

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

© *Е. В. Байдюк, А. П. Ширяева, Н. Н. Безбородкина, Г. А. Сакута*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: sakuta@yandex.ru*

На модели экспериментального хронического токсического гепатита был проведен сравнительный анализ морфофункциональных характеристик популяции гепатоцитов нормальной и патологически измененной печени крысы в процессе культивирования. С помощью флуоресцентной иммуноцитохимии показано, что гепатоциты нормальной и патологически измененной печени способны формировать в культуре хорошо развитый актиновый цитоскелет, образовывать фокальные и межклеточные контакты. Исследованы форма и локализация митохондрий в живых гепатоцитах при инкубации монослоя клеток в присутствии родамина 123. С помощью флуоресцентной цитофотометрии проведено исследование динамики содержания гликогена и уровня плоидности гепатоцитов при культивировании. Обнаружено, что состав популяции клеток, выделенных из нормальной и патологически измененной печени, различается по плоидности. В течение 5 сут культивирования избирательной элиминации гепатоцитов каких-либо классов плоидности не происходило. Содержание гликогена в гепатоцитах, полученных от крыс с токсическим гепатитом, превышало контрольное в 1.5 раза, однако после ферментативной диссоциации обе популяции гепатоцитов теряли гликоген. В культуре гепатоциты, выделенные из печени крыс с токсическим гепатитом, не восстанавливали в дальнейшем уровень гликогена, в то время как в контрольной группе происходило накопление гликогена в течение 3 сут культивирования.

К л ю ч е в ы е с л о в а: культура гепатоцитов, митохондрии, полиплоидия, гликоген.

Ранее нами было показано, что в патологически измененной печени происходят изменения как состава популяции гепатоцитов — появление клеток более высокой плоидности, сдвиг распределения по классам плоидности вправо (Кудрявцев и др., 1993; Сакута, Кудрявцев, 1996, 2005), так и их функционирования — накопление гликогена, повышение скорости потребления кислорода (Кудрявцева и др., 1989, 1995; Безбородкина и др., 2003; Ширяева и др., 2007). Оставалось неизвестным, являются эти изменения следствием нарушения структуры печени и функциональных изменений на органном уровне либо это результат повреждения самих гепатоцитов. Мы предположили, что в условиях культуры, когда клетки оказываются лишенными органной регуляции, изменения, присутствующие именно клеткам, должны проявиться в полной мере.

Характерным признаком популяции гепатоцитов, выделенных из патологически измененной печени, является увеличение доли полиплоидных клеток и появление классов плоидности, которые не встречались в нормальной печени (Сакута, Кудрявцев, 2005). По поводу значения полиплоидии для жизнеспособности и функциональных особенностей клеток существуют различные мнения. Ряд авторов связывают полиплоидизацию клеток с повышением их устойчивости к действию различных повреждающих факторов внешней и внутренней среды, а также к повышению механических и физиологических нагрузок на тот или иной орган (Бродский, Урываева, 1981). С другой стороны, увеличение плоидности коррелирует с накоплением

в клетках продуктов перекисного окисления липидов, повышением экспрессии β -галактозидазы и гена p21, а также увеличением вероятности вступления клеток в апоптоз (Sigal et al., 1999). Показано, что увеличение плоидности клеточной популяции паренхимы печени может происходить при регенерации после частичной гепатэктомии, а также при патологии и в ходе старения (Schmucker, 1990; Кудрявцев и др., 1991, 1993; Сакута, Кудрявцев, 1996). Остается неясным, является это защитной реакцией клетки на усиление нагрузки или следствием нарушений, вызванных патологическим воздействием. Показано, что клетки регенерировавшей после частичной гепатэктомии печени, имеющие значительно больший средний уровень плоидности, обладают меньшими регенераторными способностями, чем гепатоциты крыс, не подвергавшихся какому-либо воздействию (Gorla et al., 2001; Сакута, Кудрявцев, 2005). Таким образом, вопрос о том, оказывает ли увеличение плоидности, наблюдаемое при патологии, какое-либо влияние на выживаемость и функциональные свойства популяции гепатоцитов, влияет ли сам факт увеличения количества ДНК и количество ядер в клетках на их устойчивость к стрессовым воздействиям и функцию, остается неясным.

Поэтому задачей исследования стало получение культуры клеток из патологически измененной печени для исследования проявления патологии на уровне клетки и оценки влияния плоидности на функционирование и выживаемость гепатоцитов в условиях культуры.

Материал и методика

Исследование было проведено на 50 крысах-самцах Вистар, масса которых составляла 180—200 г. Животных содержали в стандартных условиях светового режима и на стандартном рационе. Экспериментальный токсический гепатит вызывали интрагастральным введением в течение 4 нед 50%-ного раствора CCl_4 в вазелиновом масле в дозе 0.2 мл/кг, при этом в качестве питья животные получали 5%-ный этанол (Beinert, Albracht, 1982; Ищенко, Мичурина, 2005). Через 1 нед после последнего введения CCl_4 крыс умерщвляли, используя тиопенталовый наркоз.

Изолированные гепатоциты крыс получали по модифицированному методу Сеглена (Seglen, 1976). С помощью микропомпы проводили перфузию печени *in situ* через воротную вену в течение 5 мин подогретым до 37 °С буфером (рН 7.4), содержащим 8.3 г/л NaCl, 0.5 г/л KCl, 2.4 г/л HEPES, 2 г/л глюкозы и 5.5 мл/л 1 М NaOH. Скорость подачи раствора была 18—20 мл/мин. Далее печень извлекали, помещали в стерильную чашку Петри в тот же буферный раствор и дальнейшие манипуляции проводили в стерильных условиях в ламинар-боксе. Печень измельчали на кусочки размером примерно 1—2 мм³. После промывки средой Игла, дополненной 0.1 % глюкозы, 0.01 М HEPES, 1 % сыворотки эмбрионов коров (СЭК) и 40 мкг/мл гентамицина, кусочки помещали в 0.5%-ный раствор коллагеназы IV типа (Sigma) в среде Игла с 0.1 М HEPES (рН 7.6). После 5 мин инкубации в ферментативном растворе при 37 °С при непрерывном встряхивании супернатант сливали. Процедуру повторяли еще 2 раза, увеличив ее длительность до 15—20 мин, каждый раз в свежей порции ферментативного раствора. Объединенную суспензию гепатоцитов пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали при 400 об/мин. Полученный осадок клеток трижды промывали средой Игла и осаждали центрифугированием. Далее гепатоциты ресуспендировали в культуральной среде, с помощью камеры Горяева подсчитывали долю жизнеспособных клеток и рассеивали их в концентрации $5 \cdot 10^5$ — $6 \cdot 10^5$ кл./мл. Через 24 ч среду с не прикрепившимися к субстрату гепатоцитами удаляли, добавляли свежую порцию среды и продолжали культивировать оставшиеся прикрепленными клетки, меняя среду каждые 2 сут. Клетки культивировали в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С на среде DMEM/F12 с добавлением 10 % СЭК, 40 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл трансферрина и 10 мкг/мл инсулина. Для культивирования гепатоцитов использовали пластиковые чашки Петри диаметром 3—5 см и 96-луночные платы (Nunc, Дания).

