

О МЕХАНИЗМАХ ОБРАЗОВАНИЯ МНОГОЯДЕРНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ N-НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА НА КРЫС

© Т. М. Шалахметова,¹ Б. А. Умбаев,¹ С. Ж. Колумбаева,¹ Б. Н. Кудрявцев²

¹ Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алма-Ата,
и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: Shalakhmetova_T@kaznu.kz

Исследованы механизмы образования многоядерных гепатоцитов при интоксикации крыс N-нитрозодиметиламином (N-НДМА). С помощью иммуногистохимической реакции на γ -тубулин установлено, что через 48 ч после воздействия N-НДМА в печени увеличивается количество клеток с тремя центросомами и более. Показано, что в основе образования дополнительных центросом в гепатоцитах лежит окислительный стресс, вызванный метаболизмом N-НДМА при участии ферментов суперсемейства цитохромов P450. Воздействие N-НДМА приводит к резкому увеличению концентрации цитохрома P450 в печени, особенно заметному через 24 и 48 ч (в 3.3 и 2.8 раза соответственно). Иммуногистохимическая реакция на цитохром P450 2E1 выявила интенсивное окрашивание цитоплазмы центробиолярных гепатоцитов в период 24—48 ч после воздействия N-НДМА. В этот же период происходят увеличение (в 1.1—2.0 раза) в печени концентрации малонового диальдегида (МДА) — вторичного продукта ПОЛ — и уменьшение (в 1.1—1.3 раза) активности каталазы — фермента антиоксидантной системы клетки. На последующих сроках (72—120 ч) после воздействия N-НДМА количество гепатоцитов с тремя центросомами и более, интенсивность окрашивания цитоплазмы клеток на цитохром P450 2E1, концентрация цитохрома P450 и МДА в печени уменьшались, а активность каталазы повышалась. Через 48 ч после воздействия N-НДМА в клеточной популяции паренхимы печени интоксцированных животных появляются двуядерные гепатоциты с разной интенсивностью включения ³H-тимидина в ядра, свидетельствующие об асинхронном прохождении синтеза ДНК. Иммуногистохимическая реакция на pKi-67 — маркерный ядерный белок пролиферации клеток — позволила установить, что асинхронность пролиферативной активности ядер в двуядерных клетках характерна не только для S-фазы, но и для других фаз клеточного цикла — G₁, G₂ и M. Таким образом, основными механизмами образования многоядерных гепатоцитов при токсическом действии нитрозодиметиламина являются: 1) повышенная амплификация центросом вследствие окислительного стресса и 2) асинхронный синтез ДНК в ядрах двуядерных клеток с последующим асинхронным ацитокинетическим митозом.

Ключевые слова: многоядерные гепатоциты, многополюсный митоз, центросома, цитохром P450 2E1.

Принятые сокращения: МДА — малоновый диальдегид, ПОЛ — перекисное окисление липидов, N-НДМА — N-нитрозодиметиламин.

В ряде исследований было показано, что при старении, воспалении, патологии и действии токсических веществ в печени животных и человека могут образовываться многоядерные гепатоциты, которые редко встречаются в норме (Rachmilewitz et al., 1950; Nitschke et al., 1988; Fujimoto et al., 1989; Devaney et al., 1992; Scampini et al., 1993; Chae et al., 2005). Действие тяжелых металлов, несимметричного диметилгидразина (компонента ракетного топлива) и продукта его окисления N-нитрозодиметиламина (N-НДМА) также приводит к образованию многоядерных клеток в печени лабораторных грызунов (Шалахметова и др., 1998; Kolumbaeva et al., 2005). Во всех наблюдаемых случаях отмечались разная частота их встречаемости в клеточной популяции и полиморфизм по числу и размеру ядер и объему цитоплазмы. Однако механизмы образования подобных многоядерных клеток практически не изучены. Вместе с тем известно, что много-

ядерные клетки могут быть генетически нестабильными и играть большую роль в канцерогенезе (Wheeler et al., 1986; Rudzki et al., 1989).

Одним из предполагаемых механизмов образования многоядерных клеток является многополюсный митоз, который возникает в результате появления дополнительных центросом (Keryer et al., 1984). Дополнительные центросомы могут образоваться в результате прямого действия разрушающих микротрубочки веществ, таких как колцемид и колхицин (Rubin et al., 1999), а также в результате окислительного стресса (Chae et al., 2005). Установлено, что введение перекиси водорода в питательную среду культуры клеток Чанга вызывает амплификацию центросом, что в свою очередь приводит к образованию многоядерных клеток (Chae et al., 2005). Другим возможным механизмом образования многоядерных гепатоцитов является асинхронный синтез ДНК в ядрах двуядерных

клеток с последующим незавершенным (ацитокинетическим) митозом (Anatskaya, Kudryavtsev, 1996).

Для обнаружения дополнительных centrosом в клетках используют иммуногистохимический метод выявления γ -тубулина — структурного белка, входящего в состав перичентриольной области centrosомы и коровую область центриоли (Fuller et al., 1995; Kayser et al., 2005). Интенсивное специфическое окрашивание данных структур позволяет визуализировать мелкие структуры centrosом в клетке и оценить их количественно.

Асинхронность вступления ядер двуядерных клеток в клеточный цикл обычно исследуют с помощью автордиографического метода по разной интенсивности включения меченого предшественника ДНК в S-периоде (Sheehy et al., 1974; Anatskaya, Kudryavtsev, 1996). Кроме того, можно использовать иммуногистохимическую реакцию на ядерный белок pKi-67 и по разной интенсивности окрашивания внутриядерных структур (хроматина и ядрышек) судить о нахождении ядер на различных стадиях клеточного цикла (Solovei et al., 2006).

Целью настоящей работы явилось исследование механизма образования многоядерных клеток в печени при интоксикации крыс N-НДМА — соединением, обладающим гепатотоксическим и канцерогенным действием.

Материал и методика

Эксперименты проводили на 50 белых беспородных крысах-самцах с массой тела 220—250 г, которые были разбиты на контрольную и опытную группы. Животным опытной группы вводили внутривентриально однократно N-НДМА (Sigma Chemical Co., St. Louis, США) в дозе 20 мг/кг (Осипенко, Савченко, 2002). Животным контрольной группы N-НДМА не вводили. Животных обеих групп содержали на стандартной диете. За 2 ч до забоя животным внутривентриально вводили ^3H -тимидин (уд. акт. 660 ТБк/моль, доза 1 мБк на 1 г массы тела). Забой контрольных и опытных животных осуществляли через 24, 48, 72, 96 и 120 ч от начала эксперимента. На каждый срок использовали по 5 животных. Сразу после забоя печень каждого животного делили на три части: одну часть использовали для иммуногистохимических исследований, другую — для биохимического анализа, а третью — для приготовления препаратов изолированных гепатоцитов.

