнее, чем в период всей предшествующей эволюции [1, 2]. Известно, что систематическое, чрезмерное воздействие вибрации на живую систему приводит к возникновению вибрационной болезни.

Проблема приобретает первостепенную важность не только в медико-биологическом, но и социальном плане, так как во многих отраслях производства ведущим вредным фактором является вибрация. Даже в условиях сокращения виброопасных производств на долю вибрационной болезни приходится 25,8 % от общего количества хронических профзаболеваний [3].

В последние годы внимание исследователей привлекает изучение молекулярно-клеточных механизмов вибрационных повреждений. Особый интерес представляет исследование состояния печени как основного метаболического, барьерного и детоксицирующего органа. Показано, что вибрационное воздействие изменяет гомеостатические характеристики гепатоцитов, восстановление которых во многом зависит от функционального состояния микроциркуляции и трансапикалярного обмена и,

соответственно, от состояния эндотелиоцитов синусоидных капилляров [4].

Отмеченные выше факты и предопределили цель работы — исследовать возможные нарушения ультраструктуры эндотелиоцитов, вызванные вибрацией, и степень их обратимости.

### Материал и методы

В эксперименте использовали 84 самца крыс линии Вистар массой 180–200 г. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Животных подвергали ежедневной (по 1 часу) вибрации частотой 32 Гц при ускорении 50 м/с<sup>2</sup>. Крыс фиксировали на площадке вибратора вибростенда ВЭДС-100Б (Россия). Забор материала осуществляли через 5, 10, 20 и 30 дней вибрации, а также после вибрации в период восстановления на 10 и 30 день. В эксперименте исследовали 7 групп животных, из которых 1 группа была контрольная и 6 подвергались вибрации. Каждая группа состояла из 12 животных. Крыс содержали в виварии на стандартном рационе питания с соблюдением светового режима.

Для изучения образцов печени в просвечивающем режиме электронного микроскопа их фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида, приготовленном на фосфатном буфере Миллони (рН 7,2–7,4), дофиксировали в 1%-ном растворе четырехоксида осмия и после стандартной обработки заключали в

*Клещева Е.П.* — ассистент профессора кафедры биологии; e-mail: elena\_kles@mail.ru

*Ясакова Н.Т.* — д.б.н., проф., зав. кафедрой биологии; e-mail: jasakova@inbox.ru

*Рассказова Н.В.* — ст. преподаватель кафедры физики и информатики; e-mail: rasna@mail.ru

*Воронько Г.А.* — ассистент кафедры биологии

*Бгатова Н.П.* — д.б.н., проф., преподаватель кафедры анатомии, гистологии, эмбриологии и цитологии стоматологического факультета; e-mail: n\_bgatova@ngs.ru

