

## МОРФОМЕТРИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА ГЕПАТОЦИТОВ НОРМАЛЬНОЙ И ЦИРРОТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

© Н. Н. Безбородкина,<sup>1</sup> С. В. Оковитый,<sup>2</sup> М. В. Кудрявцева,<sup>1</sup> О. В. Кирик,<sup>3</sup>  
И. В. Зарубина,<sup>2</sup> Б. Н. Кудрявцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, <sup>2</sup> Военно-медицинская академия и

<sup>3</sup> ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: cellpath@mail.cytspb.rssi.ru

Проведены морфометрическое электронно-микроскопическое исследование митохондриального аппарата гепатоцитов и морфофункциональный анализ степени патологических изменений в печени крыс СС14-циррозом (опытная группа). Хроническое отравление крыс СС14 в течение 6 мес приводит к увеличению доли соединительной ткани в 4.2 раза и уменьшению числа гепатоцитов в печени на 21.8 %. Сухая масса и плоидность гепатоцитов в цирротической печени возрастали по сравнению с нормой в среднем на 20.6 и 9.3 % соответственно. Активности аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в крови крыс опытной группы превышали норму в 2.0 и 1.4 раза соответственно. При циррозе концентрация общего билирубина в крови увеличивалась в 1.7 раза, а концентрация общего белка снижалась на 22 %. Концентрация диеновых конъюгатов в печени крыс опытной группы увеличивалась в 2.1 раза по сравнению с нормой, а уровни малонового диальдегида — на 34 %. Активность супероксиддисмутазы и каталазы при циррозе была ниже, чем в нормальной печени, на 16 и 23 % соответственно. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов показала, что, несмотря на увеличение объемной плотности митохондрий в гепатоцитах цирротической печени (на 28 %), концентрация внутренних мембран митохондрий в клетках уменьшалась почти в 1.5 раза, а общая протяженность внутренних мембран в одной митохондрии — примерно вдвое по сравнению с нормой. Таким образом, несмотря на компенсацию частичной потери гепатоцитов за счет усиления их полиплоидизации и гипертрофии, специфическая синтетическая активность клеток при циррозе снижена вследствие ослабления антиоксидантной системы и электрон-транспортной цепи митохондриального аппарата.

Ключевые слова: цирроз печени, гепатоциты, митохондрии, четыреххлористый углерод.

Принятые сокращения: АлАТ — аланинаминотрансфераза, АсАТ — аспартатаминотрансфераза, ДК — диеновые конъюгаты, КВММ — концентрация внутренних мембран митохондрий, МДА — малоновый диальдегид, ОПМ — объемная плотность митохондрий, ПОЛ — перекисное окисление липидов, СОД — супероксиддисмутазы, ЦП — цирроз печени.

Циррозы печени (ЦП) различной этиологии — широко распространенные и крайне опасные для жизни человека хронические заболевания, число которых во многих странах постоянно растет (Mathews et al., 2006; Smith, 2006). ЦП характеризуется разрастанием соединительной ткани, перестройкой сосудистого русла паренхимы, гибелью значительной части гепатоцитов и целым рядом других изменений, ведущих к потере дольковой структуры органа. В результате оставшиеся гепатоциты вынуждены выполнять свои функции в условиях недостаточного снабжения различными субстратами и гипоксии (Rose et al., 1997). Гипоксия ведет к повышению уровней НАД(Ф)Н, увеличению продукции лактата, снижению потребления кислорода клетками, а также к другим изменениям (Hoek, 1994; Cunningham et al., 2001), которые предполагают нарушение функции митохондрий при циррозе.

Действительно, во многих работах показано, что развитие ЦП сопровождается значительными структурными и функциональными изменениями митохондриального аппарата гепатоцитов (Huang et al., 2003; Spahr et al., 2003;

Welt et al., 2004). Большинство имеющихся в настоящее время данных свидетельствует о том, что функция электрон-транспортной цепи митохондрий при циррозе заметно ослабляется (Krähenbühl et al., 1992, 2000; Fernandez-Checa et al., 1993; Huang et al., 2003; Spahr et al., 2003). Следствием снижения активности дыхательной цепи является снижение эффективности окислительного фосфорилирования и уменьшение продукции АТФ митохондриями (Fernandez-Checa et al., 1993; Fukumura et al., 2003; Young et al., 2006). Показано также, что при различных поражениях печени количество крист в митохондриях уменьшается, в гепатоцитах нередко наблюдаются гигантские митохондрии, длина которых может достигать 10 мкм, что сопоставимо с диаметром ядра клетки (Robertson et al., 1992; Welt et al., 2004).

Следует, однако, отметить, что данные о функциональном состоянии митохондриального аппарата гепатоцитов при циррозе не столь однозначны. В ряде работ показано, что активность ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов при различных хронических

поражениях печени не отличается от нормы (Morimoto et al., 1988; Nozu et al., 1992; Yang et al., 2004). Более того, некоторые авторы нашли, что объемная плотность митохондрий в гепатоцитах цирротической печени увеличивается, и это свидетельствует о значительных регенераторных и компенсаторных возможностях митохондриального аппарата клеток (Krähenbühl et al., 1992; Krähenbühl, Reichen, 1992).

По-видимому, одной из главных причин противоречивости данных о состоянии энергетического метаболизма клеток в цирротически измененной печени является то, что авторы используют в своих работах разные экспериментальные модели цирроза (Krähenbühl et al., 1992; Fernandez-Checa et al., 1993; Fukumura et al., 2003; Huang et al., 2003; Yang et al., 2004). Различия моделей ЦП включают в себя не только применение в ходе эксперимента разных повреждающих агентов поодиночке или в сочетании, разную их концентрацию, продолжительность воздействия на животных, но также разные критерии оценки конечного результата. Как следствие степень патологических изменений в печени, достигаемая в подобных экспериментах, может сильно варьировать, тем самым значительно осложняя сравнение данных, получаемых разными авторами.

В настоящей работе проведено исследование митохондриального аппарата гепатоцитов у контрольных крыс и крыс, подвергавшихся длительному хроническому отравлению четыреххлористым углеродом ( $CCl_4$ ). Уровень патологических изменений в печени оценивали на основании анализа гистологических, биохимических и цитологических данных. При изучении состояния митохондриального аппарата гепатоцитов в нормальной и цирротической печени использовали морфометрический метод, основанный на определении концентрации внутренних мембран митохондрий и других параметров митохондрий на изображениях, полученных с помощью электронной микроскопии.

## Материал и методика

**Экспериментальные животные.** Исследования проведены на 10 белых беспородных крысах-самцах, которые в начале эксперимента были разделены на две группы по 5 животных. Животных одной группы (опытной) в герметичной камере в течение 6 мес по 20 мин 3 раза в 1 нед подвергали хроническому ингаляционному воздействию паров  $CCl_4$  (7 мл на 100 л объема) для получения экспериментального цирроза печени. Животных другой группы не подвергали воздействию  $CCl_4$  и использовали в качестве контроля. В начале эксперимента масса тела крыс, которых содержали на стандартном пищевом рационе, составляла 130—140 г, а через 6 мес в обеих группах — 250—300 г.