Для проведения иммуногистохимических исследований кусочки печени размером 0.5×0.5 см фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. После фиксации в течение 10 сут, промывки в воде и проводки по спиртам восходящей концентрации кусочки печени заливали в парафин и приготавливали срезы толщиной 5—7 мкм. Иммуногистохимические исследования срезов печени были проведены с использованием стрептавидин-биотинового метода (Shi et al., 1991). Иммуногистохимическое окрашивание проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Для демаскирования антигенов срезы помещали на 10 мин в 0.01 М буферный раствор цитрата натрия (рН 6.0) при 100 °С, после охлаждения до комнатной температуры их переносили в фосфатно-солевой буфер (PBS) с добавлением 0.5 % Tween. Далее срезы помещали на 20 мин в 3%-ный раствор перекиси водорода, приготовленный на PBS, споласкивали в PBS-буфере и наносили на них первичные антитела. Через 60 мин срезы дважды промывали PBS с 0.5 % Tween и наносили на биотинили-

рованные вторичные антитела. Через 30 мин срезы вновь дважды промывали PBS и инкубировали в течение 20 мин со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (ДАКО, Дания). Активность пероксидазы выявляли с помощью хромогена 3'3'-диаминобензидина (Dako-Cytomation, США). После иммуногистохимических реакций срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера.

В работе были использованы моноклональные антитела к γ -тубулину и pKi-67 (разведение 1 : 200; Santa Cruz, США). При анализе препаратов, окрашенных γ -тубулином, подсчитывали число клеток с разным количеством centrosом на 1000 гепатоцитов. На препаратах, окрашенных pKi-67, по характеру окрашивания определяли фазу клеточного цикла, на которой находятся клетки.

Для приготовления препаратов изолированных гепатоцитов измельченные кусочки печени помещали на 15 мин в смесь равных объемов 0.067 М К,Na-фосфатного буфера, рН 8.0, и 5%-ного раствора сахарозы. Затем кусочки переносили в 0.067 М,Na-фосфатный буфер, рН 7.4, и выдерживали в течение 8 мин. Далее из кусочков готовили мазки клеток, которые фиксировали метанолом (Кудрявцева и др., 1970). Препараты изучали с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axioscop FL-40, переданного Фондом им. Александра фон Гумбольдта (ФРГ).

Поскольку причиной образования дополнительных centrosом может быть окислительный стресс (Chae et al., 2005), который индуцируется ферментами метаболизма N-НДМА, в частности цитохромом P450 (Lee et al., 1996), в печени животных контрольной и опытной групп с помощью биохимических методов определяли концентрацию МДА и цитохрома P450, а также активность каталазы. Для проведения биохимического анализа печень измельчали, готовили 10%-ный гомогенат в 0.05 М Трис-НСl-буфере (рН 7.4), который затем центрифугировали при 300 г в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли концентрацию МДА (Ohkawa et al., 1979), цитохрома P450 (Matsubara et al., 1976) и активность каталазы (Luck, 1954).

Кроме того, для визуализации клеток, участвующих в метаболизме N-НДМА, использовали иммуногистохимическую реакцию на цитохром P450 2E1 — ключевой фермент окисления N-НДМА в суперсемействе цитохрома P450. Для этого применяли поликлональные антитела к цитохрому P450 2E1 в разведении 1 : 1000 (Lifespan Biosciences, США).

Результаты проведенных исследований подвергали статистической обработке. Определяли средние значения и границы доверительного интервала при 95%-ном уровне значимости. Достоверность различий между величинами оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты выявления centrosом с помощью иммуногистохимического окрашивания на γ -тубулин в клетках печени контрольных и интоксцированных N-НДМА крыс представлены на рис. 1 и в таблице.

В гепатоцитах контрольных крыс centrosомы обнаружены в виде одной (99.4 %) и реже двух (0.6 %) темноокрашенных коричневых точек, локализованных преимущественно около ядра (рис. 1, а; см. таблицу). Известно, что в норме гепатоциты взрослых животных практически не пролиферируют и находятся главным образом в G₀-пе-

Доля гепатоцитов с разным количеством centrosом
через различные интервалы времени после воздействия
на крыс N-НДМА (% , $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Время после воздействия N-НДМА, ч	Клетки с 1 centrosомой	Клетки с 2 centrosомами	Клетки с 3 centrosомами
0, контроль	99.4 ± 0.5	0.6 ± 0.5	—
24	98.9 ± 0.9	1.1 ± 0.6	—
48	88.6 ± 1.7 ^a	10.2 ± 1.5 ^a	1.2 ± 0.1
72	82.9 ± 0.8 ^a	16.4 ± 0.8 ^a	0.7 ± 0.1 ^b
96	97.5 ± 1.1	2.2 ± 1.1	0.3 ± 0.1 ^b
120	98.7 ± 0.27	1.0 ± 0.3	0.3 ± 0.1 ^b

^a $P < 0.001$ — относительно контроля. ^b $P < 0.001$ и ^B $P < 0.01$ — относительно группы 48 ч после воздействия.

риде (Бродский, Урываева, 1981), для которого характерно наличие в клетках только одной centrosомы. Однако сразу после вступления клеток в S-фазу centrosома дублируется (Онищенко, Ченцов, 1986; Wong, Stearns, 2003). В гепатоцитах крыс через 24 ч после воздействия

N-НДМА количество centrosом практически соответствовало их числу в печени контрольных животных (см. таблицу). По-видимому, в течение 1-х сут после воздействия N-НДМА значительной гибели гепатоцитов не происходит (Oyaizu et al., 1997; Yasuda et al., 2000) и большинство клеток продолжает находиться в G₀-периоде. Через 48 ч после воздействия N-НДМА, которое вызывает гибель гепатоцитов и индуцирует пролиферативные процессы в печени, помимо клеток с одной (88.6 %) и двумя (10.2 %) centrosомами выявляли клетки с тремя (1.2 %) centrosомами и более (рис. 1, б, в; см. таблицу). Увеличение количества гепатоцитов с двумя centrosомами свидетельствовало о том, что через 48 ч после воздействия N-НДМА клетки вступали в S-фазу клеточного цикла. Появление в это время клеток с тремя centrosомами и более, вероятно, связано с активацией процессов окислительного стресса, индуцируемого метаболизмом N-НДМА (Yang et al., 1990; Day et al., 1993). Показано, что образующиеся при этом активные формы кислорода приводят к изменениям в структуре белка центрина, регулирующего амплификацию centrosом (Blouquit et al., 2007). Следствием появления дополнительных centrosом в клетках после 48 ч воздействия N-НДМА явилось увеличение частоты