Для оценки количества живых клеток в суспензии использовали окраски 0.1%-ным раствором трипанового синего, акридиновым оранжевым ($\lambda = 530$ нм) и бромистым этидием ($\lambda = 630$ нм). Для выявления ранних стадий апоптоза в гепатоцитах была использована комбинированная окраска аннексином и йодистым пропидием (Annexin V apoptosis detection kit sc-4252 АК, Santa Cruz Biotechnology, США). Флуоресценцию красителей аннексина и йодистого пропидия наблюдали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SL (Leica, Германия). Для получения изображений гепатоцитов, окрашенных аннексином и йодистым пропидием, использовали объектив HCX PL APO CS 60×1.4 OIL. В работе были использованы лазеры с длинами волн 488 и 543 нм.

Для выявления функционирующих митохондрий в живых гепатоцитах их окрашивали флуоресцентным кра-

сителем родамином 123 (Sigma, США) в соответствии с методическими указаниями (Johnson et al., 1980). Монослой гепатоцитов инкубировали на покровных стеклах, покрытых за 1 сут слоем 0.1 % желатина, в среде Игла с родамином 123 (10 мкг/мл) в течение 30 мин в атмосфере с 5 % CO_2 при 37 °С. Далее инкубационную среду сливали и заливали чистой средой Игла, инкубировали стекла в течение 5 мин в тех же условиях. Данную процедуру повторяли дважды. Для сохранения жизнеспособности гепатоцитов во время микроскопирования покровные стекла с клетками помещали на предметное стекло с предварительно подготовленной герметичной камерой, заполненной подогретой культуральной средой. Флуоресценцию гепатоцитов возбуждали светом 480 нм и наблюдали в конфокальном микроскопе.

Для изучения структуры актинового цитоскелета использовали метод прямой флуоресценции. Покровные стекла с культивируемыми клетками промывали PBS для удаления неприкрепившихся клеток. Затем клетки фиксировали 3.3%-ным формальдегидом (10 мин при комнатной температуре), пермеабилizировали 0.1%-ным Тритоном X-100 на PBS (убрала) в течение 20 мин, снова промывали 3 раза в PBS и окрашивали родамин-фаллоидином (Molecular Probes, США) в течение 10 мин при 37 °С в темноте. Затем препараты промывали 3 раза PBS и заключали в 3—5 мкл 5%-ного пропиленглатата на глицерине.

Для визуализации межклеточных контактов была использована комбинированная трехцветная окраска гепатоцитов на β -катенин, актин и ДНК. Реакцию с антителами к β -катенину использовали ранее для визуализации границ отдельных гепатоцитов на срезах ткани (Guidotti et al., 2003). Покровные стекла с прикрепленными клетками отмывали в PBS. Фиксировали препараты 4%-ным формальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. После этого клетки промывали 7 раз по 5 мин раствором PBS и пермеабилizировали 10 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0.5%-ный Тритон X-100 (Sigma, США). Затем клетки промывали 5 раз по 2 мин раствором PBS и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в 3%-ном BSA, разведенном на PBS. Далее на PBS приготавливали трехкомпонентный раствор из первых антител к β -катенину, 1:200 (Invitrogen, США), реагентов для окраски ядер Торго III, 1:1000 (Molecular Probes, США) и родамин-фаллоидина для окраски актинового цитоскелета, 1:100 (Molecular Probes, США). В этом растворе клетки инкубировали 2 ч при комнатной температуре, после промывали 5 раз по 3 мин раствором PBS. Вторые антитела Alexa 488 (Invitrogen, США) разводили на PBS 1:1000 и инкубировали с ними клетки 30 мин при комнатной температуре, затем препараты промывали. Для стабилизации окраски покровные стекла обрабатывали 5%-ным пропиленглататом.

Цитофотометрическое измерение количества ДНК и гликогена проводили на препаратах-мазках, приготовленных из кусочков печени до ферментативной обработки печени, через 2 ч после выделения гепатоцитов (клетки уже подверглись ферментативной обработке, но еще не помещены в культуру) и затем на 1, 2, 3, 4 и 5-е сут культивирования. Для приготовления препаратов-мазков из кусочков печени, полученных до ферментативной обработки, использовали стандартную методику (Кудрявцева и др., 1970). Для приготовления препаратов-мазков гепатоцитов на разных сроках культивирования клетки снимали с пластиковых чашек раствором трипсин-версена. Дальнейшие операции полностью соответствовали предыдущим.

ДНК в ядрах клеток печени крыс выявляли с помощью флуоресцентного варианта реакции Фельгена, в которой использовали реактив типа Шиффа — аурамин-SO₂ (Кудрявцев, Розанов, 1974). Цитофлуориметрию ДНК в ядрах гепатоцитов, окрашенных аураминем-SO₂, производили с помощью импульсного микрофлуориметра РИФ-1. При измерениях использовали объектив 40×0.65. На каждом препарате измеряли по 300 случайно выбранных гепатоцитов.

Количественное определение гликогена проводили с помощью импульсного микрофлуориметра РИФ-1 в клетках, окрашенных с помощью флуоресцентного варианта PAS-реакции, в которой в качестве реактива Шиффа использовали аурамин-SO₂ (Кудрявцева и др., 1970).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. В случае суммирования результатов по разным животным вычисляли средние значения, взвешенные средние, стандартные отклонения и 95%-ные доверительные интервалы.