Животных опытной группы через 1 нед после прекращения воздействия  $CCl_4$  и ночного голодания подвергали декапитации. Животных контрольной группы декапитировали также после ночного голодания. Полученный материал (кровь и кусочки печени) использовали для проведения биохимических, цитофотометрических и электронно-микроскопических исследований.

**Гистологические препараты.** Кусочки печени крыс фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, заливали в парафиновые блоки, из которых приготавливали срезы толщиной около 5 мкм. Срезы ткани окрашива-

ли гематоксилином—эозином по Романовскому и пикрофуксином по Ван Гизону (Пирс, 1962). Относительный объем соединительной ткани и паренхимы печени крыс на срезах определяли по методу Вайбеля (Weibel, 1979), используя окулярную сетку (16 × 16), об. 25 × 0.50, ок. 8×.

**Биохимическое исследование крови.** Концентрацию общего билирубина (Gambino, Freda, 1966), активность аламинотрансферазы (АлАТ) (Henry et al., 1960) и аспартаминотрансферазы (АсАТ) (Henry et al., 1960) в сыворотках крови крыс контрольной и опытной групп определяли с помощью автоматических биохимических анализаторов SMA-12/16 (Technicon Instruments Corporation, США) и Abbot-spectrum (Abbot Laboratories s. a., США).

Для оценки активности антиоксидантной системы и процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) использовали 10%-ные гомогенаты ткани, приготовленные на 25 мМ Трис-НСl буфере с добавлением 175 мМ КСl (рН 7.4).

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по торможению восстановления нитросинего тетразолия в присутствии НАДН и феназин-метасульфата (Дубинина, 1983). Активность каталазы определяли по скорости разложения перекиси водорода (Luck, 1971). Активность изучаемых ферментов относили к содержанию (в мг) белка в пробах, который определяли по методу Лоури (Lowry, 1951).

Концентрацию продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) — определяли по методам Романовой с сотрудниками (1977) и Учигама и Мичера (Uchigama, Michera, 1978) соответственно.

Для определения плоидности клеток препараты-мазки изолированных гепатоцитов окрашивали на ДНК по Фельгену, используя реактив типа Шиффа аурмин- $SO_2$  (Кудрявцев, Розанов, 1974). Гидролиз препаратов проводили в 6 н. НСl при 20—22 °С в течение 8 мин.

Содержание ДНК в ядрах гепатоцитов после заключения препаратов в нефлуоресцирующее вазелиновое масло измеряли с помощью импульсного микрофлуориметра РИФ-1 (Кудрявцев и др., 1979). На основании определения содержания ДНК в клетках судили о степени их плоидности. При измерениях использовали объектив 40 × 0.65, а в качестве источника света — ртутную лампу ДРШ-250-2. Для выделения возбуждающего света (длины волн 404 и 436 нм) применяли комбинацию светофильтров ФС-1 (8 мм) и СЗС-24 (4 мм). Для выделения света люминесценции (длина волны 526—528 нм) окрашенных аурмином- $SO_2$  клеток использовали комбинацию светофильтров ЖС-18 (1.5 мм) и ЖЗС-19 (1.5 мм). Поиск и фокусировку исследуемых клеток проводили в зеленом свете при настройке микроскопа по методу фазового контраста, используя лампу накаливания. На каждом препарате измеряли по 300 гепатоцитов, случайно выбранных в различных участках препарата. Среднюю плоидность клеток  $g$  рассчитывали по формуле:  $g = \sum n_i \cdot 2^i$  (Делоне и др., 1987), где  $n_i$  — относительное число гепатоцитов  $i$ -того класса плоидности ( $i = 0$  — диплоидный класс,  $i = 1$  — тетраплоидный и т. д.).

Сухую массу гепатоцитов крыс на препаратах-мазках измеряли с помощью интерференционного микроскопа МБИН-4 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Измерения включали в себя два этапа. Вначале определяли оптическую разность хода лучей для клетки и среды, используя в качестве заключающей среды глицерин. Затем с по-

мощью анализатора изображений измеряли площадь клетки (в  $\mu\text{м}^2$ ). Сухую массу гепатоцитов  $P$  (в  $\mu\text{г}$ ) рассчитывали по формуле  $P = \delta S / 100\alpha$ , где  $S$  — площадь клетки,  $\mu\text{м}^2$ ;  $\alpha$  — удельное приращение показателя преломления, которое для белков в глицерине составляет  $0.00095 \text{ см}^3 / \text{г}$ ;  $\delta$  — разность хода лучей (в  $\text{см}^2$ ), которую определяли по формуле  $\delta = (\varphi_1 - \varphi_2) \lambda / K$ , где  $\delta$  — разность хода лучей,  $\varphi_1, \varphi_2$  — отсчеты по шкале компенсатора Сенармона,  $\lambda$  — длина волны излучения (526 нм),  $K = 180$  град.

Электронная микроскопия. Фиксацию ткани печени крыс для электронно-микроскопических исследований проводили по методу, описанному ранее (Гайер, 1974). Образцы печени фиксировали в течение 24 ч при  $4^\circ\text{C}$  в 2.5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4). Последующую фиксацию ткани печени проводили в течение 2 ч при комнатной температуре 1%-ным раствором  $\text{OsO}_4$  на том же буфере. После этого кусочки обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (30—40—50—60—70—80—90—96—100%). Одновременно с обезвоживанием образцы контрастировали уранил-ацетатом. Для этого в спирты начиная с 70%-ного добавляли уранил-ацетат до концентрации 0.5—1.0%. После обезвоживания в этаноле образцы заключали в Арадит по описанному методу (Glouert, Glouert, 1958). Ультратонкие срезы, приготовленные с помощью ультратома LKB III (Швеция), помещали затем на медные сетки и дополнительно контрастировали нитратом свинца. Фотографическую съемку образцов ткани проводили с помощью электронного микроскопа GEM-100 CX (Япония) при увеличении 8000 $\times$  или 20 000 $\times$ .

Для определения объемной плотности митохондрий (ОПМ) и их относительного количества в клетках использовали электронограммы, полученные при увеличении электронного микроскопа 8000 $\times$ . Объемную плотность митохондрий измеряли с помощью анализатора изображений «Видеотест» (ООО Иста Видеотест, Санкт-Петербург), включающего в себя микроскоп ЕС-Бимам, цифровую CCD-камеру СРТ-8360 (США) и компьютер типа IBM (Штейн и др., 1998). Долю объема клетки (в %), занимаемую митохондриями, определяли как отношение площади, занимаемой митохондриями в цитоплазме гепатоцита, к общей площади цитоплазмы клетки.