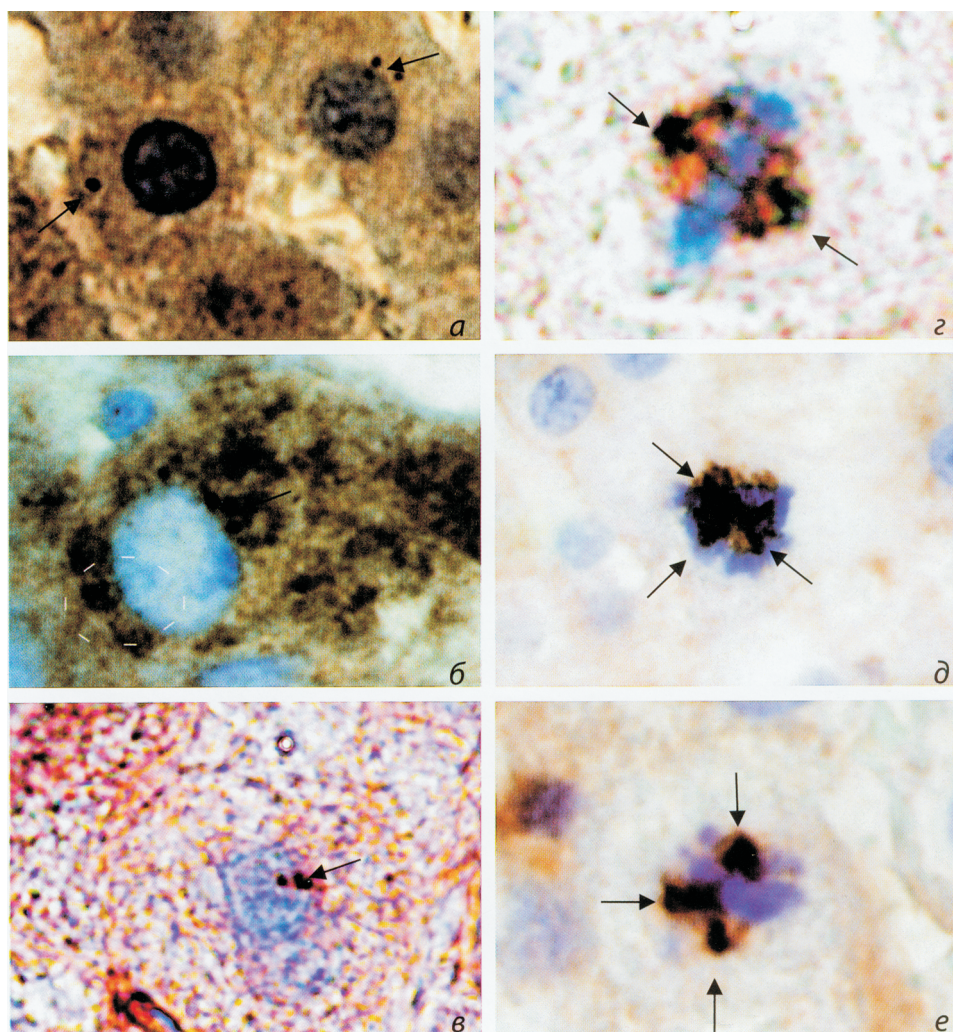


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание срезов печени на γ -тубулин.

a — гепатоциты с 1—2 centrosомами, контроль; б, в — гепатоциты с 3 centrosомами и более, 48 ч после воздействия N-НДМА; г — нормальная метафазная пластинка; д, е — многополюсные митозы. Об. 100 × 1.25. Centrosомы отмечены стрелками.

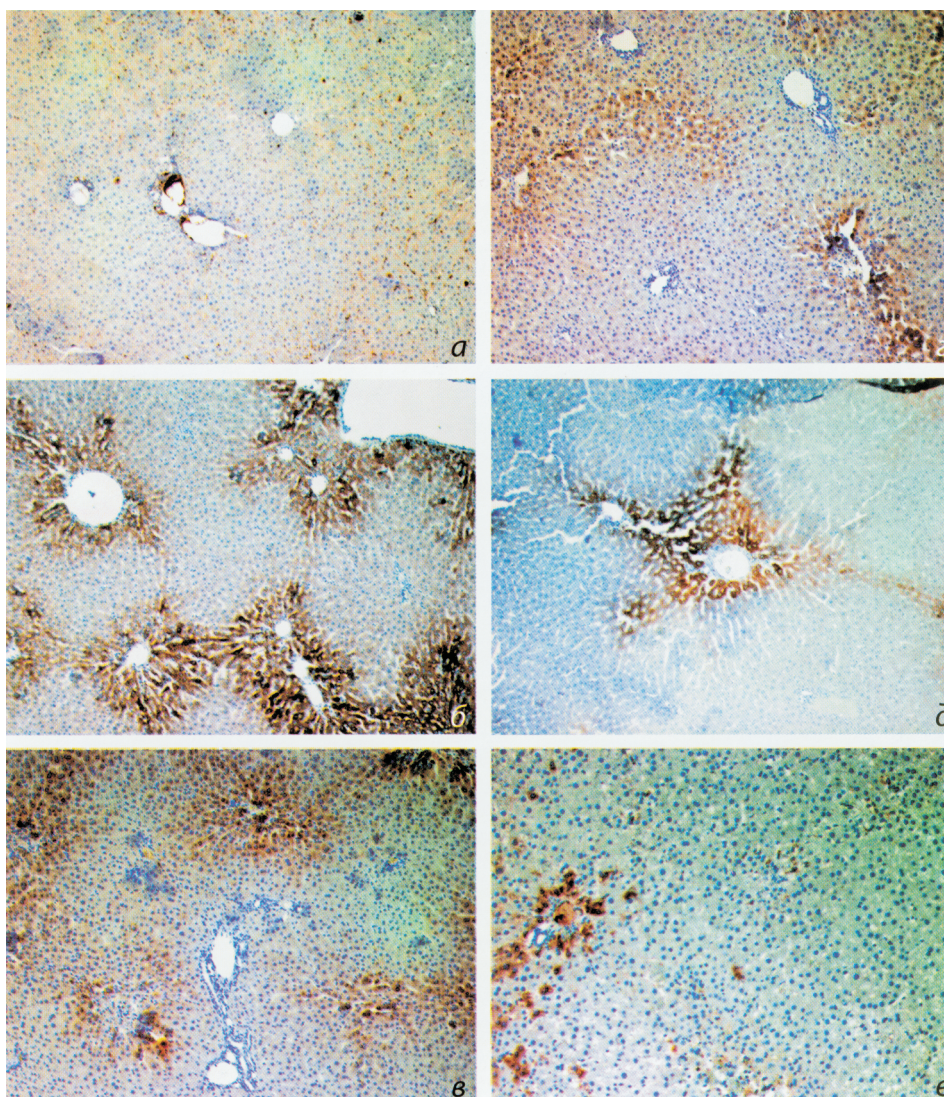


Рис. 2. Срезы печени крыс контрольной и опытной групп.

