

Влияние длительности нарушения циркадных ритмов световым воздействием на морфологию печени лабораторных крыс

© С.С. Пахомий, О.В. Злобина, И.О. Бугаева, Г.Н. Маслякова, А.Н. Иванов, А.О. Москвина

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского,
410012 Саратов, Россия

e-mail: spakhomy03@gmail.com

Поступила в редакцию 20.12.2021 г.

В окончательной редакции 17.01.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

Изучено влияние длительного постоянного светового воздействия на выраженность и обратимость морфологических изменений в печени лабораторных крыс. Моделирование светового воздействия осуществляли с помощью круглосуточного воздействия искусственным освещением (в дневной период мощностью в 300 лк, в ночной — 500 лк). В ходе исследования установлено, что морфологические изменения в печени были представлены повреждением паренхимы и нарушением кровообращения, степень выраженности которых нарастала с увеличением длительности воздействия. После обеспечения в лаборатории естественного освещения наблюдалось постепенное восстановление морфологической структуры органа, что свидетельствует об обратимости выявленных изменений.

Ключевые слова: световое воздействие, циркадные ритмы, морфология, печень.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52627.34-22

Введение

В современных условиях жизни человек часто находится в условиях продолжительного действия искусственного освещения [1,2]. Нарушения светового режима, возникающие во время удлинения светового дня, например при работе в поздние и ночные часы или в результате трансмеридианных перелетов (jet lag), являются одной из причин, приводящих к десинхронизации биоритмов [3–5]. Данные изменения индуцируют развитие функциональных и структурных изменений в организме, увеличивая риск возникновения болезней сердечно-сосудистой и нервной систем, эндокринопатий и онкологических заболеваний [6,7].

Нарушение циркадианных ритмов (суточных и околосуточных), возникающее в ответ на изменения фотопериода, считается одним из мощных стрессорных факторов, оказывающих влияние на суточные колебания уровней гормонов кортизола и мелатонина в крови [5,8]. Повышение концентрации стрессорных гормонов приводит к спазму сосудов и, как следствие, развитию феномена централизации кровотока. В то же время снижение уровня мелатонина повышает функциональную активность тромбоцитов. В результате в сосудах микроциркуляторного русла в ответ на спазм происходит повышение агрегации кровяных пластинок с нарушением микроциркуляции и гемокоагуляции, уменьшение функционирования внутрисосудистого компонента и снижение эффективности транспорта веществ. Данные сосудистые нарушения вызывают развитие ишемии, которая является причиной снижения трофики клеток и тканей и проявляется повреждением паренхимы органов [9,10].

Продолжительность светового воздействия, тип режима освещения и мощность внешнего осциллятора оказывают непосредственное влияние на степень выраженности функциональных и структурных нарушений. В экспериментах [11–13] было установлено, что при длительном воздействии постоянного света у грызунов формируется ожирение и развивается сахарный диабет 2-го типа. Относительно непродолжительное пребывание (4–6 недель) в условиях 20-часового светлотемного цикла, состоящего из 10 h света и 10 h темноты (Light-Dark 10:10), приводило у лабораторных мышей к нарушениям обмена веществ, повышению массы тела и увеличению концентрации в плазме крови лептина, инсулина и триглицеридов [14]. В работе [15] было показано, что развитие данных изменений в биохимическом анализе крови лабораторных животных связано с нарушением продолжительности и качества сна. В проведенных ранее нами исследованиях [9,11] было установлено, что степень выраженности морфологических изменений, стойкость трансформации и уровень обратимости микроциркуляторных нарушений зависит от интенсивности и продолжительности светового воздействия.

