

## РАЗМЕР ГЕПАТОЦИТОВ И ИХ ЯДЕР В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

*А.В. Ельчанинов, Г.Б. Большакова*

Учреждение РАМН НИИ Морфологии человека РАМН  
Москва 117418, ул. Цюрупы, д. 3

**Изучали вклад гипертрофии гепатоцитов в восстановление массы органа на модели регенерации печени плодов крыс. Достоверное увеличение размеров гепатоцитов и их ядер в регенерирующей фетальной печени крысы по сравнению с интактной не было выявлено. Таким образом, гипертрофия клеток практически не играет роли в регенерации фетальной печени, которая подчиняется тем же закономерностям, что и нормальный рост органа.**

**Ключевые слова:** регенерация, пренатальный период, гепатоциты, гипертрофия.

После частичной гепатэктомии восстановление массы печени млекопитающих в постнатальном периоде происходит за счет митотического деления и гипертрофии гепатоцитов в остатке органа [1,12]. Кроме того, в ходе регенерации увеличивается плоидность ядер гепатоцитов [2,6]. Вклад митотического деления гепатоцитов и их гипертрофии в регенерацию печени зависит от возраста животного. В раннем постнатальном периоде масса печени восстанавливается в основном за счет гиперплазии гепатоцитов, а у взрослых и стареющих животных все большее значение приобретает гипертрофия [1,13]. Причины этого явления не совсем ясны, хотя начато изучение его молекулярных механизмов. Так, обнаружено, что у интактных молодых мышей размножение гепатоцитов обратимо блокирует фактор транскрипции  $C/EBP\alpha$ , который связывается с ДНК и стимулирует выработку ингибитора циклинзависимых киназ - белка p21. У старых особей в печени накапливается модифицированный  $C/EBP\alpha$ , который репрессирует E2F-зависимые промоторы и их гены, в том числе ген, кодирующий клеточный рецептор HGF. Смена способа подавления митотического размножения гепатоцитов с возрастом приводит к увеличению вклада их гипертрофии в регенерацию печени [7,11].

Ранее мы установили, что печень 17- суточного плода крысы после удаления 20% ткани восстанавливает массу через 2 суток за счет митотического деления гепатоцитов [3]. Целью данной работы было оценить роль гипертрофии гепатоцитов при регенерации печени плода крысы.

### **Материалы и методы**

Под эфирным наркозом выполняли резекцию 20% печени 17-суточным плодам белых крыс по ранее описанной методике [3]. В качестве контроля были использованы неоперированные однопометные крысята. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 1, 2, 3, 7, 10, 14, 25 сут после операции. Опытные и контрольные группы состояли из 7-10 животных. Работу с лабораторными животными осуществляли в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторных исследований и этическими нормами. Эксперименты были разрешены комиссией по биоэтике НИИ морфологии человека РАМН.

Для определения ядерно-цитоплазматических отношений гепатоцитов готовили мазки-отпечатки печени, фиксировали их метиловым спиртом, окрашивали гематоксилином и эозином. На цифровых микрофотографиях, сделанных при увеличении  $\times 1500$ , с помощью планшета обводили контуры гепатоцитов и их ядер (100 гепатоцитов на каждое животное). Площадь ядра и цитоплазмы определяли в программе Image Scope M.

Для показателей площади вычисляли средние значения и стандартное отклонение, для процентной доли - среднее значение и стандартную ошибку среднего. Границы 95%-ных доверительных интервалов для долей рассчитывали с помощью  $F$ -критерия. Абсолютные показатели при нормальном распределении сравнивали с помощью критерия Стьюдента. При распределении, отличающемся от нормального, использовали тест Манна-Уитни. Сравнение двух выборочных долей проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Для выявления корреляции определяли коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали значимыми при 5% уровне

достоверности. Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc.).

### Результаты и их обсуждение

Таблица 1

#### Размеры гепатоцитов и их ядер

Срок после операции, сутки	опыт			контроль		
	S Я, мкм <sup>2</sup>	S Г, мкм <sup>2</sup>	ЯЦО, %	S Я, мкм <sup>2</sup>	S Г, мкм <sup>2</sup>	ЯЦО, %
1	101,2±8,3	444,8±28,3	22,8±1,9	93,6±6,3	410,8±29,1	22,8±2,1
2	85,8±7,2	335,8±34,8	25,6±2,4	87,7±8,1	333,9±35,2	26,3±2,4
3	79,2±3,5	354,5±14,9	22,5±2,2	70,5±14,2	322,2±40,7	22,5±2,3
7	87,3±5,0	351,6±13,0	24,8±2,3	81,7±3,6	338,9±18,2	24,1±2,3
10	78,7±19,6	369,2±93,8	21,3±2,1	72,3±10,4	355,3±42,8	20,3±2,1
14	68,9±1,8	292,7±20,3	23,5±2,5	71,0±4,4	288,5±22,7	24,6±2,5
25	58,2±8,7	339,3±51,6	17,2±2,0	54,1±9,7	324,4±40,2	16,7±2,1