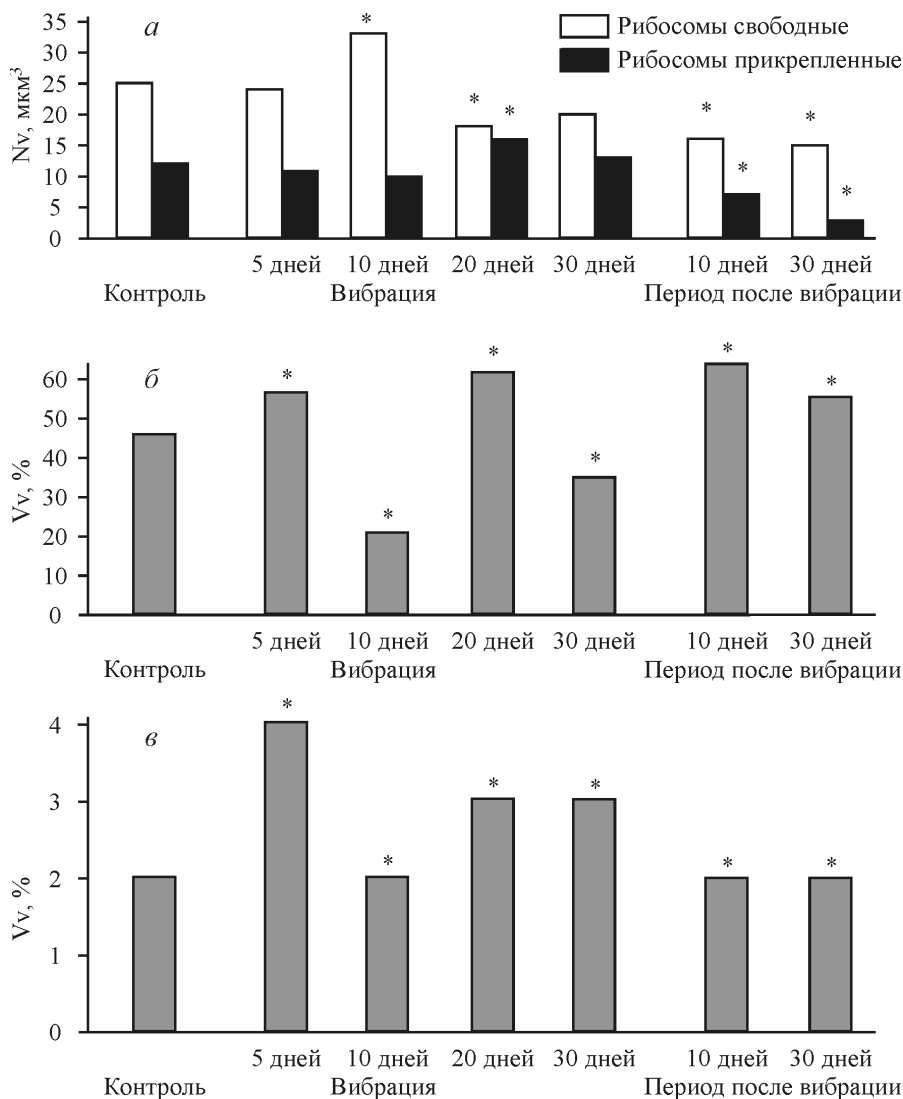
смесь эпона и аралдита. Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III (Швеция). Полутонкие срезы окрашивали толuidиновым синим. Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца исследовали в электронном микроскопе серии JEM 100S (Япония). Подготовку образцов органов, планирование и проведение морфометрических исследований выполняли в соответствии со ставшими общепринятыми принципами и методами, опубликованными в ряде отечественных и зарубежных работ [5, 6].

Эндотелиоциты синусоидных капилляров (по 20 клеток на каждую группу) морфометрировали при конечном увеличении в 35 000 раз с помощью многоцелевой открытой тестовой системы. Статистическую обработку проводили с применением программы Microsoft Exel 2007. Определяли средние выборочные показатели измеряемых объ-

ектов, ошибку среднего, среднее квадратичное отклонение, коэффициент вариации. Достоверность различия сравниваемых выборочных показателей определяли на основании критерия Стьюдента. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

При исследовании ультраструктурной организации эндотелиоцитов синусоидных капилляров печени через 5 суток вибрационного воздействия выявлено увеличение на 33 % объемной плотности лизосом, при этом значение численной плотности лизосом имело тенденцию к снижению. Численная плотность рибосом уменьшилась на 23 % (рис. 1, а). Численная и объемная плотности митохондрий достоверно не изменялись, но имели тенденцию к снижению. Суммарная объемная плотность микропиноцитозных везикул уменьшалась на 35 %, преимущественно за счет цитоплазматических (на 30 %) и базальных