Определение концентрации внутренних мембран митохондрий в гепатоцитах. Периметр митохондрий и длину их крист измеряли с помощью анализатора изображений «Видеотест» на электронограммах, полученных при увеличении микроскопа 20 000 $\times$ . Концентрацию внутренних мембран митохондрий (КВММ) на постоянной площади клетки ( $\mu\text{м}^{-1}$ ) рассчитывали по формуле  $\text{КВММ} = (p + 2l)n$ , где  $p$  — средний периметр митохондрий,  $l$  — средняя длина крист в одной митохондрии,  $n$  — количество митохондрий на единицу площади гепатоцита.

При определении различных параметров митохондрий на электронограммах гепатоцитов использовали по 5 крыс из контрольной и опытной групп, при этом у каждого животного измеряли по 20—25 клеток.

Для оценки состояния микросомальной системы печени, метаболизующей ксеноботики, у крыс определяли продолжительность гексеналового сна. Гексенал вводили внутрибрюшинно в дозе 80 мг/кг (Verly, 1976).

Статистическую обработку результатов, которая включала в себя в основном анализ достоверности различий средних величин по критерию Стьюдента, проводили при использовании стандартного пакета программ для персонального компьютера IBM — SigmaPlot for Windows 9.0.

## Результаты

Морфометрия паренхимы, уровни плоидности и сухая масса гепатоцитов. Гистологическое исследование срезов печени крыс показало, что у контрольных животных структура паренхимы типична для нормального органа. Она характеризуется радиально расположенными трабекулами гепатоцитов вокруг центральных сосудов, небольшим количеством соединительной ткани и четко выраженными границами портальных сосудов и желчных протоков (рис. 1, а).

У крыс, подвергавшихся в течение 6 мес отравлению  $\text{CCl}_4$ , развивался типичный цирроз печени, который характеризовался заметным увеличением количества соединительной ткани, появлением очагов лейкоцитарных инфильтратов, а также нарушением дольковой структуры органа (рис. 1, б—г).

Морфометрический анализ нормальной и цирротической измененной печени показал, что доля паренхимы при циррозе уменьшалась на 5%, а доля соединительной ткани увеличивалась в 4.2 раза по сравнению с нормой ( $P < 0.001$ ). В результате паренхима в нормальной печени занимала  $88.0 \pm 1.1\%$ , а в цирротической —  $83.0 \pm 1.5\%$  ( $P < 0.05$ ). Известно, что сухая масса печени составляет около 27% ее сырой массы (Siess et al., 1976). Следовательно, паренхима в 1 г сухой ткани нормальной и цирротической печени составляет 237.6 мг (270 мг/г · 0.88) и 224.1 мг (270 мг/г · 0.83) соответственно.

Средняя сухая масса гепатоцита в нормальной и цирротически измененной печени, по нашим данным, равнялась  $957 \pm 29$  и  $1154 \pm 68$  пг соответственно ( $P < 0.05$ ). Таким образом, число гепатоцитов в 1 г нормальной печени составляло  $(2.48 \pm 0.15) \cdot 10^8$  (237.6 мг/957 пг), а в 1 г цирротической —  $(1.94 \pm 0.16) \cdot 10^8$  (224.1 мг/1154 пг). Полученные данные свидетельствуют о том, что цирроз приводит к уменьшению числа гепатоцитов на 21.8% ( $P < 0.05$ ).

Цитофотометрия ДНК в ядрах гепатоцитов позволила установить, что цирротически измененная печень по сравнению с нормальным органом характеризуется увеличением доли одноядерных октаплоидных клеток в 2.4 раза ( $P < 0.01$ ), появлением двуядерных клеток с 8с-ядрами, а также уменьшением доли (2с×2)-гепатоцитов в 1.4 раза ( $P < 0.05$ ). Средний уровень плоидности гепатоцитов крыс опытной группы ( $5.17 \pm 0.08c$ ) был увеличен по сравнению с контролем ( $4.73 \pm 0.04c$ ) на 9.3% ( $P < 0.05$ ).

Биохимические показатели крови крыс контрольной и опытной групп. Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что цирроз печени у крыс сопровождался повышением уровней АлАТ и АсАТ (в 2.0 и 1.4 раза соответственно), а также увеличением в 1.7 раза концентрации общего билирубина в крови. В то же время концентрация общего белка в крови крыс опытной группы была снижена на 22% (табл. 1).

Активность про- и антиоксидантных систем в печени крыс контрольной и опытной

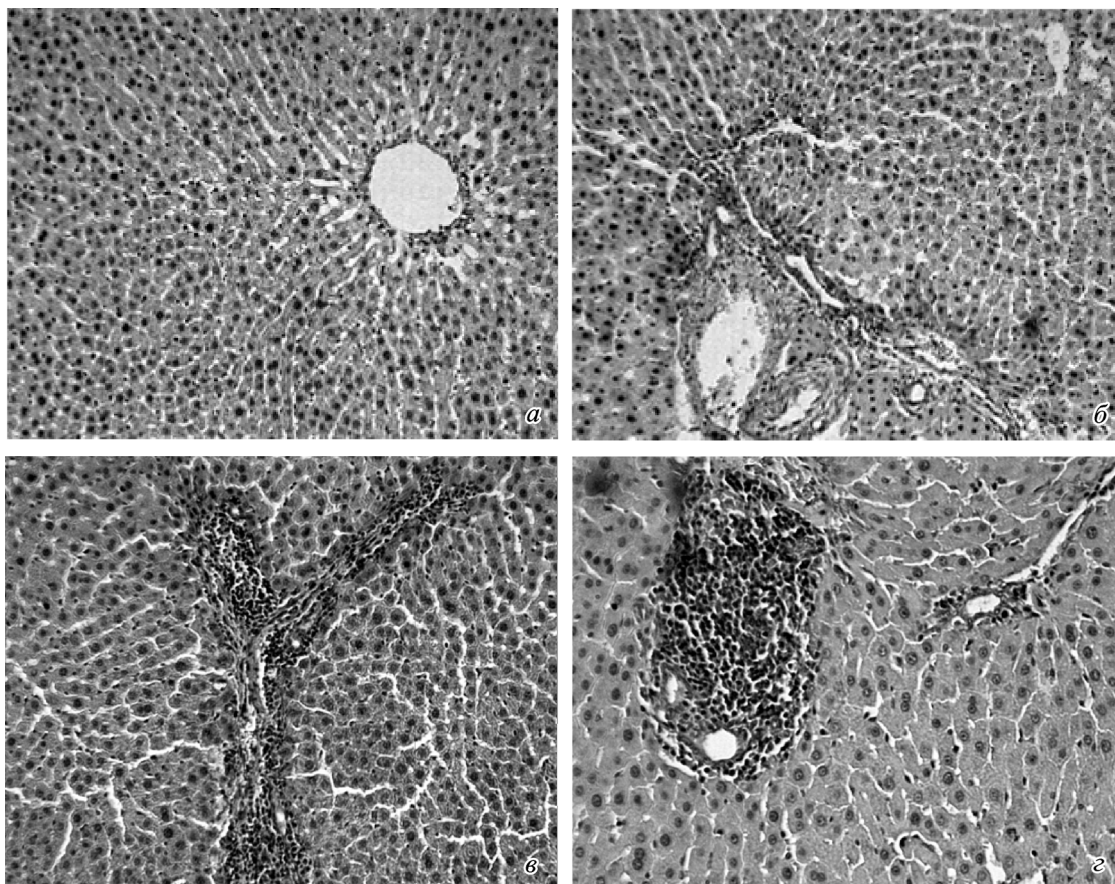


Рис. 1. Срезы печени крыс в норме (а) и при экспериментальном циррозе (б—д).