Иммуногистохимическая реакция на цитохром P450 2E1. Продукт реакции *коричневого цвета*. а — контроль; б—е— 24, 48, 72, 96 и 120 ч после воздействия N-НДМА. Об. 10 × 0.25.

ты трехполюсного митоза (рис. 1, *з—е*), который является наиболее распространенным вариантом многополюсного митоза (Keryer et al., 1984; Sattler et al., 1989; Eckl, 1993). Показано, например, что в первичной клеточной культуре гепатоцитов трехполюсные митозы составляли до 80 % от многополюсных митозов (Eckl, 1993). Митотических веретен с четырьмя полюсами и более мы не наблюдали. Предполагается, что низкая вероятность образования четырех полюсов деления и более связана со способностью дополнительных centrosом объединяться (Quintyne et al., 2005).

Через 72 ч после воздействия N-НДМА доля клеток с одной centrosомой снижалась до 82.9 %, а с двумя — увеличивалась до 16.3 %. Однако количество клеток с тремя centrosомами и более снижалось по сравнению с предыдущим сроком почти вдвое (до 0.7 %). В дальнейшем, через 96 и 120 ч, доля гепатоцитов с одной centrosомой продолжала увеличиваться, а относительное количество клеток с двумя centrosомами и более — снижать-

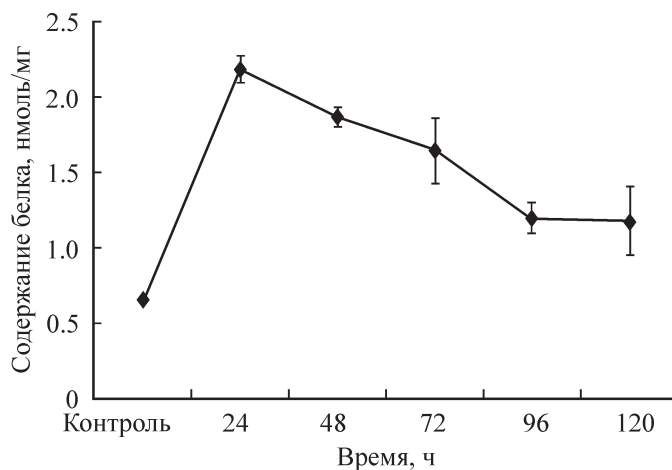


Рис. 3. Изменение содержания цитохрома P450 в печени крыс после однократного воздействия N-НДМА.

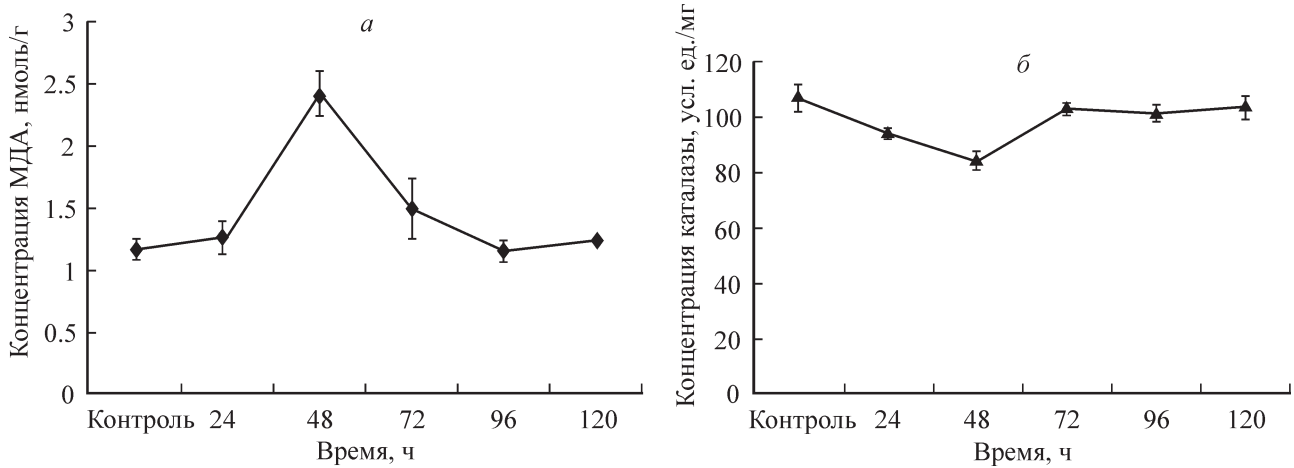


Рис. 4. Изменение концентрации МДА (а) и каталазы (б) в печени крыс после однократного воздействия N-НДМА.

ся (см. таблицу). Снижение количества клеток с тремя центросомами и более через 72 ч после воздействия N-НДМА, по-видимому, свидетельствует об уменьшении образования радикалов кислорода и завершении метаболизма N-НДМА (Kawanishi et al., 1985).

Как уже отмечалось выше, цитохром P450 2E1 принимает активное участие в метаболизме нитрозоаминов, в частности N-НДМА (Guengerich et al., 1991). В ходе метаболической активации N-НДМА цитохром P450 2E1 запускает свободнорадикальные реакции, которые приводят к

развитию токсических эффектов этого ксенобиотика (Yang et al., 1990; Day et al., 1993). В связи с этим было проведено иммуногистохимическое и биохимическое определение уровней ферментов метаболизма N-НДМА. Результаты этих исследований, приведенные на рис. 2 и 3, показали, что экспрессия цитохрома P450 2E1 происходит в период 24—48 ч после воздействия ксенобиотика. Экспрессия цитохрома в это время сопровождается значительным увеличением его содержания в ткани (рис. 3) и интенсивным окрашиванием цитоплазмы центролобу-