Негативные последствия стрессовых ситуаций, возникающие в результате влияния на организм различных неадекватных по силе и/или продолжительности воздействия раздражителей, характеризуются развитием патологических изменений [16]. Возможность обратимости данных изменений расценивается как критерий адаптации или дезадаптации к изменившимся условиям существования. До настоящего времени остаются недостаточно изученными вопросы влияния удлиненного фотопериода с круглосуточным освещением на выра-

женность и обратимость морфологических изменений во внутренних органах. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния длительного постоянного светового воздействия на выраженность и обратимость морфологических изменений в печени.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование было выполнено на базе научных лабораторий кафедр гистологии и патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского. Эксперимент проводили на 60 белых беспородных крысах-самцах с массой тела 250 ± 20 г в соответствии с международными этическими нормами Европейской конвенции защиты позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986) и „International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals“ (2012), а также на основании рекомендаций комитета по этике ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол № 4 от 06.12.2016 г.). Эксперимент проводился в осенний период. Животные всех экспериментальных групп имели свободный доступ к воде и пище.

Для оценки влияния удлиненного фотопериода на морфологию печени животные опытных групп подвергались круглосуточному искусственному световому воздействию с использованием модели Light/Light (L/L). Модель L/L предполагает круглосуточное искусственное освещение в лаборатории в дневное время мощностью 300 лк, в ночное — 500 лк.

Исследование было разделено на две серии, в каждой серии по две опытные группы животных ($n = 12$). Первая серия была посвящена исследованию влияния длительности светового воздействия на морфологию печени: животные опытных групп подвергались круглосуточному освещению в течение 10 и 21-х суток соответственно. Забор материала проводили на следующий день после окончания эксперимента. Вторая серия исследования была направлена на изучение обратимости выявленных изменений: животные опытных групп находились в условиях круглосуточного освещения в течение 10 и 21-х суток соответственно, а далее в лаборатории восстанавливали естественное освещение. Забор материала проводили на 14 день после восстановления освещения. Временные периоды экспериментальной модели определены на основании данных о стадийности формирования стрессорных реакций в организме, которые характеризуются развитием на 10-е сутки общего адаптационного синдрома, на 21-е сутки — срывом адаптационных механизмов [17]. Животные контрольной группы находились в условиях стандартного освещения день-ночь в течение 21-х суток.

Животные всех опытных групп выводились из эксперимента путем передозировки препаратов: внутримышечная комбинация Телазола в дозе 0.2 ml/kg и Ксиланита в дозе 0.2 mg/kg.

При морфологическом исследовании образцы печени обрабатывали с использованием стандартной гистологической техники, окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления зерен пигмента гемосидерина применяли реакцию по Перлсу.

Морфометрический анализ гистологических препаратов проводили с использованием системы анализа цифровых изображений микровизора медицинского μ Vizio-101 ЛОМО в поле объектива 63 \times . При морфометрическом исследовании использовали следующие показатели: коэффициент нормализации паренхимы (КНП), количество непаренхиматозных элементов печени (НПЭ) и двуядерных гепатоцитов. КНП позволяет оценить интенсивность изменений, развивающихся на фоне длительного светового воздействия, и рассчитывается как отношение числа гепатоцитов с дистрофическими изменениями цитоплазмы к количеству гепатоцитов в состоянии некроза [11].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Statistica 10.0 (Stat Soft Inc, США). В случае отклонения распределения значений в выборке от нормального вычисляли медиану и квартили. Достоверность различий (p) рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Значимыми считали изменения при $p < 0.05$.

Результаты исследования

Установлено, что выраженность морфологических изменений в печени зависела от длительности нарушения циркадных ритмов, вызванных постоянным действием светового раздражителя. В первой серии эксперимента на 10-е сутки светового воздействия в печени наблюдалось повреждение паренхимы органа, представленное умеренной дистрофией и некрозом гепатоцитов, развитие в строме умеренно выраженного кровенаполнения, внутрисосудистого гемолиза эритроцитов и накопление в клетках Купфера в незначительном количестве зерен пигмента гемосидерина (рис. 1, 2).