Окраска гематоксилином—эозином (а, б) и по Ван Гизону (в, д). Об. 40×.

групп. Из данных, представленных в табл. 2, которые характеризуют уровень ПОЛ в печени животных опытной и контрольной групп, следует, что активность СОД у крыс с циррозом печени снижалась на 16 %, а каталазы — на 23 %. Концентрация диеновых конъюгатов в цирротической печени увеличивалась в 2.1 раза по сравнению с контролем, а уровень малонового диальдегида — на 34 %. Продолжительность гексеналового сна у крыс с циррозом печени увеличивалась примерно в 5 раз по сравнению с контролем (табл. 2), что свидетельствует о снижении активности системы микросомального окисления, метаболизирующей ксенобиотики, в частности гексенал.

Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротической пе-

чени крыс. Электронно-микроскопическое исследование митохондрий в гепатоцитах крыс контрольной (рис. 2, а, в) и опытной (рис. 2, б, г) групп показало, что гепатоциты цирротической печени крыс характеризуются значительным плеоморфизмом этих органонидов и увеличением их размеров.

Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов (табл. 3) показала, что  $CCl_4$ -индуцированный цирроз приводит к значительному снижению протяженности крист в одной митохондрии и КВММ на единицу площади цитоплазмы гепатоцитов — на 49 и 31 % соответственно. Несмотря на это, ОПМ в гепатоцитах цирротически измененной печени была увеличена на 28 % по сравнению с нормой.

Таблица 1

Биохимические показатели сыворотки крови у крыс контрольной и опытной групп в постабсорбтивном периоде ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ,  $n = 5$ )

Группа	Активность АлАт <sup>а</sup>	Активность АсАт <sup>а</sup>	Концентрация общего билирубина, мкМ	Концентрация общего белка, г/л
Контроль	143.2 ± 5.2	160.8 ± 8.1	0.34 ± 0.04	64.6 ± 1.4
Опыт	278.7 ± 9.1 <sup>б</sup>	228.0 ± 14.6 <sup>б</sup>	0.58 ± 0.04 <sup>б</sup>	61.0 ± 0.3 <sup>г</sup>

<sup>а</sup> Активность ферментов выражена в нмоль субстрата за 1 с на 1 л. <sup>б—г</sup> Достоверно отличается от соответствующего значения в контроле при <sup>б</sup>  $P < 0.001$ , <sup>в</sup>  $P < 0.01$  и <sup>г</sup>  $P < 0.05$ .

Т а б л и ц а 2

**Некоторые показатели микросомального и перекисного окисления липидов в печени крыс  
контрольной и опытной групп ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 5$ )**

Группа	МДА, мкмоль/г	СОД, Е/мг белка	Каталаза, моль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> за 1 мин	ДК, мкмоль/г	Гексеналовый сон, мин
Контроль	20.52 ± 1.56	4.00 ± 0.17	95.78 ± 2.48	55.84 ± 0.94	16.40 ± 0.68
Опыт	31.14 ± 2.69 <sup>а</sup>	3.36 ± 0.16 <sup>а</sup>	74.12 ± 1.96 <sup>а</sup>	115.74 ± 4.67 <sup>б</sup>	89.00 ± 9.34 <sup>в</sup>

<sup>а-в</sup> Достоверно отличается от значения в контроле при <sup>а</sup> $P < 0.05$ , <sup>б</sup> $P < 0.001$  и <sup>в</sup> $P < 0.01$ .

Т а б л и ц а 3

**Морфометрические показатели митохондрий (МХ) гепатоцитов крыс  
контрольной и опытной групп ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 5$ )**

Группа	Количество МХ на единицу площади гепатоцита, мкм <sup>2</sup>	ОПМ, %	Средний периметр МХ, мкм	Общая протя- женность крист в 1 МХ, мкм	КВММ на площади цитоплазмы гепатоцита, мкм <sup>-1</sup>
Контроль	33 ± 4	19 ± 1	25 ± 4	42.0 ± 6.8	3309 ± 38
Опыт	37 ± 4	25 ± 1 <sup>а</sup>	21 ± 1	21.4 ± 0.2 <sup>б</sup>	2294 ± 177 <sup>а</sup>

<sup>а, б</sup> Достоверно отличается от значения в контроле при <sup>а</sup> $P < 0.01$  и <sup>б</sup> $P < 0.05$ .