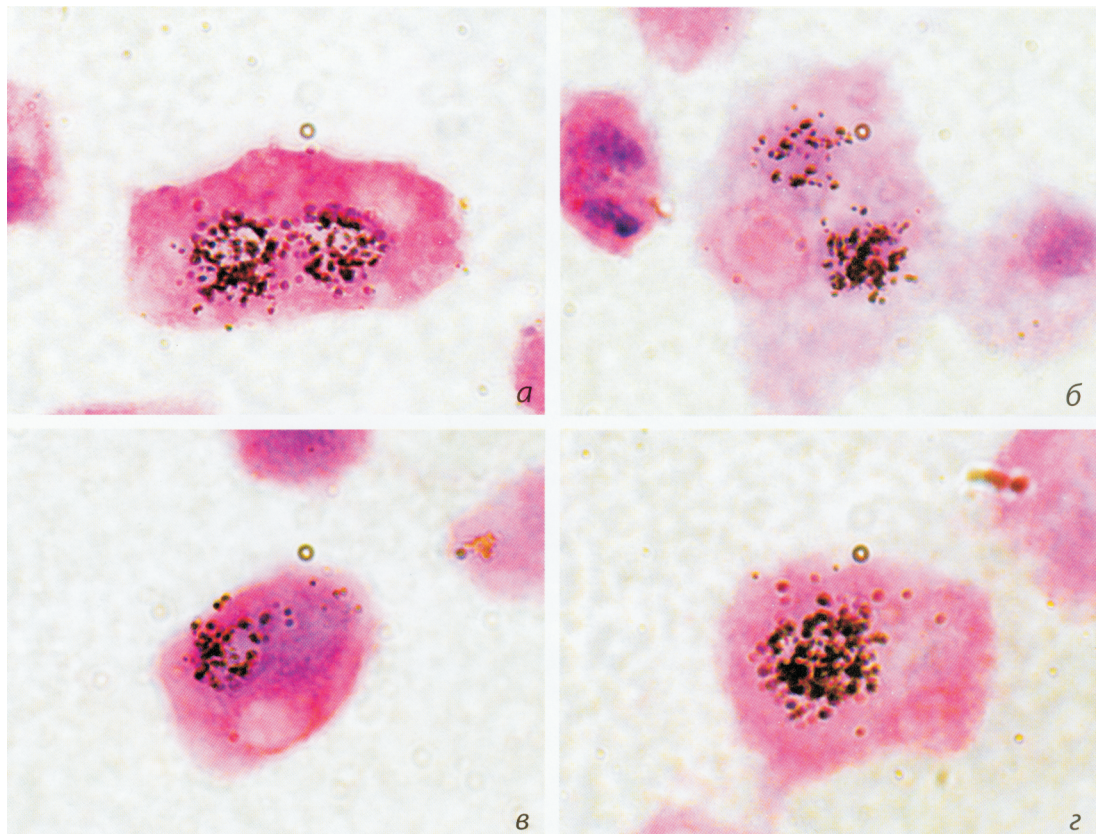


Рис. 5. Автографы изолированных гепатоцитов, меченных ^3H -тимидином.

а — двуядерный гепатоцит крыс контрольной группы с одинаковым мечением ядер; б—г — двуядерные гепатоциты крыс, интоксцированных N-НДМА, с неодинаковым мечением ядер. Об. 100×1.25 .

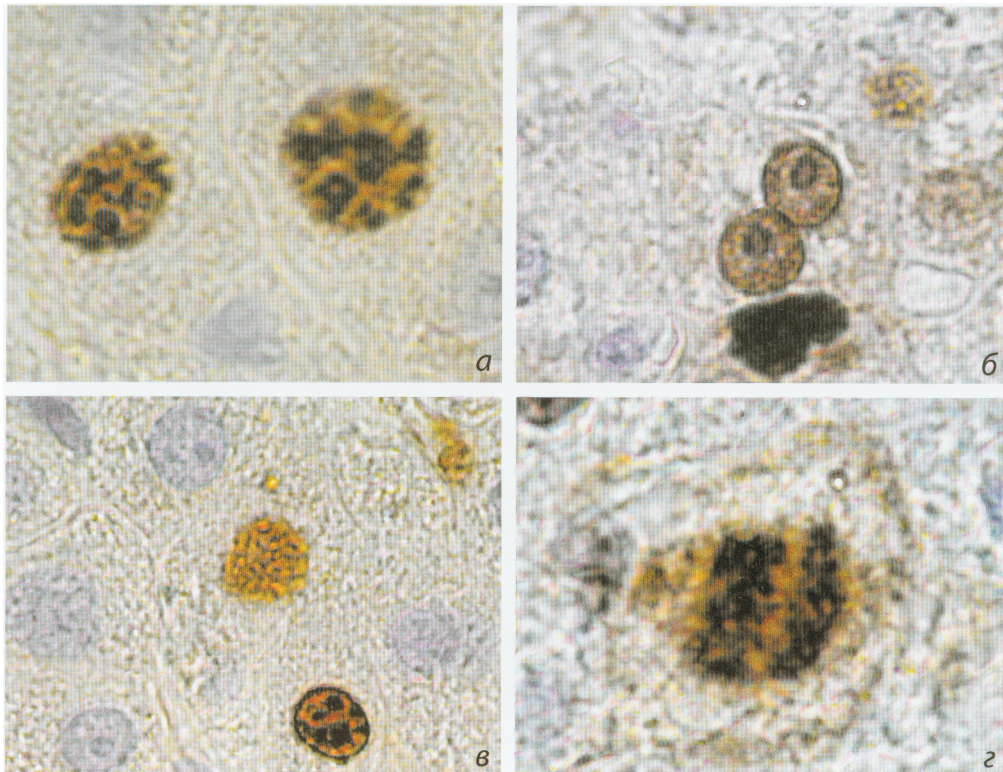


Рис. 6. Иммуногистохимическое окрашивание гепатоцитов на pKi-67 после 48 ч воздействия N-НДМА.
 а — G₁-фаза, б — фазы S и G₂; в — профазы и з — анафазы митоза. Об. 100 × 1.25.