Примечание: Я – ядро, Г – гепатоцит, ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение

Результаты определения площади гепатоцитов и их ядер представлены в табл.1, рис.1, рис.2. С возрастом площадь гепатоцитов и их ядер в оперированной и интактной печени статистически значимо снижается ( $p < 0,05$ ), при этом площадь одноядерных гепатоцитов и их ядер, ядерно-цитоплазматические отношения гепатоцитов в опытных группах ни на одном из сроков исследования не отличались от контроля ( $p > 0,05$ ). Корреляционный анализ выявил сильную положительную корреляцию между площадью ядер в опытных и контрольных группах ( $r = 0,75$ ,  $p = 0,0038$ ), а также между площадью гепатоцитов в опытных и контрольных группах ( $r = 0,857$ ,  $p = 0,006$ ). Двухядерные гепатоциты в мазках-отпечатках печени подопытных и контрольных животных выявлялись в незначительном количестве только через 25 сут после резекции (21 сут постнатальной жизни).

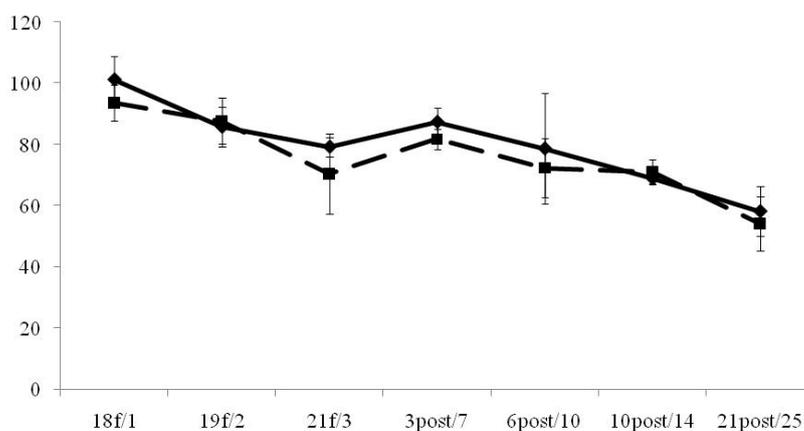


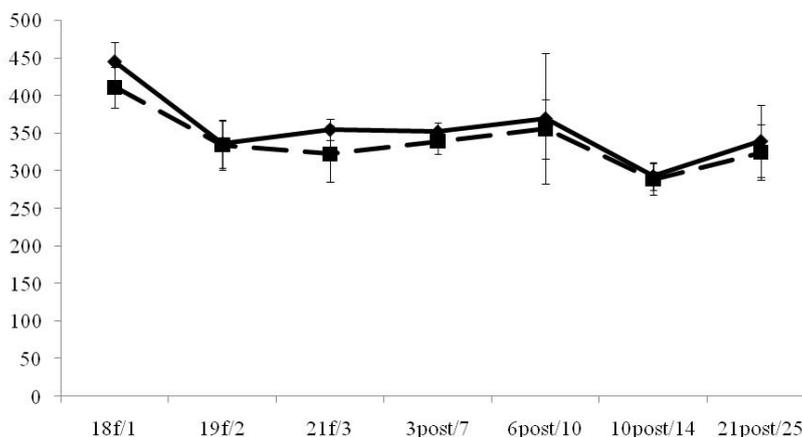
Рис. 1. Площадь ядер гепатоцитов.

По оси абсцисс – сутки после операции, по оси ординат – площадь в мкм<sup>2</sup>. Сплошная линия – опыт, пунктирная линия – контроль, планки погрешности – доверительные интервалы, f-фетальный период, post – постнатальный период

Гипертрофия гепатоцитов обычно сопровождается полиплоидизацией их ядер [2,6]. Образование двухядерных клеток в результате ацитокинетического митоза является ключевым этапом в процессе полиплоидизации гепатоцитов [2,9]. На основании того, что у плодов крысы практически все гепатоциты одноядерные и диплоидные, а размер ядра пропорционален его ploidy [2,6], то появление двухядерных паренхимных клеток и увеличение их ядер можно рассматривать как косвенный показатель начала полиплоидизации в печени.

Поскольку двухядерные гепатоциты были обнаружены нами в небольших количествах, как в опытной, так и контрольной группе лишь спустя значительное время после завершения

восстановления массы печени плодов крысы, а увеличение площади гепатоцитов и их ядер не выявлено, то можно предположить, что в ходе регенерации фетальной печени повышения ploидности гепатоцитов не происходит.