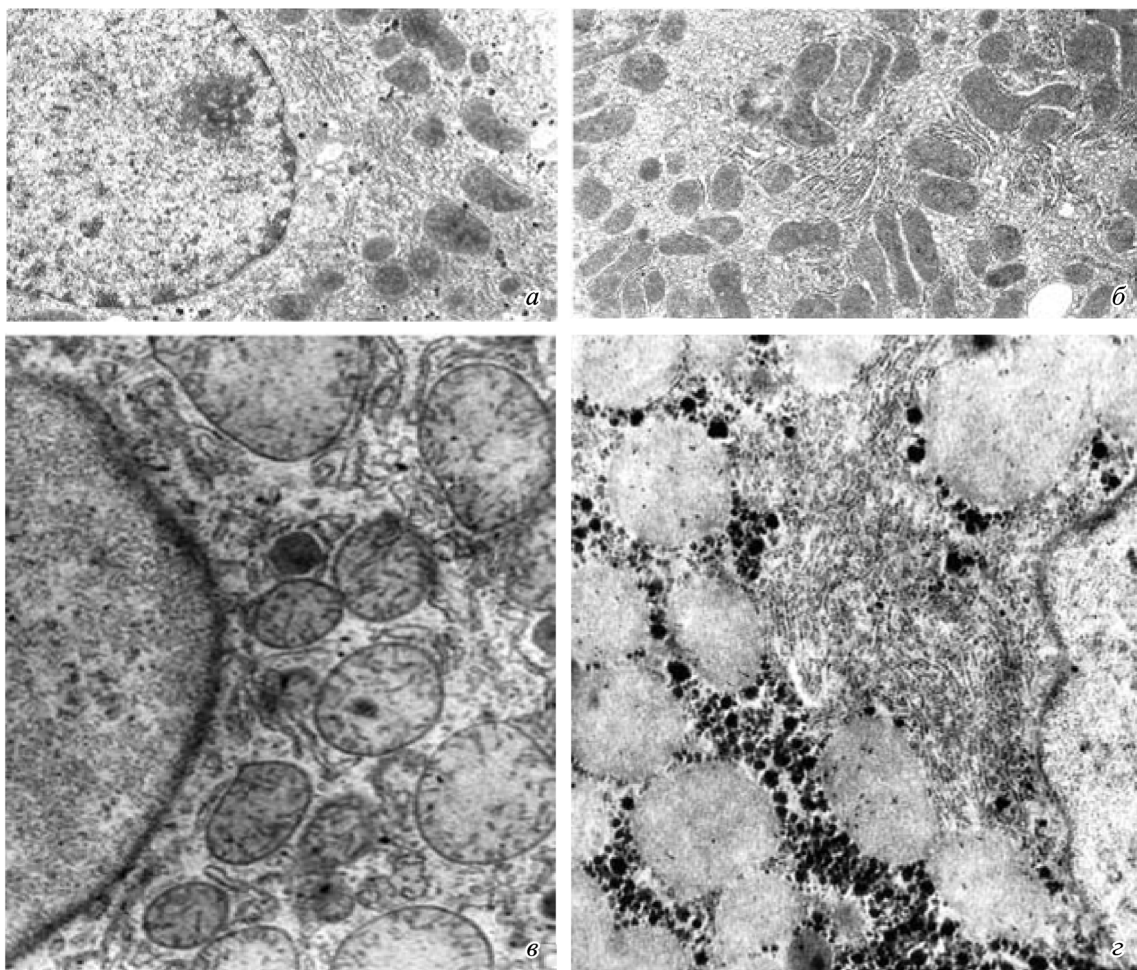


Рис. 2. Митохондрии гепатоцитов крыс в норме (а, б) и при экспериментальном циррозе печени (в, г).

Увел.: а, б — 8000×; в, г — 20 000×.

## Обсуждение

Традиционной моделью для изучения цирроза печени является хроническое отравление животных гепатотропным ядом —  $CCl_4$ . Показано, что хроническая интоксикация животных  $CCl_4$  воспроизводит многие характерные признаки цирроза у человека (Kus, 2004). Полагают, что пусковым механизмом патологических изменений в печени в ходе развития хронического процесса является избыточная интенсивность реакций ПОЛ (Логинов, Матюшин, 1994). Считается, что к увеличению концентрации активных форм кислорода и как следствие — к увеличению концентрации продуктов ПОЛ и значительному повреждению различных мембранных структур клеток приводит снижение активности антиоксидантной системы печени (Ohyashiki et al., 1995; Скулачев, 1999). Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что в печени крыс опытной группы активность ключевых ферментов антиоксидантной системы клеток (каталазы и СОД) снижается, в то время как концентрация продуктов ПОЛ (МДА и ДК) увеличивается. Полученные результаты подтверждают данные других авторов и указывают на значительную активацию процессов ПОЛ при циррозе печени (Ohyashiki et al., 1995; Скулачев, 1999; Huang, 2003).

Известно, что деструкция мембранных структур гепатоцитов, вызванная ПОЛ, приводит к цитолизу, о присутствии которого обычно судят по увеличению уровня индикаторных ферментов этого процесса (АлАТ и АсАТ) в сыворотке крови (Arai et al., 1984; Siegel et al., 2000). Наши данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что активность АлАТ и АсАТ у крыс с  $CCl_4$ -циррозом печени возрастает по сравнению с контролем в 2.0 и 1.4 раза соответственно; это указывает на постоянно протекающую гибель гепатоцитов в патологически измененном органе.

Морфометрический анализ нормальной и цирротической печени крыс, проведенный нами, показал, что по сравнению с контролем доля паренхимы при циррозе снижается на 5 %, в то время как доля соединительной ткани увеличивается в 4.2 раза ( $P < 0.001$ ). Сходную динамику соединительной ткани и паренхимы в ходе развития цирроза печени наблюдали многие авторы (James et al., 1986; Reichen et al., 1987).

Непрерывная гибель клеток, наблюдающаяся в ходе развития патологического процесса в печени, стимулирует регенерацию этого органа, основными клеточными механизмами которой являются пролиферация, полиплоидизация и гипертрофия гепатоцитов (Сакута, Кудрявцев, 1996, 2005). Показано, что ведущую роль в репаративном росте печени при остром или хроническом действии агентов различной этиологии играют ДНК-синтетические процессы — пролиферация и полиплоидизация гепатоцитов, которые приводят к увеличению числа гепатоцитов в печени и (или) количества геномов в клетках (Сакута, Кудрявцев, 1996, 2005).

Цитофотометрическое исследование распределения гепатоцитов по классам плоидности у крыс с  $CCl_4$ -циррозом печени показало, что наиболее характерными чертами паренхимы цирротической печени являлись снижение доли ( $2c \times 2$ )-гепатоцитов ( $P < 0.05$ ) и увеличение относительного количества высокоплоидных клеток. В результате средней уровень плоидности гепатоцитов крыс опытной группы возрастал на 9.3 % по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ).

Усиление полиплоидизации клеток печени в ответ на патологическое воздействие — явление, характерное для млекопитающих (Фактор, Урываева, 1980; Бродский, Урываева, 1981; Кудрявцев и др., 1993; Melchiorri et al., 1993). В частности, найдено, что при хроническом воздействии  $CCl_4$  в печени крыс и мышей наблюдаются снижение относительного числа  $2c$ - и ( $2c \times 2$ )-гепатоцитов и появление высокоплоидных клеток, не встречающихся в нормальном органе (Фактор, Урываева, 1980; Бродский, Урываева, 1981). В результате плоидность гепатоцитов значительно возрастает (Кудрявцев и др., 1993; Melchiorri et al., 1993; Сакута, Кудрявцев, 2005).

Известно, что наряду с пролиферацией и полиплоидизацией важную роль в нормальном и репаративном росте печени играет гипертрофия гепатоцитов (Завадская и др., 1989; Сакута, Кудрявцев, 2005). Гипертрофия гепатоцитов сопровождается увеличением их размера и может быть вызвана либо повышением плоидности клеток, которое приводит к пропорциональному увеличению их объема и массы (Бродский, Урываева, 1981; Gaub et al., 1981; Завадская и др., 1983), либо увеличением размера их цитоплазмы, которое не связано с увеличением плоидности клеток и сопровождается уменьшением ядерно-плазматического отношения. В основе гипертрофии, не связанной с повышением плоидности клеток, лежит усиление процессов внутриклеточной регенерации (Саркисов и др., 1975), ведущих к увеличению числа и гипертрофии различных клеточных структур и органоидов и в конечном итоге — к увеличению объема и массы клеток.