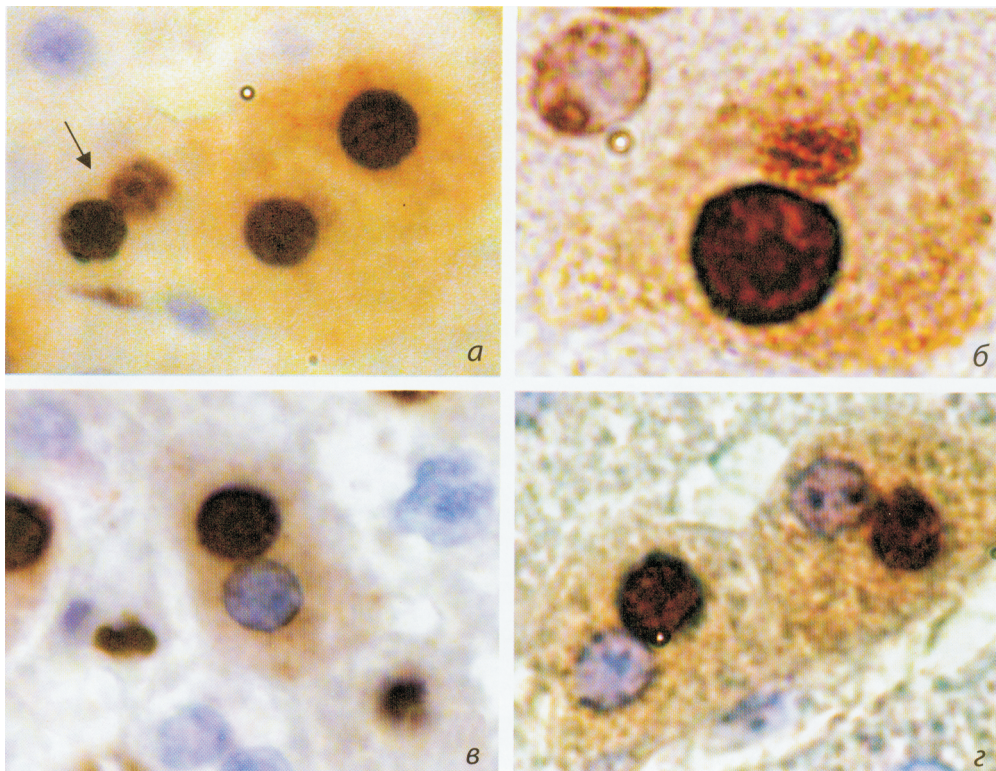


Рис. 7. Иммуногистохимическое окрашивание гепатоцитов на pKi-67 после 48 ч воздействия N-НДМА.
 а — двуядерный гепатоцит (отмечен стрелкой), у которого одно ядро находится в S-фазе, а другое — в G₁-фазе; б — двуядерный гепатоцит, у которого одно ядро находится в S-фазе, а другое — в анафазе митоза; в — двуядерный гепатоцит, у которого одно ядро находится в S-фазе, а другое — в G₀-фазе; з — двуядерные клетки, у которых одно ядро находится в G₁-фазе, а другое — в G₀-фазе. Об. 100 × 1.25.

лярных гепатоцитов (рис. 2, б, в). Содержание фермента через 24—48 ч после воздействия N-НДМА увеличилось по сравнению с контролем в 3.3 и 2.8 раза соответственно. На последующих сроках (72—120 ч) наблюдалось уменьшение интенсивности окрашивания цитохрома P450 2E1 и снижение содержания цитохрома P450 (рис. 2, з—е; 3).

В свою очередь результаты биохимического анализа состояния про- и антиоксидантных систем печени свидетельствуют о том, что воздействие N-НДМА приводит через 24—48 ч к увеличению в ткани концентрации МДА, вторичного продукта ПОЛ, в 1.1—2.0 раза и снижению активности каталазы N-НДМА, фермента антиоксидантной системы клетки, в 1.1—1.3 раза. Однако через 72 ч концентрация МДА и активность каталазы в печени крыс опытной группы приближались к контрольным значениям (рис. 4, а, б). На основании полученных результатов можно заключить, что индукция экспрессии цитохрома P450 2E1, вызванная интоксикацией N-НДМА, приводит к непродолжительному окислительному стрессу, который нарушает регуляцию дупликации centrosом и способствует прохождению многополюсных митозов в гепатоцитах.

Помимо амплификации centrosом вероятным механизмом образования многоядерных гепатоцитов может быть асинхронный синтез ДНК и асинхронный митоз в двуядерных гепатоцитах. Результаты проведенного автордиографического исследования показали, что у животных, интоксигированных N-НДМА, в клеточной популяции паренхимы печени наряду с двуядерными гепатоцитами с одинаково метящимися ядрами встречаются клетки, у которых одно ядро метится, а другое — нет, или интенсивность включения предшественника ДНК в ядрах различна (рис. 5, а—з). Эти данные свидетельствуют об асинхронности синтеза ДНК в двуядерных клетках интоксигированных животных. Для более полного доказательства возможности асинхронного вступления ядер двуядерных клеток в митоз было проведено иммуногистохимическое окрашивание ядер гепатоцитов на pKi-67 (рис. 6). Ядерный белок pKi-67 является маркером пролиферации, так как его экспрессия начинается с G₁-фазы и продолжается до периода G₀ следующего цикла (Solovei et al., 2006). Установлено, что pKi-67 участвует в регуляции синтеза рибосомной РНК и связан с формированием ядрышка, а также с его преобразованием в ходе клеточного цикла (Bullwinkel et al., 2006). При иммуногистохимическом выявлении данного белка наблюдается разный характер окрашивания внутриядерных структур (ядрышек и хроматина), по которому можно судить о нахождении ядер на различных стадиях клеточного цикла (Solovei et al., 2006).

В нашем исследовании позитивно окрашенные pKi-67 клетки также анализировали по характеру иммуногистохимического окрашивания ядра. Клетки в G₁-фазе определяли по наличию множества мелких окрашенных в коричневый цвет гранул (рис. 6, а), представляющих собой предядрышки, которые в этом периоде начинают расти и объединяться друг с другом (Jimenez-Garcia et al., 1994). О нахождении гепатоцитов в S- и G₂-фазах судили по наличию сформированного ядрышка, окрашенного в темно-коричневый цвет (рис. 6, б), особенно по его периферии (Kill, 1996). Клетки в поздней G₂-фазе и ранней профазе митоза выявляли по диффузной окраске нуклеоплазмы (рис. 6, в), так как в это время ядрышко распадалось. О нахождении клеток в митозе (поздняя профазы—телофаза) судили по отсутствию ядерной оболочки,

наличию конденсированного хроматина в геометрическом центре клетки или на полюсах (рис. 6, з), интенсивно окрашенных в коричневый цвет (Solovei et al., 2006). Отсутствие коричневого окрашивания свидетельствовало о нахождении клеток в G₀-периоде; в этом периоде ядерные структуры окрашивались гематоксилином Майера в сине-фиолетовый цвет (Gerlach et al., 1997). На рис. 7 представлены микрофотографии многоядерных гепатоцитов, позитивно окрашенных pKi-67 через 48 ч после воздействия N-НДМА. В клеточной популяции встречались двуядерные гепатоциты с разным окрашиванием ядра. Например, встречались клетки, в которых: 1) одно ядро находилось в S- и G₂-фазах, а другое — в G₁-фазе клеточного цикла (рис. 7, а); 2) одно ядро — в S- и G₂-фазах, а другое — в анафазе митоза (рис. 7, б); 3) одно ядро — в S- и G₂-фазах, а другое — в G₀-фазе (рис. 7, в); 4) одно ядро в G₁-фазе, а другое в G₀-фазе (рис. 7, з). В первом случае после завершения митоза образуются три одноядерные клетки, при условии что второе ядро, находящееся в G₁-фазе, не перешло точку рестрикции. При отсутствии цитокинеза в этом случае образуется одна трехъядерная клетка. Ситуация, когда второе ядро в G₁-фазе переходит точку рестрикции, может привести либо к образованию одной четырехъядерной клетки (если деление не завершается цитокинезом), либо к образованию четырех одноядерных клеток (если цитокинез имеет место). В третьем и четвертом случаях, скорее всего, образуются трехъядерные клетки, так как для перехода ядра из G₀-фазы в G₁-фазу требуются внешние пролиферативные стимулы (Loyer et al., 1996).