**Рис.2.** Площадь гепатоцитов.  
Обозначения те же, что на рис. 1.

Существует мнение, что повышение ploидности гепатоцитов печени является механизмом защиты наследственного материала от окислительного повреждения [4]. Так, при увеличении функциональной нагрузки на печень, например, при переходе крысят от грудного вскармливания к самостоятельному питанию твердой пищей или после частичной гепатэктомии в гепатоцитах отмечаются признаки окислительного стресса. Они находят выражение в снижении общего содержания глутатиона, активности каталазы, окислительном повреждении ДНК (появление 8-гидроксигуанина) и повышении уровня пероксидного окисления липидов [6,10]. В этих же условиях повышается и ploидность гепатоцитов [5,8]. Таким образом, гипертрофию гепатоцитов и полиploидизацию их ядер можно рассматривать как адаптацию к повышенной функциональной нагрузке [2,6,10].

Печень в пренатальном периоде не несет большой функциональной нагрузки. Резекция фетальной печени в объеме 20% также, видимо, не приводит к резкому рабочему напряжению органа. Вероятно, поэтому размер гепатоцитов, а также и их ядер не увеличивается, что, видимо, свидетельствует об отсутствии полиploидизации гепатоцитов.

Выявленная сильная положительная корреляция между площадью гепатоцитов и их ядер регенерирующей и интактной печени свидетельствует о том, что процесс регенерации фетальной печени подчиняется тем же закономерностям, что и нормальный рост органа.

#### **Выводы**

Регенерация фетальной печени крыс происходит исключительно за счет пролиферации гепатоцитов. Гипертрофия клеток практически не играет роли в этом процессе.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспективы / Бабаева А.Г. – М.: Издательство РАМН, 2009. – 336 с.
2. Бродский В.Я. Клеточная полиploидия. Пролиферация и полиploидия / Бродский В.Я., Урываева И.В. – М.: Наука, 1981. – 259 с.
3. Ельчанинов А.В. Репаративная регенерация печени плодов крыс после частичной гепатэктомии / Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 9. – С. 352-355.
4. Anatskaya O.V. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: Evidence from gene expression in mammalian heart and liver / Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. // Genomics. – 2007. – Vol. 89. – P. 70–80.
5. Gorla G.R. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells / Gorla G.R., Malhi H., Gupta S. // Journal of Cell Science. – 2001. – Vol.114. – P. 2943-2951.

6. Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control / Gupta S. // Seminar in Cancer biology. — 2000. — Vol. 10.— P.161–171.
7. Iakova P. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPa growth arrest / Iakova P., Awad S.S., Timchenko N.A. // Cell. — 2003. — Vol.113. — P. 495–506.
8. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis / Margall-Ducos G. et al. // Journal of Cell Science. — 2007 — Vol. 120 — P. 3633-3639.
9. Nadal C. Polyploïdie somatique dans le foie de rat I. Le rôle des cellules binucléées dans la genèse des cellules polyploïdes / Nadal C., Zajdela F. // Experimental Cell Research. — 1966. — Vol.42. — P. 99-116.
10. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events / Sigal S.H. et al. // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. — 1999. — Vol. 276. — P.1260-1272.
11. Pregnancy restores the regenerative capacity of the aged liver via activation of an mTORC1-controlled hyperplasia/hypertrophy switch / Gielchinsky Y. et al. // Genes & Development. — 2010. — Vol.24. — P. 543–548.
12. Sánchez A. Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation / Sánchez A., Fabregat I. // World Journal of Gastroenterology. — 2010. — №16, Vol.41. — P. 5148-5161.
13. Timchenko N.A. Aging and liver regeneration / Timchenko N.A. // Trends in Endocrinology & Metabolism. — 2009. — №4, Vol.20. — 171-176.

#### CELL AND NUCLEAR SIZE IN THE REGENERATING FETAL LIVER OF RATS

A.V. Elchaninov, G.B Bolshakova.

**The contribution of hypertrophy of hepatocytes in the recovery of body mass on the model of liver regeneration in the rat fetus was studied. Significant increase in the size of hepatocytes and their nuclei in the regenerating liver of fetal rats in comparison with an intact were not detected. Thus, hypertrophy of the cells virtually played no role in the regeneration of the fetal liver, which is subject to the same rules as the normal growth of the body.**

**Key Words:** regeneration, liver, prenatal period, hepatocytes, hypertrophy

Ельчанинов А.В. – очный аспирант лаборатории роста и развития УРАМН НИИ Морфологии человека РАМН;  
[morfolhum@mail.ru](mailto:morfolhum@mail.ru)