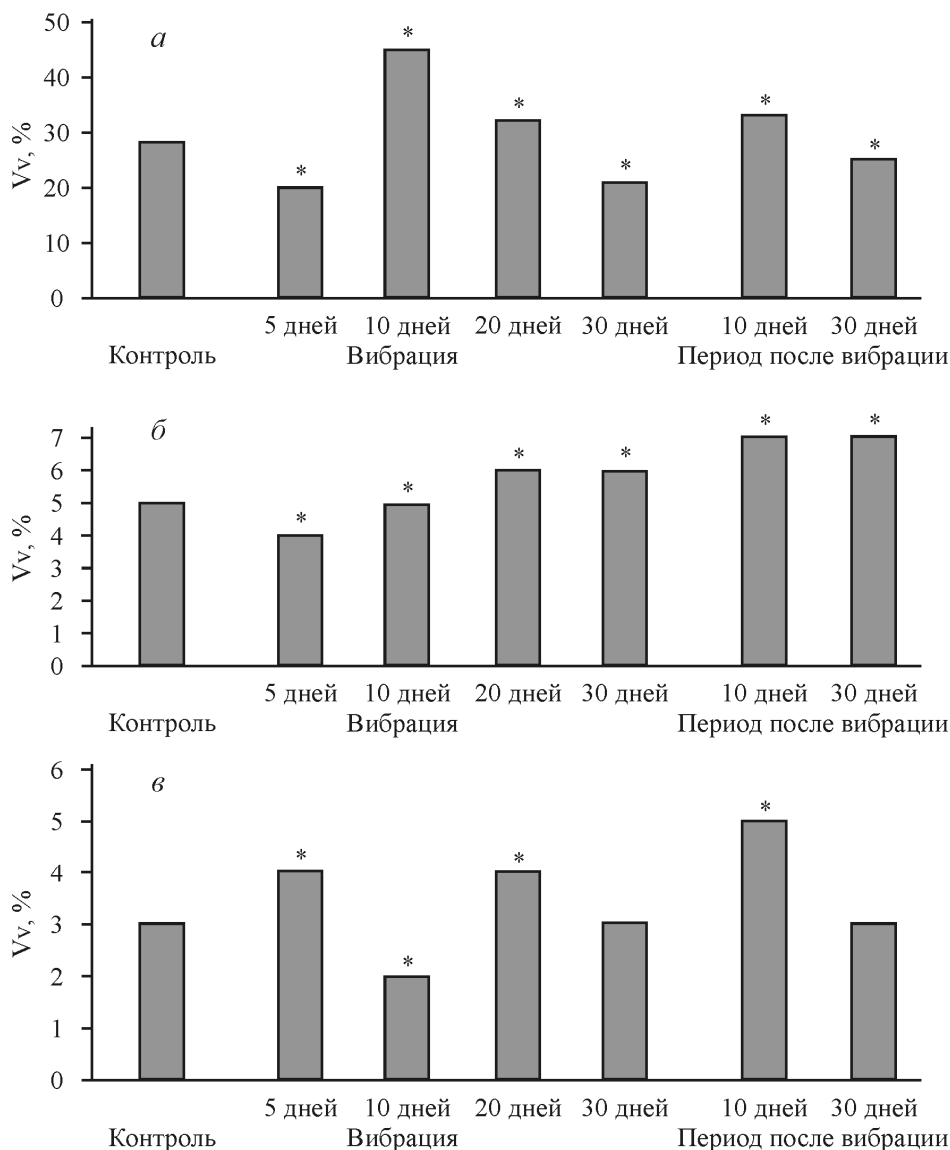
**Рис. 1.** Динамика морфометрических показателей рибосом, гетерохроматина и лизосом в эндотелиоцитах синусоидных капилляров печени крыс при вибрации и в период после вибрации; а — численная плотность свободных и прикрепленных рибосом, б — объемная плотность гетерохроматина в ядрах эндотелиоцитов, в — объемная плотность лизосом; здесь и на рис. 2: \* — отличие достоверно в сравнении с аналогичным показателем группы интактных животных ( $p < 0,05$ )

микропиноцитозных везикул (на 20 %), в то время как объемная плотность люминальных микропиноцитозных везикул достоверно не изменялась (рис. 2). Такая динамика изменений показателя может рассматриваться как структурный признак снижения интенсивности трансэндотелиального транспорта в эндотелиоцитах синусоидов печени животных, подвергавшихся вибрации. Кроме того, отмечали увеличение на 18 % объемной плотности гетерохроматина в ядрах эндотелиоцитов (рис. 1, б).