Определение сухой массы гепатоцитов показало, что при циррозе она увеличивается по сравнению с контролем на 21 % ( $P < 0.05$ ). В среднем сухая масса одного гепатоцита в цирротически измененной печени составила  $1154 \pm 68$  пг. Увеличение сухой массы гепатоцитов и содержания в них белка в ходе развития цирроза отмечалось и другими авторами. Например, было показано, что сухая масса гепатоцитов крыс при циррозе увеличивается по сравнению с нормой на 61—65 % и достигает 988—995 пг (Tongiani et al., 1976; Завадская и др., 1989). Поскольку масса клеток увеличивается пропорционально увеличению уровня их плоидности, можно подсчитать вклад клеточной гипертрофии, связанной и не связанной с их плоидностью, в общее увеличение массы гепатоцитов при циррозе. Расчеты показали, что вклад полиплоидии в увеличение сухой массы гепатоцитов цирротически измененной печени составляет 9.4 %, а увеличение массы гепатоцитов, обусловленное ростом их цитоплазмы, — 11.6 %.

Интерферометрия сухой массы гепатоцитов дала возможность не только определить вклад гипертрофии клеток, связанной и не связанной с их плоидностью, в рост клеток при циррозе печени, но и подсчитать число клеток в 1 г печени. Расчеты показали, что число гепатоцитов в 1 г нормальной печени крыс составляет  $2.48 \cdot 10^8$  клеток. Это значение хорошо соответствует данным, приводимым другими авторами (Pure et al., 1965; Кнох, 1976). Количество гепатоцитов в 1 г цирротической печени составило, по нашим данным,  $1.94 \cdot 10^8$  клеток. Таким образом, хроническое отравление  $CCl_4$  в течение 6 мес приводит к уменьшению числа гепатоцитов в цирротической печени примерно на 21 % ( $P < 0.05$ ), которое, однако, полностью компенсируется повышением плоидности клеток и гипертрофией их цитоплазмы.

Разрастание соединительной ткани в печени, наблюдающееся при циррозе, сопровождается значительным нарушением дольковой структуры и сосудистой системы

органа. Усиление нарушений кровеносной системы печени по мере прогрессии заболевания приводит к снижению поступления кислорода в гепатоциты (Sikuler et al., 1985). В свою очередь гипоксия, сопровождающаяся сдвигом клеточного рН, избытком ионов кальция и активных форм кислорода, оказывает заметное влияние на структуру и функцию митохондриального аппарата клеток (Lluis et al., 2005; Young et al., 2006).

Электронно-микроскопическое исследование митохондрий в гепатоцитах цирротической печени крыс, проведенное нами, выявило значительный плеоморфизм этих органоидов и увеличение их размеров, которые в некоторых клетках достигали особенно больших величин (рис. 2). Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов показала, что развитие цирроза печени сопровождается увеличением объемной плотности митохондрий. Однако, несмотря на увеличение ОПМ, КВММ снижалась почти в 1.5 раза, а общая протяженность внутренних мембран в одной митохондрии — примерно вдвое (табл. 3). Поскольку последние содержат специфические белки (катализирующие окислительные реакции в дыхательной цепи, АТФ-синтазу и специфические транспортные белки, регулирующие перенос метаболитов), необходимые для осуществления процесса окислительного фосфорилирования, с помощью которого производится большая часть АТФ в клетке, именно величина КВММ, а не ОПМ, наиболее адекватно отражает уровень дыхания и образования АТФ в гепатоцитах. Этот вывод подтверждается данными, полученными в нашей лаборатории ранее при исследовании зависимости КВММ в гепатоцитах от размера тела различных видов млекопитающих (Анацкая, 1999). В этой работе было показано, что наклон линии регрессии, отражающий эту зависимость, составляет  $-0.11$ . Этот результат полностью совпадает с данными, полученными Кребсом (Krebs, 1950) и Смитом (Smith, 1956), которые нашли, что скорость дыхания срезов печени и концентрации митохондрий в печени снижаются при увеличении размеров тела животных с наклонами линий регрессии  $-0.115$  и  $-0.110$  соответственно. Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что скорость дыхания и образования АТФ в гепатоцитах цирротической печени значительно снижена.

Увеличение размеров митохондрий, уменьшение в них числа крист, а также появление гигантских митохондрий в гепатоцитах при различных поражениях печени отмечались многими авторами (Krähenbühl et al., 1992, 2000; Krähenbühl, Reichen, 1992; Welt et al., 2004). Полагают, что эти изменения митохондриального аппарата гепатоцитов в первую очередь вызваны гипоксией, к которой приводит развитие цирроза (Welt et al., 2004).

Известно, что количество митохондрий и их структура тесно связаны с уровнем окислительных процессов, протекающих в клетках (Шмидт-Ниельсен, 1987). Однако прямая связь морфологических показателей митохондрий с их функциональной активностью при хронических заболеваниях печени не показана. В настоящее время сведения о функциональной активности митохондрий гепатоцитов при циррозе печени представлены либо морфологическими, либо биохимическими данными. Последние свидетельствуют о том, что хронические поражения печени, такие как тиоацетамидный цирроз и  $\text{CCl}_4$ -цирроз, вызывают значительное ослабление функции электрон-транспортной цепи митохондрий (Krähenbühl et al., 1992, 2000; Fernandez-Checa et al., 1993; Huang et al., 2003; Spahr et al., 2003; Yang et al., 2004). При этом полагают,

что ослабление функции митохондрий может быть связано как с уменьшением объема митохондрий в цирротической печени, так и с ухудшением метаболизма оставшихся митохондрий (Krähenbühl et al., 2000).

Исследование ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов при хронических заболеваниях печени — НАДН-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы и АТФ-синтазы — показало заметное снижение их активности (Krähenbühl et al., 1992, 2000; Fernandez-Checa et al., 1993; Huang et al., 2003; Spahr et al., 2003; Yang et al., 2004). Результатами этих изменений являются значительное снижение эффективности окислительного фосфорилирования и уменьшение продукции АТФ митохондриями (Fernandez-Checa et al., 1993; Harvey et al., 2000; Fukumura et al., 2003).

Известно, что эффективность выполнения гепатоцитами своих многочисленных функций тесно связана со скоростью образования АТФ в митохондриях. Поскольку скорость окислительного фосфорилирования и концентрация АТФ в гепатоцитах при  $\text{CCl}_4$ -циррозе заметно падают, можно ожидать, что нехватка богатых энергией молекул неизбежно отразится на интенсивности тканеспецифических функций печени. Об уровне тканеспецифических функций печени обычно судят по концентрации маркерных продуктов метаболизма в сыворотке крови или активности соответствующих ферментов в ее ткани. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что концентрация общего билирубина в сыворотке крыс опытной группы возрастает, а общего белка — снижается по сравнению с контролем, предполагая нарушение пигментного обмена в печени и ее протеин-синтетической функции при циррозе. Полученные данные демонстрируют также, что продолжительность гексеналового сна, отражающая способность системы микросомального окисления гепатоцитов метаболизировать ксенобиотики, увеличивается у крыс с циррозом печени более чем в 5 раз по сравнению с контрольными животными. Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие цирроза сопровождается резким ослаблением детоксикационной функции печени.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что хроническое отравление крыс  $\text{CCl}_4$  через 6 мес приводит к развитию цирроза печени, который характеризуется потерей дольковой структуры паренхимы и усилением ПОЛ вследствие ослабления активности антиоксидантных систем. Несмотря на компенсацию частичной потери гепатоцитов за счет их полиплоидизации и гипертрофии, тканеспецифические синтезы в цирротической печени оказываются заметно ослабленными из-за резкого снижения функции митохондриального аппарата клеток.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