Результаты и обсуждение

Развитие экспериментального токсического гепатита сопровождалось увеличением среднего уровня плоидности гепатоцитов более чем на 20 %. Более чем в 10 раз уменьшалось количество 2с×2-гепатоцитов, увеличивалась доля 8с-клеток. Появлялись 8с×2-, 16с- и даже 16с×2-гепатоциты, которых не было в печени интактных крыс (рис. 1). Увеличенная по сравнению с нормой доля полиплоидных клеток является характерной особенностью популяции гепатоцитов в патологически измененной печени (Сакута, Кудрявцев, 1996, 2005). При ферментативной диссоциации как нормальной, так и патологически измененной печени состав популяции гепатоцитов по классам плоидности не менялся. С помощью окраски акридиновым оранжевым и бромистым этидием было показано, что клетки при выделении погибали за счет некроза. Доля неповрежденных гепатоцитов после их выделения как из нормальной, так и из патологически измененной печени варьировала в разных опытах от 70 до 90 %. Гепатоциты прикреплялись к пластику и распластывались в течение 1 сут (рис. 2). К 3-м сут клетки формировали монослой (рис. 3). При распластывании сильно увеличивалась площадь каждой клетки и диаметр ядра, что соответствовало описанным ранее изменениям гепатоцитов *in vitro* (Gomez-Lechon et al., 1981). Для визуализации цитоскелета и межклеточных контактов в первичной культуре гепатоцитов была использована трехцветная иммуноцитохимическая окраска: родамин-фаллоидин, антитела к β-катенину и Торго III для подкрашивания ядра. Большинство гепатоцитов, изолированных из нормальной и патологически измененной печени, при культивировании формировало хорошо развитый актиновый цитоскелет с мощными параллельно расположенными тяжами (рис. 4). В монослое гепатоциты образовывали межклеточные контакты, выявляемые по локализации β-катенина (рис. 5). Различий в образовании межклеточных и фокальных контактов между гепатоцитами, выделенными из нормальной и из патологически измененной печени крыс, обнаружено не было.

Комбинированное токсическое воздействие алкоголя и CCl₄ приводит к появлению в печени крыс признаков воспаления, жирового перерождения и фиброза (Ищенко, Мичурина, 2005; Ширяева и др., 2007). Сущест-

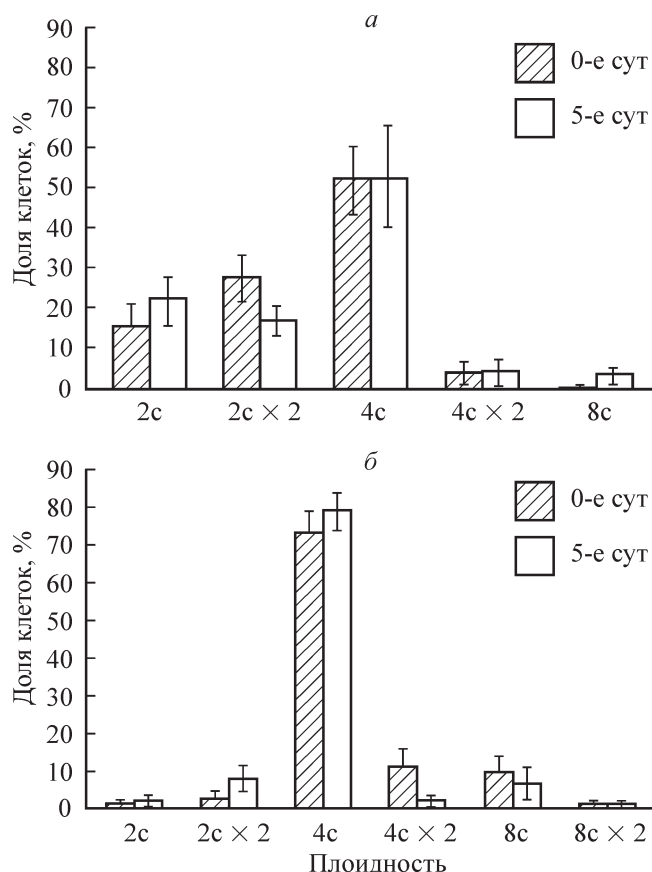


Рис. 1. Распределение гепатоцитов по классам плоидности в исходной популяции и на 5-е сут культивирования.

a — гепатоциты интактных крыс; б — гепатоциты крыс после воздействия CCl₄ и алкоголя. X ± Sx; p < 0.05.

вует несколько мнений относительно того, за счет чего именно развивается патология печени. Ряд авторов считают, что нарушения функции печени связаны исключительно со структурными изменениями, гипоксией и уменьшением количества гепатоцитов, при том что сами

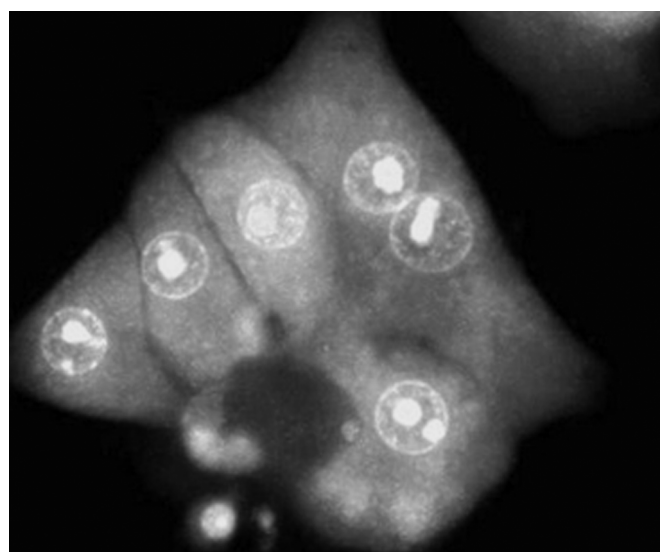


Рис. 2. Гепатоциты крыс через 1 сут культивирования. Окраска акридиновым оранжевым и бромистым этидием. Об. 63×.

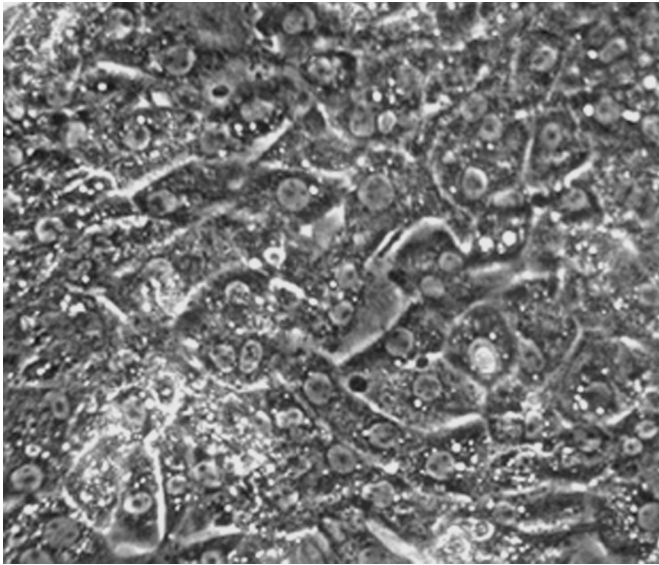


Рис. 3. Первичная культура гепатоцитов на 3-и сут.
Фазовый контраст. Об. 20×.