На 10-е сутки вибрационного воздействия в цитоплазме эндотелиоцитов синусоидных капилляров печени, по сравнению с показателями в контроле, было отмечено снижение объемных и численных плотностей митохондрий на 23 и 26 % соответственно. Суммарная численная плотность рибосом уменьшилась на 23 %, в основном за счет свободных полисомных рибосом. При этом численная плот-

ность прикрепленных рибосом возросла на 24 % (рис. 1, а). Объемная плотность лизосом увеличилась на 11 %, а величина их численной плотности имела лишь тенденцию к снижению. Описанные структурные изменения эндотелиоцитов синусоидов печени, по-видимому, могут быть свидетельством преобладания в цитоплазме этих клеток катболических процессов.

Суммарная объемная плотность микропиноцитозных везикул увеличилась на 28 %, причем в основном за счет цитоплазматических микропиноцитозных везикул, объемная плотность которых возросла на 50 % при снижении объемной плотности люминальных микропиноцитозных везикул на 37 % (рис. 2, б). Эти изменения можно рассматривать как морфологический показатель, свидетельствующий о сохранении сниженной активности транскapиллярного обмена. Можно также пред-



**Рис. 2.** Динамика объемной плотности микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах синусоидных капилляров печени крыс при вибрации и в период после вибрации; а — объемная плотность цитоплазматических везикул, б — объемная плотность базальных везикул, в — объемная плотность люминальных везикул

положить, что изменение концентрации везикул обусловлено нарушением структурной целостности эндотелиоцитов, связанной с возрастанием функциональной нагрузки на синусоидные капилляры печени при вибрации [4].

Существенное значение для характеристики внутриклеточных процессов имеет показатель, свидетельствующий о перестройке генома — соотношение эу- и гетерохроматина в ядре клетки [7]. Было выявлено, что объемная плотность гетерохроматина уменьшилась на 56 % по сравнению с соответствующим показателем в контроле (рис. 1, б). Данный факт, по-видимому, может быть структурным отражением транскрипции прежде заблокированных генов, возможно, обеспечивающих включение адаптивных резервов в клетке [8].

На 20-е сутки вибрации сохранялись достоверные изменения морфометрических показателей ультраструктурной организации эндотелиоцитов. Была увеличена объемная плотность гетерохроматина на 31 % по сравнению с соответствующими показателями у животных контрольной группы и на 69 % — по сравнению со значениями на 10 сутки вибрации. Объемная плотность митохондрий возросла на 18 %. Сравнительный анализ морфометрических параметров, характеризующих состояние рибосом у животных, подвергающихся вибрации, и у животных контрольной группы выявил снижение численной плотности прикрепленных рибосом на 29 % и увеличение численной плотности свободных рибосом на 26 % (рис. 1, а). Отмеченное повышение численной плотности свободных полисомальных рибосом, возможно, было направлено на восстановление внутриклеточных структур в связи с повреждающим действием вибрации.

На 30-е сутки вибрационного воздействия объемная плотность гетерохроматина в ядрах эндотелиоцитов уменьшилась на 25 % по сравнению с соответствующим показателем у животных контрольной группы (рис. 1, б). Суммарная объемная плотность микропиноцитозных везикул снизилась на 21 %. Уменьшение данного показателя преимущественно было связано со снижением на 24 % объемной плотности цитоплазматических микропиноцитозных везикул. Объемные плотности митохондрий и лизосом увеличились на 13 и 31 % соответственно, при этом их численные плотности достоверно не изменялись.