### Список литературы

- Анацкая О. В. 1999. Межвидовая вариабельность уровня плоидности гепатоцитов и кардиомиоцитов млекопитающих и птиц и ее причины: Автореф. канд. дис. СПб. 22 с.
- Бродский В. Я., Урываева И. В. 1981. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука. 259 с.
- Гайер Г. 1974. Электронная гистохимия. М.: Мир. 523 с.
- Делоне Г. В., Урываева И. В., Корецкий В. Ф., Бродский В. Я. 1987. Анализ постнатального роста печени мыши на основе

учета числа гепатоцитов, их массы и плоидности. Онтогенез. 18 (3) : 304—307.

Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. 1983. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека. Лаб. дело. 10 : 30—33.

Завадская Е. Э., Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н. 1989. Изменение сухого веса гепатоцитов при хронической интоксикации крыс  $CCl_4$ . Цитология. 31 (4) : 419—426.

Завадская Е. Э., Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н., Смирнова С. А., Скорина А. Д. 1983. Сухой вес изолированных гепатоцитов человека в норме и при хроническом гепатите. Цитология. 25 (4) : 447—451.

Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Сакута Г. А., Скорина А. Д., Штейн Г. И. 1993. Исследование полиплоидизации гепатоцитов при некоторых хронических заболеваниях печени у человека. Цитология. 35 (5) : 70—83.

Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Шалахметова Т. М., Завадская Е. Э., Иоффе В. А., Барский И. Я., Папаян Г. В. 1979. Цитофотометрическое исследование содержания гликогена в гепатоцитах различной плоидности у взрослых крыс. Цитология. 21 (2) : 218—221.

Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1974. Цитофлуориметрия. Общие принципы: В кн.: Методы биологии развития. М.: Наука. 497—500.

Логинов А. С., Матюшин Б. Н. 1994. Внутриклеточная активация кислорода и молекулярные механизмы автоокислительного повреждения печени. Вестн. РАМН. 5 : 3—17.

Пирс Э. 1962. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с.

Романова Л. А., Стальная И. Д. 1977. Определение гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония. В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицина. 64—66.

Сакута Г. А., Кудрявцев Б. Н. 1996. Клеточные механизмы регенерации цирротической печени крыс. I. Соотношение процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток после прекращения хронического воздействия  $CCl_4$ . Цитология. 38 (11) : 1158—1171.

Сакута Г. А., Кудрявцев Б. Н. 2005. Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени крыс. II. Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов. Цитология. 47 (5) : 379—387.

Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Попова И. В., Бадикова А. К., Втюрин Б. В. 1975. О влиянии ритма действия повреждающего агента на характер репаративной регенерации печени. Арх. патол. 37 : 80—87.

Скулачев В. П. 1999. Кислород в живой клетке: добро и зло. Рос. журн. гастр. гепатол. колопроктол. 1 : 12—18.

Фактор В. М., Урываева И. В. 1980. Полиплоидизация гепатоцитов мыши при многократных воздействиях  $CCl_4$ . Бюл. эксперим. биол. мед. 81 (11) : 614—616.

Шмидт-Ниельсен К. 1987. Размеры животных: почему они так важны? М.: Мир. 259 с.

Штейн Г. И., Пантелеева В. Г., Поваркова А. В., Кудрявцев Б. Н. 1998. Возможности анализатора изображений «Видеотест» для проведения микрофотометрических исследований в цитологии. Цитология. 40 (10) : 913—916.

Arai M., Leo M. A., Nakano M., Gordon E. R., Lieber C. S. 1984. Biochemical and morphological alterations of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption. Hepatology. 4 : 165—174.

Cunningham C. S., Bailey S. M. 2001. Ethanol consumption and liver mitochondria function. Biol. Signals Recept. 10 : 271—282.

Fernandez-Checa J. C., Hirano T., Tsukamoto H., Kaplowitz N. 1993. Mitochondria glutathione depletion in alcoholic liver disease. Alcohol. 10 : 469—475.

Fukumura A., Tsutsumi M., Tsusciscima M., Takase S. 2003. Correlation between adenosine triphosphate content and apoptosis in liver of rats treated with alcohol. Alcohol Clin. Exp. Res. 27 : 12S—15S.

Gambino S. R., Freda V. J. 1966. The measurement of amniotic fluid bilirubin by the method of Jendrassik and Grof. Amer. J. Clin. Pathol. 46 : 198—203.

Gaub J., Fanerholdt L., Kondrup J., Peterson P., Langewantsin G. 1981. Cytophotometry of liver cells from ethanol-fed rats: ethanol causes increased polyploidization and protein accumulation. Eur. J. Clin. Invest. 11 : 235—237.

Glouert A., Glouert R. 1958. Araldite as embedding for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4 : 191—194.

Harvey P. J., Gready J. E., Yin Z. Le., Couteur D. G., McLean A. J. 2000. Acute oxygen supplementation restores markers of hepatocyte energy status and hypoxia in cirrhotic rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 293 : 641—645.

Henry R. J., Chiamori N., Golub O. J., Berkman S. 1960. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. Tech. Bull. Reg. Med. 30 : 149—166.

Hoek J. B. 1994. Mitochondrial energy metabolism in chronic alcoholism. Curr. Topics Bioenerg. 17 : 197—241.

Huang Y. T., Hsu I. S., Chen C. J., Liu C. T., Wie Y. H. 2003. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. J. Biomed. Sci. 10 : 170—178.

Iype P. T., Bhargava P. M., Tasker A. D. 1965. Some aspects of chemical and cellular composition of adult rat liver. Exp. Cell Res. 40 : 233—251.

James J., Bosch K., Zuyderhoudt F. M. Z., Houtkooper J. M., van Gool J. 1986. Histophotometric estimation of volume density of collagen as an indication of fibrosis in rat liver. Histochemistry. 85 : 129—133.

Knox W. E. 1976. Enzyme pattern in fetal, adult and neoplastic rat tissues. Basel: S. Karger. 324 p.

Krähenbühl L., Ledermann M., Lang C., Krähenbühl S. 2000. Relationship between hepatic mitochondrial function *in vivo* and *in vitro* in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. J. Hepatol. 33 : 216—223.

Krähenbühl S., Krähenbühl-Glauser S., Strucki J., Gehr P., Reichen J. 1992. Stereological and functional analysis of liver mitochondria from rats with secondary biliary cirrhosis: impaired mitochondrial metabolism and increased mitochondrial content per hepatocyte. Hepatology. 15 : 1167—1172.