клетки остаются неповрежденными (Reichen et al., 1987; Le Couteur et al., 1999). Другие предполагают наличие морфофункциональных изменений самих гепатоцитов (Wiemann et al., 2002; Sato et al., 2004). Использование первичной культуры гепатоцитов позволило, во-первых, оценить жизнеспособность и функциональный статус гепатоцитов различных классов пloidности в процессе культивирования. Во-вторых, гепатоциты, выделенные из нормальной и патологически измененной печени, при помещении в культуру оказывались в условиях одинакового микроокружения, давая возможность выявить морфологические и метаболические изменения самих клеток.

Гепатоциты в нашем эксперименте выживали в культуре в течение 7—8 сут. Ежедневная элиминация клеток в процессе культивирования составляла 3—5 % и происходила за счет апоптоза. Морфологические изменения в гибнущих культивируемых гепатоцитах наблюдались уже на светооптическом уровне. Наряду с хорошо распластанными клетками появлялись сжавшиеся клетки с неровной, бугристой поверхностью. С помощью окраски

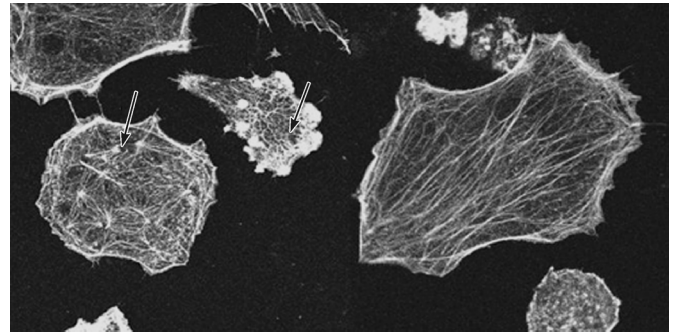


Рис. 4. Актиновый цитоскелет гепатоцитов на 3-и сут культивирования.

Окраска родамин-фаллоидином. Об. 63×.

клеток родамин-фаллоидином мы выявили различия в организации цитоскелета клеток данных морфотипов. В сжавшихся гепатоцитах наблюдалась значительная перегруппировка актиновых филаментов с их точечной конденсацией (рис. 4, *стрелки*). Мы предположили, что эти изменения могут отражать начало апоптотических изменений в культивируемых клетках. Для проверки данного предположения была использована комбинированная витальная окраска аннексином и йодистым пропидием. Подобный метод окрашивания позволяет с помощью флуоресцентной микроскопии выявлять клетки на ранних этапах апоптоза (Chan et al., 1998; Hanshaw, Smith, 2005). При окрашивании монослоя гепатоцитов именно сжавшиеся клетки проявляли способность связывать аннексин, люминесцируя в зеленой области спектра (рис. 6, *а*). В гепатоцитах, находящихся на более поздних стадиях апоптоза, кроме зеленой люминесценции мембраны наблюдалась люминесценция ядер в красной области спектра, обусловленная проникновением йодистого пропидия через нарушенную мембрану (рис. 6, *б*). По мере культивирования нарастали также структурные изменения в ядрах — конденсация хроматина и увеличение объема ядрышек (рис. 7, *б*). Таким образом, в отличие от начальных этапов получения суспензии живых гепатоцитов, когда происходит массовый некроз клеток, гибель гепатоцитов в процессе культивирования происходила преимущественно путем апоптоза. Доля апоптотических ядер не превышала 1—3 %, пloidность этих ядер была различной. До-

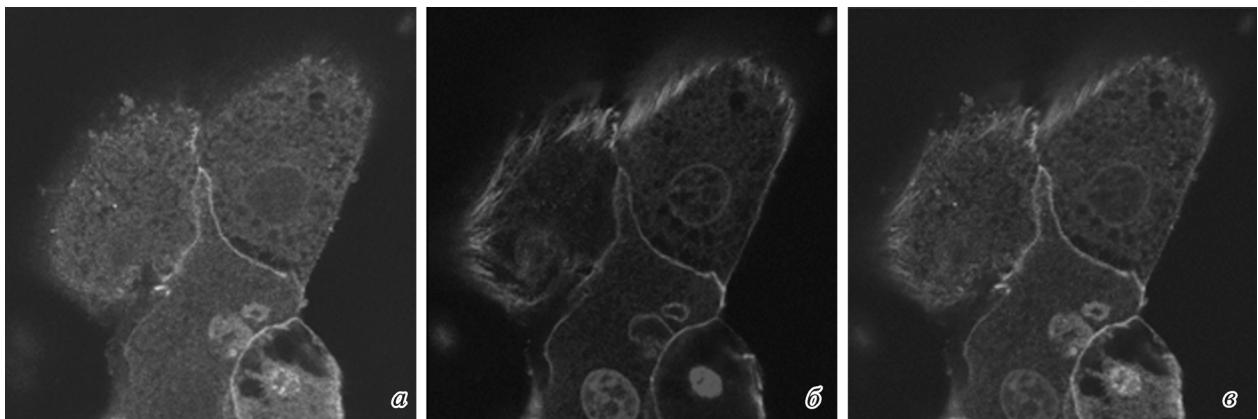


Рис. 5. Визуализация β -катенина в местах межклеточных контактов (*а*) и актинового цитоскелета (*б*) культивируемых гепатоцитов крыс.

в — совмещенное изображение двух окрасок. Об. 63×.