При исследовании структуры эндотелиоцитов на 10-е сутки периода восстановления (после окончания вибрационного воздействия) наблюдали снижение до исходного значения объемной плотности лизосом и увеличение их численной плотности на 8 %, что, по-видимому, можно расценивать как замедление процесса «утилизации» поврежденных вибрацией структур клетки (рис. 1, в). Объемная плотность гетерохроматина увеличилась по сравнению со значением в контроле на 25 %.

На 30-е сутки периода восстановления (30-е сутки после окончания вибрации) отмечали снижение

суммарной численной плотности рибосом на 31 %, при этом численные плотности свободных и прикрепленных рибосом уменьшались на 42 и 36 % соответственно (рис. 1, а). Отмечали тенденцию к возрастанию суммарной объемной плотности микропиноцитозных везикул, объемные плотности базальных, люминальных и цитоплазматических микропиноцитозных везикул увеличивались на 28, 32 и 17 % соответственно. Эти изменения, по-видимому, могут быть расценены как структурные признаки восстановления трансэндотелиального транспорта.

Известно, что синусоидальные эндотелиальные клетки печени выполняют важную функцию фильтрации, что обеспечивает свободное проникновение из крови в гепатоциты различных веществ [8–10]. Они обладают значительной эндоцитозной способностью для многих лигандов, включая гликопротеины, компоненты экстраклеточного матрикса, такие как фрагменты гиалуроната, коллагена, фибронектина, протеогликана хондроитин сульфата, иммунных комплексов, трансферрина и церулоплазмينا [11–13]. Синусоидальные эндотелиоциты печени могут функционировать как антиген-представляющие клетки [14–16], обеспечивая важную иммунную функцию печени — контроль иммунного ответа к циркулирующим растворимым антигенам. Следовательно, исследования структуры и функции синусоидальных эндотелиальных клеток могут способствовать пониманию механизмов иммунной толерантности в условиях патологии, связанной с вибрационной болезнью.

#### Заключение

Таким образом, в условиях вибрационного воздействия развиваются ультраструктурные изменения эндотелиоцитов печеночных синусоидов, свидетельствующие о преобладании в их цитоплазме катаболических процессов и нарушении трансэндотелиального обмена. Возрастает объемная плотность лизосом; снижаются численная плотность прикрепленных рибосом, объемная и численная плотности митохондрий, объемные плотности микропиноцитозных везикул; увеличивается объемная плотность ядерного гетерохроматина. 30 суток после окончания вибрационного воздействия — недостаточный срок для восстановления ультраструктуры эндотелиоцитов синусоидных капилляров печени и, следовательно, нормализации обменных процессов в печени.

#### Список литературы

1. Романов С.Н. Биологическое действие механических колебаний. Л., 1983. 208 с.  
*Romanov S.N. Biological effect of mechanical vibrations. L., 1983. 208 p.*
2. Усенко В.Р., Якубович Т.Г., Колмаков В.Н. О механизме биологического действия вибрации // Вибрация, шум и здоровье человека. Л., 1988. 16–19.  
*Usenko V.R., Yakubowicz T.G., Kolmakov V.N. On the mechanism of biological effect of vibration // Vibration, noise and human health. L., 1988. 16–19.*