Увеличение длительности эксперимента до 21-х суток сопровождалось появлением более выраженных признаков повреждения паренхимы вплоть до формирования очагов фокального некроза гепатоцитов (рис. 3). В строме органа отмечалось умеренно-выраженное полнокровие и отек, в просвете сосудов располагались тени эритроцитов и фибрин. В клетках Купфера отмечалось умеренное накопление гранул пигмента гемосидерина.

Результаты морфометрического исследования влияния длительности световой стимуляции на морфологию печени представлены в таблице.

По данным морфометрического анализа в обеих опытных группах первой серии эксперимента отмечались признаки повреждения паренхимы различной степени выраженности. Наиболее выраженные изменения наблюдались в опытной группе с длительностью светового воздействия в течение 21-х суток: отмечалось увеличение

Результаты морфометрического исследования печени

Исследуемые показатели в поле объектива 63×	Группы наблюдения				
	Контрольная группа	10 дней светового воздействия		21 день светового воздействия	
		LL	Обратимость	LL	Обратимость
Количество гепатоцитов с дистрофическими изменениями	36 [30; 43]	40 [35; 43]	36 [31; 37]	33 [29; 39]	35 [30; 43]
Количество гепатоцитов в состоянии некроза	16 [13; 19]	18 [15; 21]*	16 [14; 20]	19 [16; 22]*	17 [14; 20]
КНП	2.3 [2; 2.7]	2.2 [2; 2,5]	2.2 [2; 2,5]	1.7 [1,5; 2]*	2.0 [1,8; 2,2]*
Количество НПЭ печени	7 [5; 8]	7 [5; 8]	13 [11; 16]*	5 [4; 6]*	16 [11; 19]*
Количество двуядерных гепатоцитов	5 [3; 6]	6 [4; 8]*	4 [2; 6]	4 [2; 5]	5 [3; 7]

Примечание. * — достоверность различий с группой контроля ($p < 0.05$).

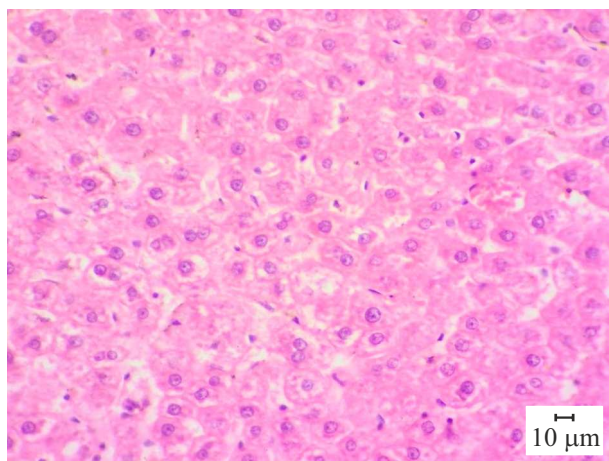


Рис. 1. Умеренно-выраженные дистрофические изменения в гепатоцитах. 10-й день светового воздействия. Окр. Г-Э. Ув. 246.4.

числа гепатоцитов в состоянии некроза до 19 [16,22] и снижение КНП до 1.7 [1.5,2]. Полученные результаты свидетельствуют о более выраженном повреждении паренхимы органа на фоне увеличения продолжительности светового воздействия.

Влияние на макрофагальную и лимфоцитарную системы органа оценивали по результатам подсчета количества НПЭ печени (лимфоцитов, клеток Купфера, клеток Ито). Число НПЭ печени на 10-й день эксперимента не отличалось от контрольной группы. Однако с увеличением длительности эксперимента до 21-х суток наблюдалось снижение данного показателя с 7 [5,8] до 5 [4,6].

Интенсивность пролиферативных процессов в печени изучали с помощью подсчета числа двуядерных гепатоцитов: на 10-й день эксперимента происходило увеличение числа двуядерных гепатоцитов до 6 [4,8], а к 21-м суткам — снижение данного показателя до 4 [2,5].