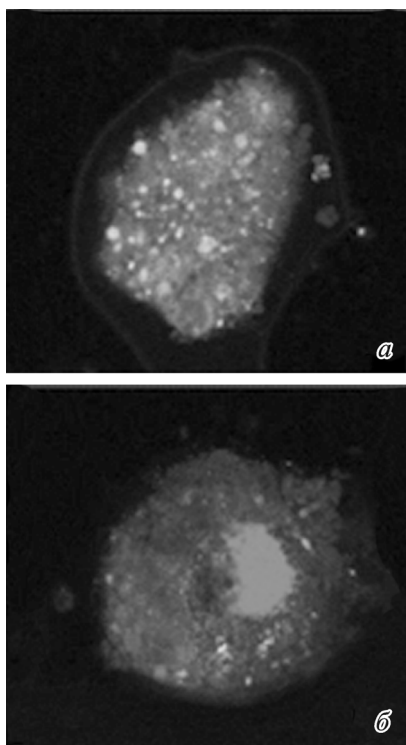


Рис. 6. Гепатоциты крыс на 3-и сут культивирования. *a* — ранний апоптоз, *б* — поздний апоптоз. Окраска аннексином и йодистым пропидием. Об. 63×.

стоверных сдвигов в распределении гепатоцитов по классам плоидности в течение 5 сут культивирования мы не выявили (рис. 1). Таким образом, наблюдающаяся в процессе культивирования элиминация гепатоцитов не была избирательной по плоидности независимо от их происхождения из нормальной или патологически измененной печени.

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 в конце концов к снижению поступления кислорода в гепатоциты (Подымова, 1993; Devi et al., 1993; Шерлок, Дули, 2002; Ширяева и др., 2007). В свою очередь гипоксия, сопровождающаяся избытком активных форм кислорода, ионов кальция и сдвигом клеточного pH, оказывает заметное влияние на структуру и функцию митохондриального аппарата клеток (Lluís et al., 2005; Shiryayeva et al., 2008).

Увеличение размеров митохондрий, уменьшение в них числа крист, а также появление гигантских митохондрий в гепатоцитах при различных поражениях печени отмечаются многими авторами (Krähenbühl et al., 1992, 2000; Welt et al., 2004). Полагают, что эти изменения митохондриального аппарата гепатоцитов в первую очередь вызваны гипоксией, к которой приводит развитие цирроза (Krähenbühl, Reichen, 1992; Welt et al., 2004). Вместе с тем остается неясным, представляют ли эти изменения адаптивную реакцию митохондрий на гипоксические условия в циррозном органе или они отражают повреждение самих органоидов. Хотя изолированные митохондрии и митохондрии в фиксированных клетках достаточно хорошо изучены, намного меньше известно об организации

и функционировании митохондриального аппарата в живой клетке. Оказалось, что гепатоциты являются довольно проблематичным объектом для прижизненного исследования, так как кроме сложностей при культивировании они плохо поддаются трансфекции, которая необходима для применения ряда витальных маркеров (Collins et al., 2002; Collins, Bootman, 2003). Нам удалось визуализировать митохондриальный аппарат гепатоцитов в культуре с помощью окраски родамином 123, специфически связывающимся с митохондриями живых клеток (Jonson et al., 1980). Было поставлено несколько экспериментов на разных сроках культивирования. В суспензии гепатоцитов, выделенных как из нормальной, так и из патологически измененной печени, митохондрии имели округлую форму (рис. 8, *a*). При формировании монослоя в культуре гепатоциты распластывались, меняя округлую форму на плоскую, характерную для всех эпителиальных клеток. Такое изменение формы гепатоцитов имело следствием изменение пространственной организации митохондрия. Было обнаружено, что протяженность и интенсивность флуоресценции митохондрий в живых гепатоцитах больше зависели от состояния культивируемых клеток на момент наблюдения, чем от их происхождения. Так, у распластанных гепатоцитов наблюдалась хорошо развитая извилистая митохондриальная сеть, особенно в «подошве» клетки, где находится большая часть контак-

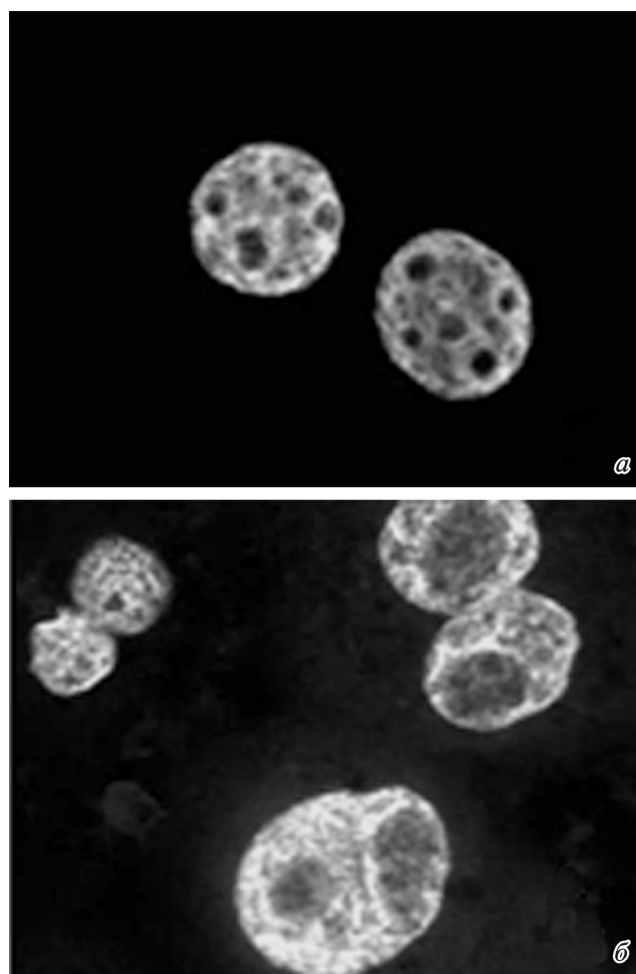


Рис. 7. Ядра гепатоцитов крыс на 5-е сут культивирования. *a* — нормальное распределение хроматина, *б* — с признаками конденсации хроматина. Окраска аурамино-SO₂. Об. 63×.