Причиной, лежащей в основе асинхронного вступления ядер в клеточное деление, может быть повреждение ДНК и белков, регулирующих клеточный цикл (Del Campo et al., 2005). Установлено, что N-НДМА обладает как гепатоксическим, так и генотоксическим действием (Lorr et al., 1984; Sawada et al., 1991; Kolumbaeva et al., 2005). Это соединение способно вызывать алкилирование нуклеиновых кислот, приводя к образованию ДНК-аддуктов (Souliotis et al., 2002). В настоящем исследовании было установлено, что в течение 24—48 ч после воздействия на крыс N-НДМА в печени значительно возрастает концентрация МДА и снижается активность каталазы. Полученные данные свидетельствуют об активации процессов свободнорадикального окисления, которые, по-видимому, приводят к образованию ДНК-аддуктов и снижению активности ферментов репарации ДНК (Bartsch et al., 1989; Lin, Hollenberg, 2001; Marnett, 2002; Song et al., 2003). В результате активность ферментов антиоксидантной системы и ферментов репарации становится недостаточной для устранения этих повреждений в ядрах двуядерных клеток, способствуя прохождению в них асинхронного синтеза ДНК и асинхронного митоза.

Таким образом, можно заключить, что токсическое действие N-НДМА приводит к различным нарушениям деления двуядерных гепатоцитов, таким как многополюсные митозы, асинхронное вступление ядер в митотический цикл и отсутствие цитотомии, которые могут быть причиной образования многоядерных клеток в печени. Нарушения клеточного деления, приводящие к появлению многоядерных клеток, протекали на фоне активации цитохрома P450 2E1 и окислительного стресса в печени.

Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке программ фундаментальных исследований Министерства образования и наук Республики Казахстан (проект 0106PK00280).

Список литературы

- Бродский В. Я., Урываева И. В. 1981. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука. 259 с.
- Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1970. Определение гликогена в клетках печени крыс с использованием флуоресцентного красителя аурамина. Цитология. 12 (8) : 1060—1067.
- Онищенко Г. Е., Ченцов Ю. С. 1986. Строение центриолярного комплекса в гепатоцитах интактной и регенерирующей печени мыши. Цитология. 28 (4) : 403—408.
- Осипенко Б. Г., Савченков М. Ф. 2002. Молекулярные механизмы гепатотоксического действия нитрозаминов. Бюл. СО РАМН. 2 (104) : 55—58.
- Шалахметова Т. М., Мамырбаева З. Ж., Берсимбаев Р. И., Штейн Г. И., Кудрявцев Б. Н. 1998. Клеточные механизмы постнатального роста печени при хроническом воздействии на крыс сульфата кадмия и хлорида стронция. Цитология. 40 (5) : 417—431.
- Anatskaya O. V., Kudryavtsev B. N. 1996. Multinucleate hepatocytes in the mouse-like hamster *Calomyscus mystax* (Kashkarov). Biomed. Lett. 53 : 85—96.
- Bartsch H., Hietanen E., Malaveille C. 1989. Carcinogenic nitrosamines: free radical aspects of their actions. Free Radical Biol. Med. 7 : 637—644.
- Blouquit Y., Duchambon P., Brun E., Marco S., Rusconi F., Siccard-Roselli S. 2007. High sensitivity of human centrin 2 toward radiolytical oxidation: C-terminal tyrosinyl residue as the main target. Free Radical Biol. Med. 43 : 216—228.
- Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Lüdemann A., Wohlenberg C., Gerdes J., Scholzen T. 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. J. Cell. Physiol. 206 : 624—635.
- Chae S., Yun C., Um H., Lee J. H., Cho H. 2005. Centrosome amplification and multinuclear phenotypes are induced by hydrogen peroxide. Exp. Mol. Med. 37 : 482—487.
- Day Y., Rashba-Step J., Cederbaum A. U. 1993. Stable expression of human cytochrome P450 2E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. Biochemistry. 32 : 6928—6937.
- Del Campo A., Bracho M., Marcano L., Guíñez J., De La Torre D. C., 2005. DNA injury induced by 5-aminouracil and caffeine in G₂ checkpoints path of higher plant cells. Biocell. 29 : 169—176.
- Devaney K., Goodman Z. D., Ishak K. G. 1992. Postinfantile giant-cell transformation in hepatitis. Hepatology. 24 : 737—745.
- Eckl P. M. 1993. Occurrence and possible consequences of multipolar mitoses in primary cultures of adult rat hepatocytes. J. Cell. Physiol. 3 : 601—607.
- Fujimoto Y., Oyamada M., Hattori A., Takahashi H., Sawaki M., Dempo K., Mori K., Nagao M. 1989. Accumulation of abnormally high ploid nuclei in the liver of LEC rats developing spontaneous hepatitis. Jap. J. Cancer Res. 80 : 45—50.
- Fuller S. D., Gowen B. E., Reinsch S., Sawyer A., Buendia B., Wepf R., Karsenti E. 1995. The core of the mammalian centriole contains gamma-tubulin. Curr. Biol. 5 : 1384—1393.
- Gerlach C., Sakkab D. Y., Scholzen T., Dassler R., Alison M. R., Gerdes J. 1997. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. Hepatology. 26 : 573—578.
- Guengerich F., Kim D., Iwasaki M. 1991. Role of human cytochrome P-450 2E1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. Chem. Res. Toxicol. 4 : 168—179.
- Jimenez-Garcia L. F., Segura-Valdez M. D., Ochs R. L., Rothblum L. I., Hannan R., Spector D. L. 1994. Nucleologenesis — U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-ribosomal-RNA transcription after mitosis. Mol. Biol. Cell. 5 : 955—966.
- Kawanishi T., Ohno Y., Takahashi A., Takanaka A., Kasuya Y., Omori Y. 1985. Substrate concentration dependency of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylbenzylamine metabolism in rat liver. Carcinogenesis. 6 : 823—827.
- Kayser G., Gerlach U., Walch A., Nitschke R., Haxelmans S., Kayser K., Hopt U., Werner M., Lassmann S. 2005. Numerical and structural centrosome aberrations are an early and stable event in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal carcinomas. Virchows Arch. 447 : 61—65.
- Keryer G., Ris H., Borisy G. G. 1984. Centriole distribution during tripolar mitosis in Chinese hamster ovary cells. J. Cell Biol. 98 : 2222—2229.
- Kill I. R. 1996. Localization of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. J. Cell Sci. 109 : 1253—1263.
- Kolumbaeva S. J., Shalakhmetova T. M., Bersimbaev R. I., Begimbetova D. A., Umbaev B. A. 2005. Genetic consequences from exposure to rocket fuel; chemicals experimentally and naturally. In: Proceedings of 9th International Conference on Environmental Mutagens, and the 36th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society. San Francisco. 255.
- Lee V. M., Keefer L. K., Archer M. C. 1996. An evaluation of the roles of metabolic denitrosation and hydroxylation in the hepatotoxicity of N-nitrosodimethylamine. Chem. Res. Toxicol. 9 : 1319—1324.
- Lin H., Hollenberg P. F. 2001. N-nitrosodimethylamine-mediated formation of oxidized and methylated DNA bases in a cytochrome P450 2E1 expressing cell line. Chem. Res. Toxicol. 14 : 562—566.
- Lorr N. A., Miller K. W., Chung H. R., Yang C. S. 1984. Potentiation of the hepatotoxicity of N-nitrosodimethylamine by fasting, diabetes, acetone and isopropanol. Toxicol. Appl. Pharmacol. 73 : 423—431.
- Loyer P., Cariou S., Glaise D., Bilodeau M., Baffet G., Gugen-Guillouzo C. 1996. Growth factor dependence of progression through G₁ and S phase of adult rat hepatocytes *in vitro*. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G₁. J. Biol. Chem. 271 : 11484—11492.
- Luck H. 1954. Quantitative determination of catalase activity of biological material. Enzymologia. 17 : 31—40.
- Marnett L. J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology. 181 : 219—222.
- Matsubara T., Koike M., Touchi A., Tochino Y., Sugeno K. 1976. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. Anal. Biochem. 75 : 596—603.
- Nitschke K. D., Burek J. D., Bell T. J., Kociba R. J., Ramo L. W., McKenna M. J. 1988. Methylene chloride: a 2-year inhalation toxicity and oncogenicity study in rats. Fundam. Appl. Toxicol. 11 : 48—59.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95 : 351—358.
- Oyaizu T., Shikata N., Senzaki H., Matsuzawa A., Tsubura A. 1997. Studies on the mechanism of dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in mice. Exp. Toxicol. Pathol. 49 : 375—380.
- Quintyne N. J., Reing J. E., Hoffelder D. R., Gollin S. M., Saunders W. S. 2005. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. Science. 307 : 127—129.
- Rachmilewitz M., Rosin A., Doljanski L. 1950. Observation on the mitotic reaction induced in the livers of rats by thiourea. Amer. J. Pathol. 26 : 937—949.
- Rubin K. A., Starodubov S. M., Onishchenko G. E. 1999. Effect of colcemid on the centrosome and microtubules in dermal melanophores of *Xenopus laevis* larvae *in vivo*. Cell. Mol. Biol. 45 : 1099—1117.
- Rudzki Z., Szczudrawa J., Stachura J. 1989. Morphometry of normal, regenerating and cancerous hepatocytes. Folia Histochem. Cytobiol. 27 : 141—148.
- Sattler C. A., Sawada N., Sattler G. L., Pitot H. C. 1989. Electron microscopic and time lapse studies of mitosis in cultured rat hepatocytes. Hepatology. 8 : 1540—1549.
- Sawada S., Yamanaka T., Yamatsu K., Furihata C., Matsushima T. 1991. Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchanges (SCEs) in rat liver induced *in vitro* by hepatocarcinogens including heterocyclic amines. Mutat. Res. 251 : 59—69.
- Scampini G., Nava A., Newman A. J., Torre P. D., Mazué G. 1993. Multinucleated hepatocytes induced by rifabutin in rats. Toxicol. Pathol. 21 : 369—376.