При изучении морфологического строения печени на 14-й день после окончания воздействия круглосуточ-

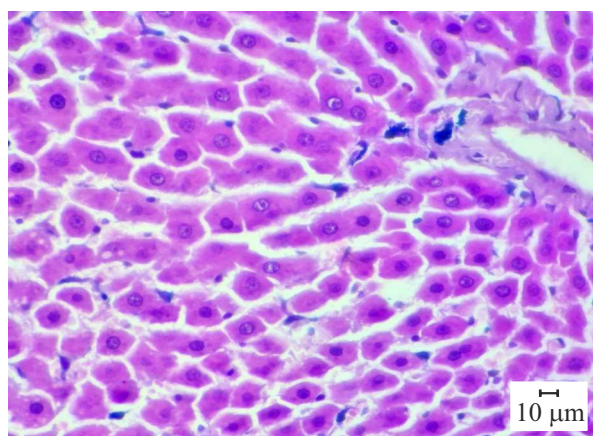
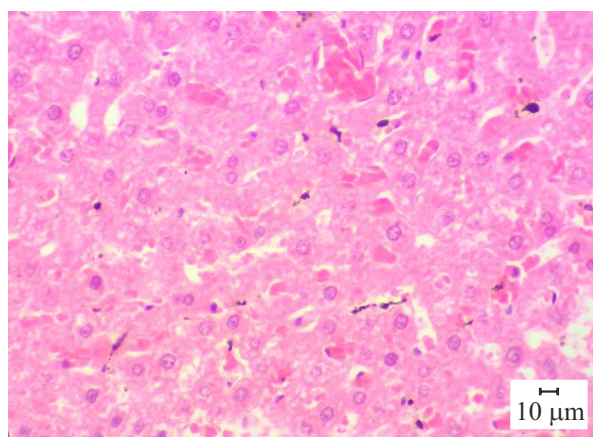


Рис. 2. Накопление пигмента гемосидерина в печени. 10-й день светового воздействия. *a* — окр. Г-Э. Ув. 246.4. *b* — окр. реакция по Перлсу. Ув. 246.4.

ного освещения отмечалось восстановление структуры органа в обеих опытных группах: уменьшение отека стромы и полнокровия сосудов, снижение выраженности дистрофии и некроза гепатоцитов (рис. 4).

По данным морфометрического исследования на 14-й день после прекращения светового воздействия в течение

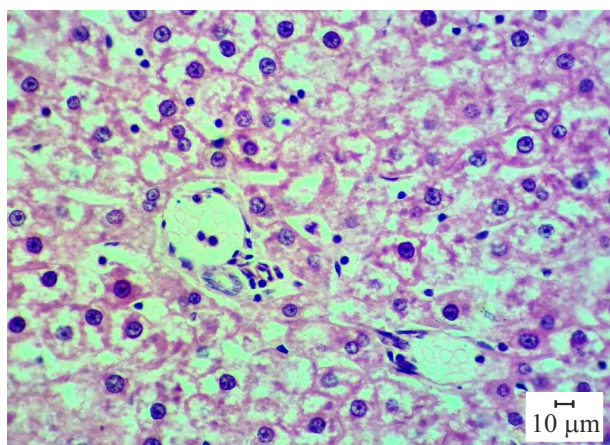


Рис. 3. Выраженные дистрофические и некротические изменения в гепатоцитах. 21-й день световой стимуляции. Окр. Г-Э. Ув. 246.4.

