

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ ГЕПАТОЦИТОВ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ ПЛОДОВ КРЫС

© А. В. Ельчанинов, Г. Б. Большакова

Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва;
электронный адрес: elchandrey@yandex.ru

Исследовали пролиферацию и гибель гепатоцитов регенерирующей печени 17-суточных плодов белых беспородных крыс. В течение 2 сут после резекции 20 % печени животных выводили из эксперимента через каждые 3 ч. Индекс Ki67-положительных гепатоцитов резко возрастал через 15 ч после операции, митотический индекс — через 12 и 24 ч. Отношение индекса наиболее продолжительной фазы митоза — метафазы — к митотическому индексу во всех исследованных опытных и контрольных группах не изменялось, что свидетельствует об одинаковой продолжительности митозов в регенерирующей печени. Гепатоциты, меченные с помощью антител к каспазе 3, практически отсутствовали как в опытной, так и в контрольных группах. Таким образом, резекция 20 % печени плодов крысы не способствовала усилению апоптоза гепатоцитов.

Ключевые слова: регенерация, печень, эмбриогенез, гепатоциты, пролиферация, апоптоз.

Принятые сокращения: ИнKi67 — индекс Ki67, МИ — митотический индекс.

Восстановление массы печени после резекции у взрослых млекопитающих происходит за счет митотического размножения гепатоцитов и их гипертрофии (Сидорова и др., 1966). В регенерирующей печени наряду с активацией пролиферации отмечается также усиление апоптоза гепатоцитов (Chen et al., 2010). Одной из причин гибели клеток может быть повреждение ДНК или веретена деления свободными радикалами кислорода, увеличение концентрации которых обнаруживается в печени после ее резекции (Sigal et al., 1999; Bras et al., 2005; Azad et al., 2010).

Повреждение ДНК или нарушение ее репликации приводит к остановке клеточного цикла в фазе G₂ или временному вступлению в профазу с обратимой конденсацией хроматина, а отсутствие биполярного прикрепления хромосом — к предотвращению наступления анафазы (Castedo et al., 2004; Brito et al., 2008).

Однако при нарушениях репарации клетка с поврежденной ДНК или с дефектами веретена деления может вступать в митоз, во время которого происходят активация каспаз и гибель клетки. Это так называемая митотическая катастрофа, которая в настоящее время рассматривается как вариант апоптоза (Castedo et al., 2004; Vakifahmetoglu et al., 2008).

Ранее мы установили, что печень 17-суточного плода крысы после удаления 20 % ткани органа восстанавливает массу через 2 сут после операции за счет митотического деления гепатоцитов (Ельчанинов, Большакова, 2010). Представляло интерес выяснить характер пролиферации в регенерирующей печени плодов и особенности прохождения гепатоцитами клеточного цикла, в частности замедление вступления в митоз и удлинение времени прохождения его фаз, что и стало задачей работы.

Материал и методика

Под эфирным наркозом выполняли резекцию 20 % печени 17-суточным плодам белых крыс в соответствии с ранее описанной методикой (Ельчанинов, Большакова, 2010). Рассекали стенку матки, амнион, кожу плода в правом подреберье и удаляли часть правой боковой доли печени. Далее послойно ушивали кожу плода и стенку матки. Оперированные и контрольные плоды выводили из опыта через каждые 3 ч в течение 2 сут после резекции печени. В качестве контроля были использованы неоперированные однопометные крысята. Опытные и контрольные группы состояли из 7—10 животных. Всего было исследовано 200 плодов.

Работу с лабораторными животными осуществляли в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторных исследований и этическими нормами. Эксперименты были разрешены комиссией по биоэтике НИИ морфологии человека РАМН.

Печень взвешивали, фиксировали в жидкости Карнуа, обезвоживали в этиловом спирте, проводили через хлороформ и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Для исследования митотической активности гепатоцитов определяли их митотический индекс (МИ), выраженный в промилле (‰). Митозы подсчитывали на 5500—6000 клеток для каждого животного.

Известно, что постоянство соотношений митотических фаз в популяции клеток одного типа свидетельствует об относительном постоянстве продолжительности митоза (Алов, 1972; Доброхотов, Валвас, 1981; Большакова, 2008). Поэтому при подсчете митозов гепатоцитов учиты-

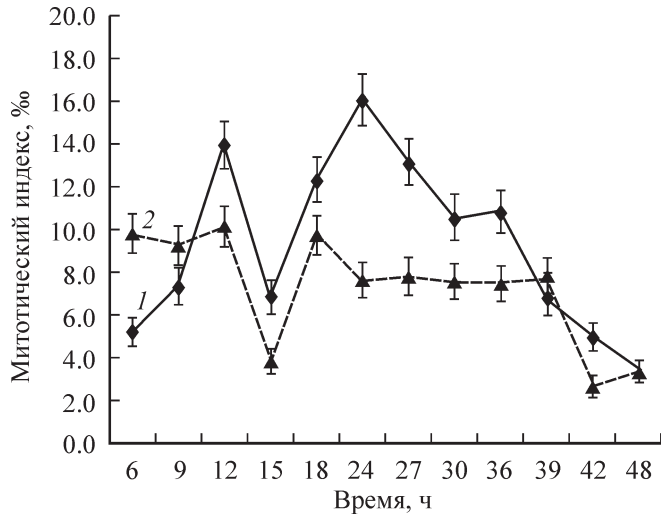


Рис. 1. Изменения митотического индекса гепатоцитов в печени плодов крыс контрольной и опытной групп в интервале 17—19 сут пренатального (эмбрионального) развития.

1 — митотический индекс гепатоцитов плодов после 20 % резекции печени; 2 — митотический индекс гепатоцитов плодов контрольной группы. Приведены средние и доверительные интервалы.