Krähenbühl S., Reichen J. 1992. Adaptation of mitochondrial metabolism in liver cirrhosis: different strategies to maintain a vital function. Scand. J. Gastroenterol. 27 (Suppl. 193) : 90—96.

Krebs H. A. 1950. Body size and tissue respiration. Biochim. biophys. acta. 4 : 249—269.

Kus I., Colakoglu N., Pekmez H., Seckin D., Ogeturk M., Sarimaz M. 2004. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Acta histochem. 106 : 289—297.

Lluis J. M., Morales A., Blasco J., Colell A., Mari M., Garzia-Ruiz C., Fernandez-Checa J. C. 2005. Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocyte during hypoxia. J. Biol. Chem. 280 : 3224—3232.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265—275.

Luck H. 1971. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. New York: London: Acad. Press. 885—893.

Mathews R. E., Jr., McGuire B. M., Estrada C. A. 2006. Out-patient management of cirrhosis: a narrative review. South Med. J. 99 : 600—606.

Melchiorri C., Chieco P., Ledda A. I., Coni P., Ledda-Columbano G. M., Columbano A. 1993. Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth. Carcinogenesis. 14 : 1825—1830.

Morimoto T., Tanaka A., Taki Y., Noguchi M., Yokoo N., Nishimura T., Nishikawa K., Yamamoto S. 1988. Changes in concentration of respiratory components and cytochrome oxidase activity in mitochondria obtained from carbon tetrachloride-induced cirrhosis rat liver. Clin. Sci. 74 : 485—489.



- Nozu F., Takeyama N., Tanaka T. 1992. Changes of hepatic fatty acid metabolism produced by chronic thioacetamide administration in rats. *Hepatology*. 15 : 1099—1106.
- Ohyashiki T., Kamata K., Takeuchi M., Matsui K. 1995. Contribution of peroxidation products to oxidative inactivation of rat liver microsomal glucose-6-phosphatase. *J. Biochem.* 118 : 508—514.
- Reichen J., Arts F., Schafroth U., Zimmermann A., Heltner Th. B., Zysset T. 1987. Aminopyrine N-Demethylation by rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology*. 93 : 719—726.
- Robertson N. J., Kendall C. H. 1992. Liver giant mitochondria revisited. *J. Clin. Pathol.* 45 : 412—415.
- Rose M., Scholler G., Klapp B. F. 1997. Biopsychological relationships and prediction of the course of acute viral hepatitis. *Psychother. Psychosom. Med. Psychol.* 47 : 435—445.
- Siegel E. G., Seidenstucker A., Galwitz B., Schmitz F., Kloppe G., Folsch U. R., Schmidt W. E. 2000. Insulin secretion defects in liver cirrhosis can be reversed by glucagons-like peptide-1. *J. Endocrinol.* 164 : 13—19.
- Siess E. A., Brocks D. G., Wieland O. H. 1976. Subcellular distribution of key metabolites in isolated liver cells from fasted rats. *FEBS Lett.* 69 : 265—271.
- Sikuler E., Kravetz D., Groszmann R. J. 1985. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Amer. J. Physiol.* 248 : G618—G625.
- Smith A. D. 2006. Liver cirrhosis mortality rates in Britain. *Lancet*. 367 : 1898—1899.
- Smith R. E. 1956. Quantitative relations between liver mitochondria metabolism and total body weight in mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 62 : 403—422.
- Spahr L., Negro F., Leandro G., Marinescu O., Goodman K. J., Rubbia-Brandt L., Jordan M., Hadengue A. 2003. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the <sup>13</sup>C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. *Med. Sci. Monti.* 9 : CR6—CR11.
- Tongianni R., Lopek N., Puccianelli E. 1976. Hepatocyte population dynamics during hydrocortisone and thioacetamide treatment. *Histochemistry*. 47 : 1—21.
- Uchigama M., Michera M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 86 : 271—278.
- Verly W. C. 1976. The control of liver growth. New York: Chalmers. 112 p.
- Weibel E. R., Staubli W., Gnagi H. R. 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the cell. I. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell Biol.* 42 : 68—91.
- Welt K., Weiss J., Martin R., Dettmer D., Hermsdorf T. 2004. Ultrastructure, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes and acute hypoxia. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55 : 331—345.
- Yang S., Tan T. M., Wee A., Leow C. K. 2004. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 : 220—229.
- Young T. A., Bailey S. M., Van Horn C. G., Cunningham C. C. 2006. Chronic ethanol consumption decreases mitochondrial and glycolytic production of ATP in liver. *Alcohol.* 41 : 254—260.

Поступила 14 VI 2007

#### MORPHOMETRY OF HEPATOCYTE MITOCHONDRIAL APPARATUS IN NORMAL AND CIRRHOTIC RAT LIVER

N. N. Bezborodkina,<sup>1</sup> S. V. Okovity,<sup>2</sup> M. V. Kudryavtseva,<sup>1</sup> O. V. Kirik,<sup>3</sup> I. V. Zarubina,<sup>2</sup> B. N. Kudryavtsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, <sup>2</sup> Military-Medical Academy and

<sup>3</sup> State Research Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: cellpath@mail.cytspb.rssi.ru

Morphometric electron microscopy study of the hepatocyte mitochondrial apparatus and morphofunctional analysis of the degree of pathological alterations were carried out on the liver of rats with CCL<sub>4</sub>-cirrhosis (experimental group). Chronic poisoning of rats with CCL<sub>4</sub> for 6 months led to a 4.2-fold increase in proportion of connective tissue and to a decrease in the number of hepatocytes in the liver by 21.8 %. Dry mass and ploidy of hepatocytes in the cirrhotic liver rose as compared with norm by 20.6 and 9.3 %, respectively. Activities of alanine and aspartate aminotransferases in blood of rats of experimental group exceeded normal ones 2.0 and 1.4 times, respectively. Concentration of total bilirubin in blood of the cirrhotic animals increased 1.7 times, while concentration of total protein decreased by 22 %. Concentration of diene conjugates in the liver of rats of experimental group increased 2.1 times as compared with normal one, while the level of malonic dialdehyde — by 34 %. Activities of superoxide dismutase and catalase in the cirrhotic liver were lower than in the normal liver were lower than in the normal liver by 16 and 23 %, respectively. Morphometry of the hepatocyte mitochondrial apparatus has shown that in spite of an increase in the voluminous density of mitochondria in hepatocytes of the cirrhotic liver (by 28 %), concentration of internal mitochondrial membranes in the cells was reduced almost 1.5 times, while the total length of internal membrane in a single mitochondrion was reduced about twice as compared with norm. Thus, despite compensation of the partial loss of hepatocytes because of their polyploidization and hypertrophy, the specific synthetic activity of cells in the case of cirrhosis is decreased due to deterioration of the antioxidant system and electron transport chain of the mitochondrial apparatus.

**Key words:** liver cirrhosis, hepatocytes, mitochondria, tetrachloromethan.