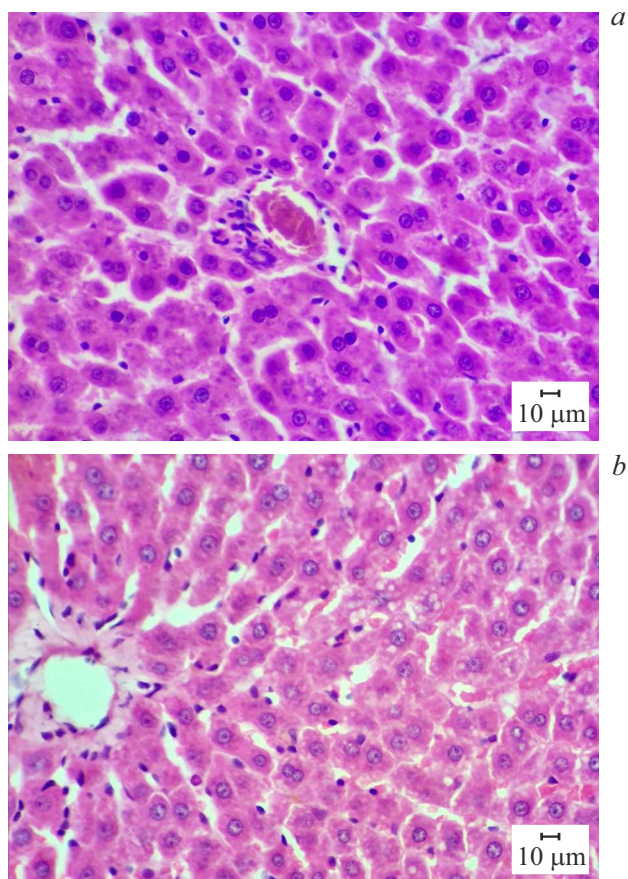


Рис. 4. Дистрофические изменения в гепатоцитах на 14-й день после окончания световой стимуляции в течение 10 суток (а) и 21-х суток (b). Окр. Г-Э. Ув. Ув. 246.4.

ние 10 дней количество гепатоцитов с дистрофическими изменениями в цитоплазме и в состоянии некроза, КНП не отличались от значений в контрольной группе. В то же время при изучении обратимости в группе с воздействием светового раздражителя в течение 21-х

суток КНП оставался ниже контрольных значений и составил 2.0 [1.8;2.2]. Полученные данные свидетельствуют о зависимости скорости восстановительных процессов паренхимы печени от длительности светового воздействия.

Морфометрические изменения со стороны моноцитарно-макрофагальной системы на 14-й день после прекращения круглосуточного светового воздействия в обеих опытных группах характеризовались резким увеличением числа НПЭ печени. Наибольшее число НПЭ было обнаружено в опытной группе с длительностью светового воздействия в течение 21-х суток — 16 [11;19], что практически в 2.5 раза превышало показатели в контрольной группе — 7 [5;8]. Полученные результаты свидетельствуют об активации процессов пролиферации и дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагальной системы. Количество двуядерных гепатоцитов в обеих опытных группах сравнивалось со значениями в контрольной группе.

В результате настоящего исследования было установлено, что длительное постоянное световое воздействие приводит к развитию повреждения паренхимы печени и нарушению кровообращения в органе, степень выраженности которых нарастала с увеличением длительности воздействия. На 10-е сутки эксперимента в печени развивались умеренно-выраженная дистрофия гепатоцитов, признаки нарушения кровообращения и пролиферации и дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагальной системы. Данная морфологическая картина, вероятнее всего, связана с активацией стресс-реализующих систем в организме и свидетельствует о развитии стадии устойчивости стресса на фоне постоянного светового воздействия. Увеличение длительности эксперимента до 21-х суток сопровождалось дальнейшим повреждением паренхимы органа и нарушением кровообращения, что свидетельствует о переходе стресса в стадию истощения. Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными и свидетельствует о развитии стрессовой реакции в организме на фоне длительного светового воздействия [9,11,18].

Восстановление естественного светового режима в лаборатории приводит к постепенной нормализации кровенаполнения органа и активации механизмов репарации паренхимы печени. Увеличение количества функционирующих клеток расценивается нами как проявление процессов регенерации, направленных на восстановление печеночной ткани.