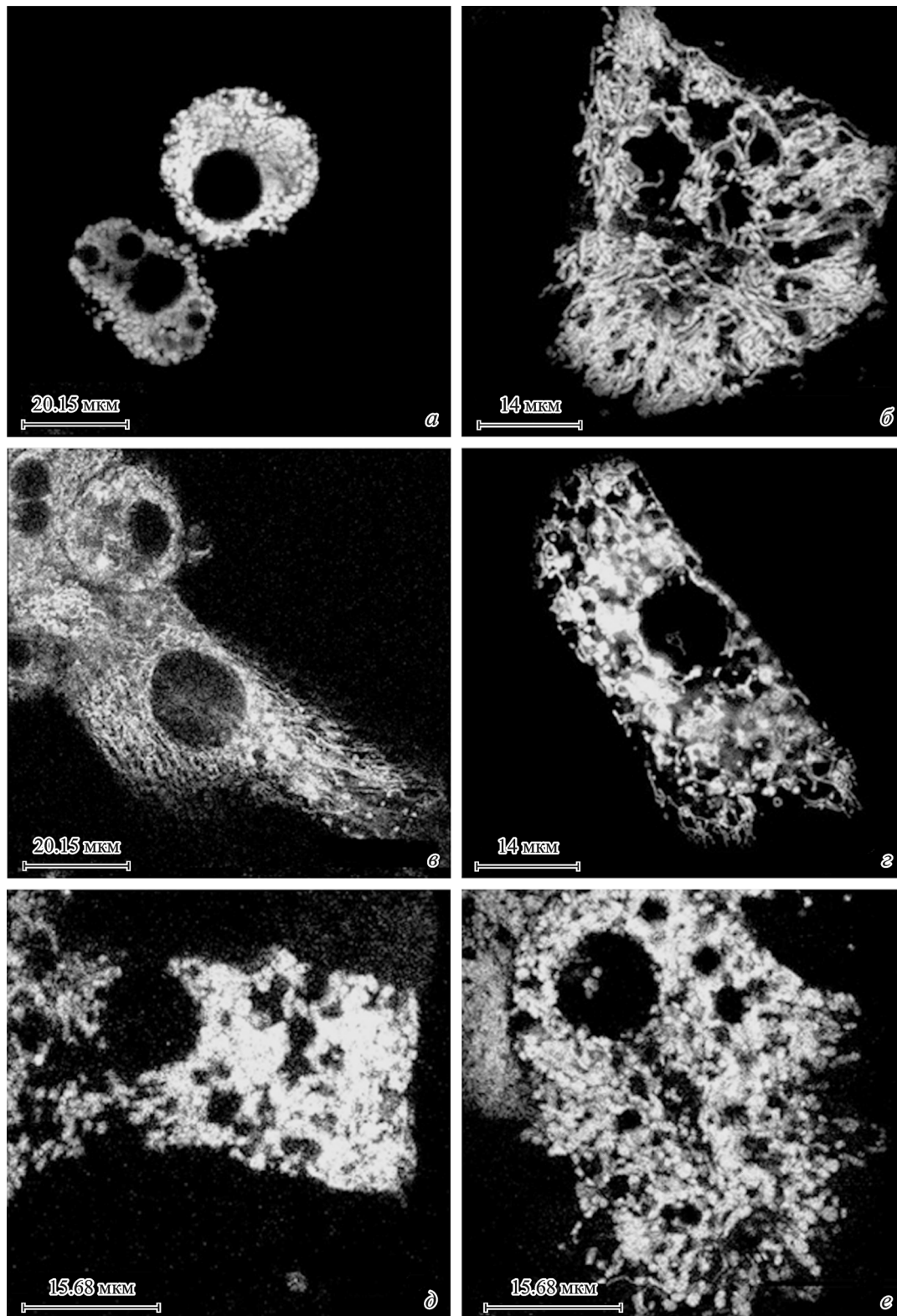


Рис. 8. Митохондрии живых гепатоцитов, окрашенных родамином 123.

a — в суспензии, *б* — оптический срез на уровне «подшвы» клетки, *в* — оптический срез на уровне клеточного ядра. *a—в* — гепатоциты intactных крыс; *д—е* — гепатоциты крыс после воздействия CCl_4 и алкоголя.

тов клетки с матриксом (рис. 8, б). Еще одно скопление активных митохондрий более округлой формы наблюдали в околядерной области клетки (рис. 8, в). Сходная картина была получена в работе Коллинза с соавторами (Collins et al., 2002) на клетках других типов, где митохондрии были распределены по цитоплазме клеток с тенденцией к агрегации вокруг ядер. Морфология митохондрий менялась от маленьких гранул до более крупных, иногда ветвящихся нитей (Collins et al., 2002). Форма митохондрий в живых гепатоцитах была очень динамичной. Любое, даже механическое, воздействие на клетки приводило к сжатию и округлению органелл (рис. 8, з). Отчетливых различий между митохондриями, выделенными из нормальной и патологически измененной печени, обнаружено не было, хотя в монослое гепатоцитов, изолированных из печени крыс с патологией, чаще встречались клетки с неупорядоченным расположением вздутых округлых митохондрий, меньшей плотностью их упаковки и более разнообразной формой этих органелл (рис. 8, д, е). Митохондрии гепатоцитов контрольных животных имели преимущественно вытянутую форму и были достаточно равномерно распределены по цитоплазме (рис. 8, б, в).

Функционирование митохондриального аппарата клетки является энергетической основой для всей ее жизнедеятельности. Характерной особенностью гепатоцитов является их способность запасать и утилизировать гликоген как основной энергетический метаболит печени. Данные о содержании гликогена в цирротически измененной печени немногочисленны и достаточно противоречивы. Сниженные концентрации гликогена в печени были найдены при биохимическом исследовании пациентов с циррозом (Owen et al., 1981). В нашей лаборатории на гепатоцитах, изолированных из биопсийного материала печени больных хроническим гепатитом и циррозом различной этиологии, было показано, что уровень гликогена в клетках может, напротив, в несколько раз превышать норму (Кудрявцева и др., 1989, 1995). Схожие данные получены на модели экспериментального цирроза, вызванного в результате 6-месячного отравления крыс четыреххлористым углеродом. Было показано почти двукратное увеличение содержания гликогена в гепатоцитах (Кудрявцева и др., 1996). Между тем в связи с поставленным нами ранее вопросом о первичности изменений на уровне клетки или на уровне органа при развитии патологии интересно, проявляются ли нарушения глюкостатической функции печени в клетках, помещенных в культуру. Известно, что в изолированных интактных гепатоцитах сохраняется углеводный метаболизм, присущий печени *in vivo*. Синтетические возможности гепатоцитов в культуре зависят, с одной стороны, от целостности плазматической мембраны, предотвращающей потерю растворимых ферментов цитоплазмы и обеспечивающей адекватный транспорт экзогенных предшественников синтеза глюкозы, а с другой — от активности энергообеспечивающих процессов (Bissell et al., 1978; Lopez et al., 1988).