3. Лосева М.И., Сухаревская Т.М., Бекенева Т.И. Вибрационная болезнь в условиях современного производства // Вибрационная болезнь в условиях современного производства. Новосибирск, 1980. 6–10.  
*Loseva M.I., Suharevskaya T.M., Bekeneva T.I.* Vibration disease in the conditions of modern industry // Vibration disease in the conditions of modern industry. Novosibirsk. 1980. 6–10.
4. Сухаревская Т.М., Ефремов А.В., Непомнящих Г.И. и др. Микроангио- и висцеропатии при вибрационной болезни. Новосибирск, 2000. 238 с.  
*Suharevskaya T.M., Efremov A.V., Nepomnyashchikh G.I. et al.* Mikroangio- and visceropatias in vibrating disease. Novosibirsk. 2000. 238 p.
5. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М., 1980. 216 с.  
*Avtandilov G.G.* Introduction to quantitative pathological morphology. M., 1980. 216 p.
6. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., 1990. 383 с.  
*Avtandilov G.G.* Medical morphometry. M., 1990. 383 p.
7. Эренпрейса Е.А. Организация хроматина в ядре интерфазной клетки. Рига, 1990. 117 с.  
*Erenpreisa E.A.* Organization of the chromatin in the nucleus of interfazings cells. Riga, 1990. 117 p.
8. Katz S.C., Pillarisettu V.G., Bleier J.I. et al. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T-cells // J. Immunol. 2004. 173. 230–235.
9. Daisuke T., Masayuki S., Hideki O. et al. Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity // J. Immunol. 2006. 177. 3615–3624.
10. Parker G.A., Picut C.A. Liver immunobiology // Toxic. Pathol. 2005. 33. 52–62.
11. Kano A., Wolfgang M.J., Gao G. et al. Endothelial cells require STAT3 for protection against endotoxin-induced inflammation // J. Exp. Med. 2003. 198. 1517–1525.
12. Hanck C., Manigoid T., Bocker U. et al. Gene expression of interleukin 18 in unstimulated peripheral blood mononuclear cells of patients with alcoyolic cirrhosis // Gut. 2001. 49. 106–111.
13. Lai W.K., San P.J., Zhang J. et al. Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium // Am. J. Pathol. 2006. 169. 200–208.
14. Pohiman S., Soilleux E.J., Baribaud F. et al. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans // Am. J. Pathol. 2001. 98. 2670–2675.
15. Knolle P.A., Germann T., Treichel U. et al. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells // J. Immunol. 1999. 162. 1401–1407.
16. Flohe S.B., Brugemann J., Lendemann S. et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-provoting phenotype // J. Immunol. 2003. 170. 2340–2348.

## MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE ENDOTHELIOCYTES IN THE HEPATIC SINUSOID CAPILLARIES UNDER VIBRATORY IMPACT AND IN THE RECOVERY PERIOD

Elena Petrovna KLESHCHEVA, Natalia Tikhonovna YASAKOVA, Natalia Vasilievna RASSKAZOVA,  
Galina Antonovna VORON'KO, Natalia Petrovna BGATOVA

<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University  
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52

The ultrastructural patterns of endothelial cells of sinusoid capillaries in rats' liver have been presented in the investigation. The rats were investigated under the condition of experimental vibrational impact and in the period of recovery. It has been revealed that the volume density of total micropinocytic vesicles as well as numerical density of ribosomes significantly decreases during the five days period of the vibratory exposure, though the volume density of lysosomes increases. These changes remain intact up to 30 days of the vibratory exposure. The undulating change of the volume density of heterochromatin in the endothelial cell nuclei with the significant its decrease on the 10<sup>th</sup> and the 30<sup>th</sup> day of the vibratory exposure has been revealed. The vibratory exposure is registered to have a considerable influence on the intracellular processes. It has also been shown that the recovery period of 30 days is insufficient for the restoration of the ultrastructural pattern of the endothelial cells.

**Key words:** vibration, morphometry, liver sinusoidal endothelial cells.

*Kleshcheva E.P.* — assistant professor of chair of biology; e-mail: elena\_kles@mail.ru  
*Yasakova N.T.* — doctor of biological sciences, professor, head of the chair of biology; e-mail: yasakova@inbox.ru  
*Rasskasova N.V.* — senior lecturer of the chair of physics and computer science; e-mail: rasna@mail.ru  
*Voron'ko G.A.* — assistant professor of the chair of biology  
*Bgatova N.P.* — doctor of biological sciences, professor, lecturer of the chair of anatomy, histology, embryology and cytology of stomatologic faculty; e-mail: n\_bgatova@ngs.ru