Sheehy P. F., Wakonig-Vaartaja T., Winn R., Clarkson B. D. 1974. Asynchronous DNA synthesis and asynchronous mitosis in multinuclear ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 34 : 991—996.

Shi S. R., Key M. E., Karla K. L. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39 : 741—748.

Solovei I., Schermelleh L., Albiez H., Cremer T. 2006. Detection of the cell cycle stages *in situ* in growing cell populations. In: *Cell biology handbook: a laboratory manual*. 3rd edition. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 1 : 291—299.

Song J. Y., Lim J. W., Kim H., Morio T., Kim K. H. 2003. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 278 : 36 676—36 687.

Souliotis V. L., Henneman J. R., Reed C. D., Chhabra S. K., Diwan B. A., Anderson L. M., Kyrtopoulos S. A. 2002. DNA adducts and liver DNA replication in rats during chronic exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA) and their relationships to the do-

se-dependence of NDMA hepatocarcinogenesis. *Mutat. Res. Fundam. Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 500 : 75—87.

Wheeler D. A., Edmondson H. A., Reynolds T. B. 1986. Spontaneous liver cell adenoma in children. *Amer. J. Clin. Pathol.* 85 : 6—12.

Wong C., Stearns T. 2003. Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication. *Nature Cell Biol.* 5 : 539—544.

Yang C. S., Yoo J. S., Ishizaki H., Hong J. 1990. Cytochrome P-45011E1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab. Rev.* 22 : 147—159.

Yasuda M., Okabe T., Itoh J., Takekoshi S., Hasegawa H., Nagata H., Osamura R., Watanabe K. 2000. Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation: application of acute liver injury models induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and dimethylnitrosamine (DMN). *J. Histochem. Cytochem.* 48 : 1331—1339.

Поступила 2 VIII 2008

MECHANISMS OF HEPATOCYTE MULTINUCLEATION IN RATS EXPOSED TO N-NITROSODIMETHYLAMINE (NDMA)

T. M. Shalakhmetova,¹ B. A. Umbayev,¹ S. J. Kolumbayeva,¹ B. N. Kudryavtsev²

¹ Al-Farabi Kazakh National University, Alma-Ata, and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: Shalakhmetova_T@kaznu.kz

Mechanisms of hepatocyte multinucleation were investigated in rats exposed to N-nitrosodimethylamine (NDMA). Using immunohistochemical reaction to γ -tubulin it was established that the number of cells containing three and more centrosomes increased in 48 h after NDMA injection. It was shown that formation of extra-centrosomes in hepatocytes was enhanced by oxidative stress induced by cytochromes P450 superfamily in the course of NDMA metabolism. NDMA administration led to a sharp increase in cytochrome P450 content in the liver, especially in 24 and 48 h (3.3 and 2.8 times respectively) after NDMA injection. Extensive staining of cytoplasm in the centrilobular hepatocytes was revealed by immunohistochemical reaction to cytochrome P450 2E1 in 24 and 48 h after the NDMA injection. Malonaldehyde (the derivative of lipid peroxidation) was shown to increase 1.1—2.0 times, whereas catalase activity as of the antioxidative agent reduced to 1.1—1.3 times in that time. In 72—120 h after NDMA treatment, the number of cells with three or more centrosomes, the intensity of cytoplasmic staining, cytochrome P450 and malonaldehyde contents in the liver were shown to decrease, whereas catalase activity increased. In 48 h after treatment, binucleated hepatocytes with various ³H-thymidine distribution in nuclei appeared in NDMA-treated cell populations evidencing of asynchronous DNA synthesis. Immunohistochemical reaction against Ki-67 proliferation marker revealed asynchronous nuclear proliferation activity in binucleated cells spreading not only to S-phase, but also to other phases of cell cycle, and namely G₁, G₂ and M. Thus, main mechanisms of hepatocyte multinucleation under NDMA exposure are accounted for hyperamplification of centrosomes as a consequence of oxidative stress and for asynchronous DNA synthesis in the nuclei of binucleate hepatocyte followed by asynchronous acytokinetic mitosis.