Среднее содержание гликогена на клетку при экспериментальном токсическом гепатите было в 1.5 раза выше, чем в гепатоцитах интактной печени (рис. 9). Ферментативная диссоциация печени, используемая для получения суспензии гепатоцитов, вызывала значительное снижение содержания в них гликогена. Через 2 ч после выделения, перед непосредственным помещением гепатоцитов в культуру, количество гликогена в гепатоцитах контрольной и подопытной групп было в 1.4 и 1.7 раза меньше изначального. При этом исходные различия в со-

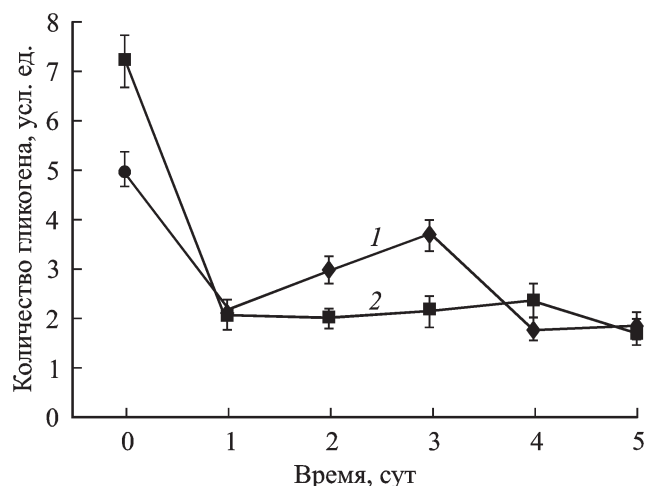


Рис. 9. Содержание гликогена в гепатоцитах, выделенных из печени интактных крыс (1) и крыс после воздействия CCl_4 и алкоголем (2), на разных этапах культивирования ($X \pm S_x$; $p < 0.05$).

держании гликогена в клетках обеих групп нивелировались. В течение 1-х сут культивирования содержание гликогена в гепатоцитах контрольной и подопытной групп продолжало снижаться и становилось в 2.3 и 3.6 раза меньше, чем в гепатоцитах исходной суспензии (рис. 9). В ходе дальнейшего культивирования содержание гликогена в гепатоцитах подопытных крыс оставалось примерно на одном уровне, тогда как в клетках контрольных крыс оно постепенно увеличивалось, к 3-м сут достигая примерно 74 % от изначального. После этого содержание гликогена в гепатоцитах контрольных крыс вновь снижалось до уровня, который наблюдался в 1-е сут культивирования (рис. 9). Таким образом, даже кратковременное культивирование позволило выявить различия в динамике углеводного метаболизма в гепатоцитах контрольных крыс и крыс с экспериментальным хроническим токсическим гепатитом. О причине таких различий говорить трудно, поскольку содержание гликогена в гепатоцитах определяется соотношением скоростей его синтеза и деградации — процессами, в которых принимают участие многие ферменты, измерение которых в данной работе не проводилось. Данные о синтезе гликогена в цирротически измененной печени, имеющиеся в настоящее время, немногочисленны и противоречивы. С одной стороны, было установлено, что синтез гликогена в печени больных циррозом не отличается от такового в печени здоровых людей (Schneider et al., 1999). С другой стороны, показано, что накопление гликогена в гепатоцитах цирротической печени после перорального введения крысам глюкозы или фруктозы идет с заметным отставанием по сравнению с нормальной печенью (Безбородкина и др., 2008).

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что при экспериментальном хроническом токсическом гепатите происходят изменения углеводного метаболизма гепатоцитов, проявляющиеся не только *in vivo*, но и при переносе клеток в культуру, т. е. не зависящие от системных изменений при патологии (уровня тех или иных гормонов, структуры органа, его кровоснабжения и мн. др.). Таким образом, клетки, выделенные из патологически измененного органа и помещенные в идентичные условия, сохраняют приобретенные в результате

развития патологии изменения. Несомненно, необходимы дальнейшие исследования того, насколько глубоки эти изменения и возможна ли их коррекция на клеточном уровне.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00971-а).