Заключение

В результате настоящего исследования установлено, что при длительном световом воздействии в печени развивается нарушение кровообращения, дистрофия и некроз гепатоцитов, увеличение числа клеток Купфера. Выраженность морфологических изменений в печени

нарастает с увеличением длительности эксперимента и достигает максимальных значений к 21-м суткам. При обеспечении естественного освещения в лаборатории к 14-м суткам наблюдается постепенное восстановление морфологической картины печени, что свидетельствует об обратимости выявленных изменений. Интенсивность восстановительных процессов в печени зависит от длительности светового воздействия.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО „Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского“ Министерства здравоохранения РФ по теме „Разработка математической модели для оценки скорости трансформации функциональных изменений в целостном организме при световом десинхронозе в необратимые морфологические изменения органов-мишеней в эксперименте“.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] D.J. Stenvers, R. van Dorp, E. Foppen, J. Mendoza, A.-L. Opperhuizen, E. Fliers, P.H. Bisschop, J.H. Meijer, A. Kalsbeek, T. Deboer. *Sci. Rep.*, **6**, (35662) (2016). DOI: 10.1038/srep35662
- [2] Y. Cho, S.H. Ryu, B.R. Lee, K.H. Kim, E. Lee, J. Choi. *Chronobiol. Internat.*, **32** (9), 1294–1310 (2015). DOI: 10.3109/07420528.2015.1073158
- [3] J. Cedernaes, N. Waldeck, J. Bass. *Genes Dev.*, **33** (17–18), 1136–1158 (2019). DOI: 10.1101/gad.328633.119
- [4] В.А. Снежинский, Н.Ф. Побиванцева. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, **1**, 9–13 (2013).
- [5] С.Е. Koch, B. Leinweber, B.C. Drenberg et al. *Neurobiol. Stress.*, **6**, 57–67 (2017). DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.09.001
- [6] J.O. Early, A.M. Curtis. *Seminars in Immunology, Immunometabolism.*, **28** (5), 478–490 (2016). DOI: 10.1016/j.smim.2016.10.006
- [7] В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова, А.В. Букалев и др. *Вопр. онкол.*, **60** (2), 15–27 (2014).
- [8] T.A. LeGates, D.C. Fernandez, S. Hattar. *Nat Rev Neurosci.*, **15** (7), 443–454 (2014). DOI: 10.1038/nrn3743
- [9] К.И. Журкин, О.В. Злобина, А.Н. Иванов и др. *Тромбоз, гемостаз и реология*, **3** (67), 164–166 (2016). DOI: 10.15372/SSMJ20200303
- [10] P. Poredos, M.K. Jezovnik. *Angiology*, **7** (69), 564–567 (2017).
- [11] О.В. Злобина, И.О. Бугаева, С.С. Пахомий, А.Н. Иванов, Ю.А. Слюсаренко, Е.Д. Усольцева. *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*, **5**, 250–254 (2018). DOI: 10.31857/S0869813921030109
- [12] L.K. Fonken et al. *PNAS.*, **107**, 18664–18669 (2010).
- [13] C.P. Coomans et al. *FASEB journal*, **27** (4), 1721–1732 (2013). DOI: 10.1096/fj.12-210898
- [14] L.P. Casiraghi, A. Alzamendi, A. Giovambattista, J. Chiesa, A.D. Golombek. *Physiological Reports*, **4** (8), 12743 (2016). DOI: 10.14814/phy2.12743
- [15] D.J. Phillips, M.I. Savenkova, I.N. Karatsoreos. *Brain, Behavior, and Immunity*, **47**, 14–23 (2015). DOI: 10.1016/j.bbi.2014.12.008
- [16] С.Н. Ежов, С.Г. Кривошеков. *Бюлл. Сибир. отд-я РАМН*, **4**, 77–83 (2004).
- [17] В.Н. Морозов, А.А. Хадарцев. *Вестник новых медицинских технологий*, **1**, 15–17 (2010).
- [18] О.В. Злобина, С.С. Пахомий, И.О. Бугаева, Г.Н. Маслякова, А.Н. Иванов. *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*, **5**, 245–249 (2018).