Список литературы

- Безбородкина Н. Н., Кудрявцева М. В., Оковитый С. В., Нилова В. К., Кудрявцев Б. Н. 2003. Динамика содержания гликогена в нормальной и цирротически измененной печени после введения глюкозы голодным крысам. *Цитология*. 45 (10): 1019—1031.
- Безбородкина Н. Н., Оковитый С. В., Кудрявцев Б. Н. 2008. Углеводный метаболизм при хронических поражениях печени. СПб.: Синтез Бук. 176 с.
- Бродский В. Я., Урываева И. В. 1981. Клеточная полиплоидия. Пролiferация и дифференцировка. М.: Наука. 259 с.
- Ищенко И. Ю., Мищурина С. В. 2005. Морфофункциональные изменения в тканевом микрорайоне печени и региональных лимфатических узлах у крыс Вистар с моделью хронического токсического гепатита, созданного комбинированным действием четыреххлористого углерода и этанола. *Бюл. СО РАМН*. 155 (1): 62—65.
- 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 (1): 70—83.
- Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Сакута Г. А., Штейн Г. И. 1991. Кинетика клеточной популяции паренхимы печени человека в разные периоды его жизни. *Цитология*. 33 (1): 95—107.
- Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1974. Цитофлуориметрия. Общие принципы. В кн.: *Методы биологии развития*. М.: Наука. 497—500.
- Кудрявцева М. В., Емельянов А. В., Сакута Г. А., Кудрявцев Б. Н. 1996. Гликогенообразовательная функция гепатоцитов в условиях регенерации циррозной печени крыс после частичной гепатэктомии. *Цитология*. 38 (10): 934—948.
- Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1970. Определение количества гликогена в клетках печени крыс с использованием флуоресцентного красителя аурамина 00. *Цитология*. 12 (8): 1060—1067.
- Кудрявцева М. В., Сакута Г. А., Скорина А. Д., Штейн Г. И., Емельянов А. В., Кудрявцев Б. Н. 1995. Количественная оценка содержания гликогена в гепатоцитах печени человека в норме и при хронических гепатитах различной этиологии. *Цитология*. 37 (5): 470—480.
- Кудрявцева М. В., Скорина А. Д., Сакута Г. А., Дейнека З. Г., Кудрявцев Б. Н. 1989. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена в гепатоцитах больных при различных формах алкогольного поражения печени. *Цитология*. 31 (9): 1044—1049.
- Подымова С. Д. 1993. *Болезни печени*. М.: Медицина. 480 с.
- Сакута Г. А., Кудрявцев Б. Н. 1996. Клеточные механизмы регенерации циррозной 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.
- Шерлок Ш., Дули Д. 2002. *Заболевания печени и желчных путей: практическое руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа. 859 с.
- Ширяева А. П., Байдюк Е. В., Аркадьева А. В., Оковитый С. В., Морозов В. И., Сакута Г. А. 2007. Состояние дыхательной цепи митохондрий печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом. *Цитология*. 49(2): 125—132.
- Beinert H., Albracht S. P. 1982. New insights, ideas and unanswered questions concerning iron — sulfur clusters in mitochondria. *Biochim. biophys. acta*. 683 : 245—277.
- Bissell D. M., Levine G. A., Bissell M. J. 1978. Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture and by cell lines from rat liver. *Amer. J. Physiol.* 234 : 122—130.
- Chan A., Reiter R., Wiese S., Fertig G., Gold R. 1998. Plasma membrane phospholipid asymmetry precedes DNA fragmentation in different apoptotic cell models. *Histochem. Cell. Biol.* 110 : 553—558.
- Collins T. J., Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. 2002. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* 21 : 1616—1627.
- Collins T. J., Bootman M. D. 2003. Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. *J. Exp. Biol.* 206 : 1993—2000.
- Devi B. G., Henderson G. I., Frosto T.A., Schenker S. 1993. Effect of ethanol on rat fetal hepatocytes: studies on cell replication, lipid peroxidation and glutathione. *Hepatology*. 18 : 648—659.
- Gomez-Lechon M. J., Barbera E., Gil R., Baquena J. 1981. Evaluative changes of ploidy and polynucleation in adult rat hepatocytes in culture. *Cell. Mol. Biol.* 27 : 695—701.
- Gorla G. R., Malhi H., Gupta S. 2001. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J. Cell Sci.* 114 : 2943—2951.
- Guidotti J.-E., Brégerie O., Aude R., Pascale D., Brechot C., Chantal D. 2003. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 278 : 19 095—19 101.
- Hanshaw R. G., Smith B. D. 2005. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorg. Med. Chem.* 13 : 5035—5042.
- Jonson L. V., Walsh M. L., Bo C. L. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cell Biol.* 77 : 990—994.
- Krähenbühl L., Ledermann M., Lang C., Krahenbuhl S. 2000. Relationship between hepatic mitochondrial function *in vivo* and *in vitro* in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Hepatology*. 33 : 216—223.
- Krähenbühl S., Krahenbuhl-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 : 90—96.
- Le Couteur D. G., Hickey H., Harvey P. J., Gready J., McLean A. J. 1999. Hepatic artery flow and propranolol metabolism in perfused cirrhotic rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 : 1553—1558.
- Lluis J. M., Morales A., Blasco J., Colell A., Mari M., Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa J. C. 2005. Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 280 : 3224—3232.
- Lopez M. P., Gomez-Lechon M. J., Castell J. V. 1988. Active glycolysis and glycogenolysis in early stages of primary cultured hepatocytes. Role of AMP and fructose 2.6-bisphosphate. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 24 : 511—517.
- Owen O. E., Reichle F. A., Mazzoli M. A., Kreulen I. 1981. Hepatic gut and renal substrate flux rates in patients with hepatic cirrhosis. *J. Clin. Invest.* 68 : 240—252.
- Reichen J., Arts B., Schafroth U., Zimmermann A., Heltner Th. B., Zysset T. 1987. Aminopyrine N-demethylation by rats with liver cirrhosis. Evidence for the intact cell hypothesis. A morphometric-functional study. *Gastroenterology*. 93 : 719—726.
- Sato R., Maesawa C., Fujisawa K., Wada K., Oikawa K., Takikawa Y., Suzuki K., Oikawa H., Ishikawa K., Masuda T. 2004. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human nor-

mal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis. *Gut*. 53 : 1001—1009.

Schmucker D. L. 1990. Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. *J. Electron Microsc.* 14 : 106—125.

Schneiter P., Gillet M., Chiolero R., Jequier E., Tappy L. 1999. Hepatic nonoxidative disposal of an oral glucose meal in patients with liver cirrhosis. *Metabolism*. 48 : 1260—1266.

Seglen P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell Biol.* 13 : 29—83.

Shiryayeva A., Baidyuk E., Arkadieva A., Okovityy S., Morozov V., Sakuta G. 2008. Hepatocyte mitochondrion electron-transport chain alterations in CCl₄ and alcohol induced hepatitis in rats and their correction with simvastatin. *J. Bioenerg. Biomembranes*. 40 : 27—34.

Sigal S. H., Rajvanshi P., Gorla G. R., Sokhi R. P., Saxena R., Gebhard D. R., jr., Reid L. M., Gupta S. 1999. Partial hepatecto-

my-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Amer. J. Physiol.* 276 : 1260—1272.

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.

Wiemann S. U., Satyanarayana A., Tshahuridu M., Tilmann H. L., Zender L., Klempnauer J., Flemming P., Franco S., Blasco M. A., Manns M. P., Rudolph K. L. 2002. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* 16 : 935—942.

Поступила 21 IV 2009

ANALYSIS OF FUNCTIONING AND MORPHOLOGY OF PRIMARY HEPATOCYTES OF RATS WITH EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS

*E. V. Baidyuk, A. P. Shiryayeva, N. N. Bezborodkina, G. A. Sakuta*¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; Russia

¹ e-mail: sakuta@yandex.ru

The goal of the study was to examine the state of primary hepatocytes of rats with toxic hepatitis induced by combination of CCl₄ and ethanol. Fluorescent immunocytochemical analysis demonstrated that normal and pathologic hepatocytes in culture formed actin cytoskeleton, cell-cell and cell-matrix contacts. To investigate morphology and localization of mitochondria the hepatocytes were stained with Rhodamine 123. Glycogen and DNA contents in hepatocytes were determined by fluorescent cytophotometry during the lifetime of the culture. Cells were maintained for 5 days, and there were no changes in ploidy distribution observed. The mean ploidy was not changed too. Thus hepatocytes of different ploidy demonstrated similar survival rate. The glycogen content was 50 % higher in experimental group compared to the control. The glycogen content decreased in control and cyrotic hepatocytes after collagenase isolation. It has been found that the control hepatocytes accumulated glycogen within 3 days. On the contrary, the glycogen levels remained to be low in the pathologic hepatocytes.

К e y w o r d s: primary culture of hepatocytes, mitochondria, polyploidy, glycogen.