вали их фазу, определяли доли каждой фазы от всех митозов (в %) и от всех гепатоцитов (в ‰).

Для изучения пролиферации гепатоцитов использовали поликлональные антитела к ядерному белку Ki67 (prediluted, Abcam, Великобритания). Клетки, гибнущие путем апоптоза, выявляли с помощью моноклональных антител к каспазе 3 (разведение 1 : 100; Abcam, Великобритания). Иммуногистохимическая реакция была поставлена с использованием биотин-стрептавидин-пероксидазного метода. Срезы докрашивали гематоксилином Караччи.

На препаратах в обоих случаях подсчитывали меченые клетки, затем вычисляли соответствующий индекс

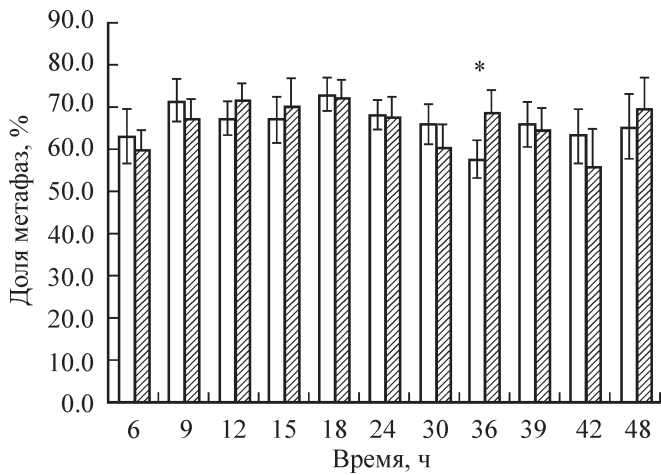


Рис. 2. Изменение доли метафаз гепатоцитов плодов крыс контрольной и опытной групп 17—19 сут эмбриогенеза.

Заштрихованные столбики — печень контрольных плодов; белые столбики — печень плодов после 20 % резекции печени, проведенной на 17-е сут развития. Звездочкой обозначено статистически значимое различие по сравнению с контролем ($P < 0.05$). Приведены средние и доверительные интервалы.

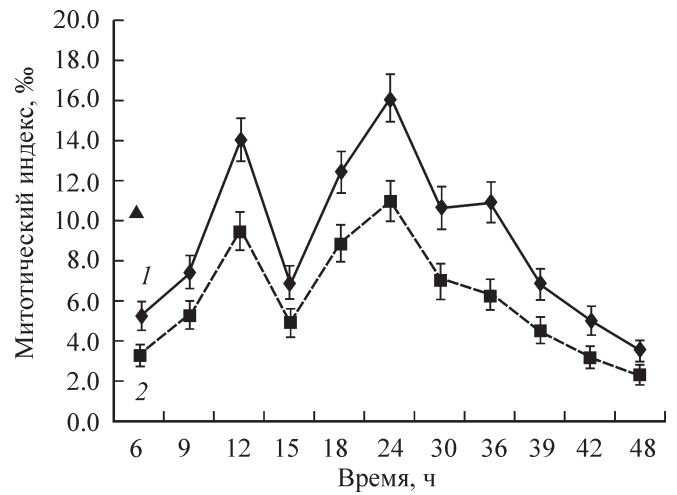


Рис. 3. Изменение митотического индекса и индекса метафаз гепатоцитов плодов крыс опытной группы 17—19 сут эмбриогенеза.

1 — митотический индекс гепатоцитов плодов крыс после 20 % резекции печени на 17-е сут развития; 2 — индекс метафаз гепатоцитов плодов крыс после 20 % резекции печени на 17-е сут развития. Приведены средние и доверительные интервалы.

как отношение меченых гепатоцитов к общему числу гепатоцитов в %.

Средние значения и стандартные ошибки среднего определяли по формулам для долей. Границы 95%-ных доверительных интервалов для долей рассчитывали с помощью ф-критерия. Сравнение двух выборочных долей проводили с помощью ф-критерия. Соотношение фаз митозов проводили с помощью критерия χ^2 (Юнкеров, Григорьев, 2002). Для выявления корреляции использовали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при 5%-ном уровне значимости. Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., США).

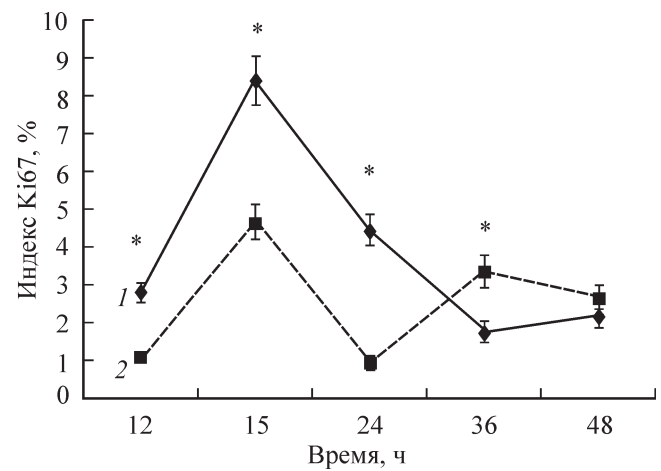


Рис. 4. Изменение индекса Ki67 гепатоцитов плодов крыс контрольной и опытной групп 17—19 сут эмбриогенеза.

1 — индекс Ki67 гепатоцитов плодов после 20 % резекции печени на 17-е сут развития; 2 — индекс Ki67 гепатоцитов плодов одновозрастной контрольной группы. Звездочками обозначены статистически значимые различия по сравнению с контролем ($P < 0.05$). Приведены средние и доверительные интервалы.

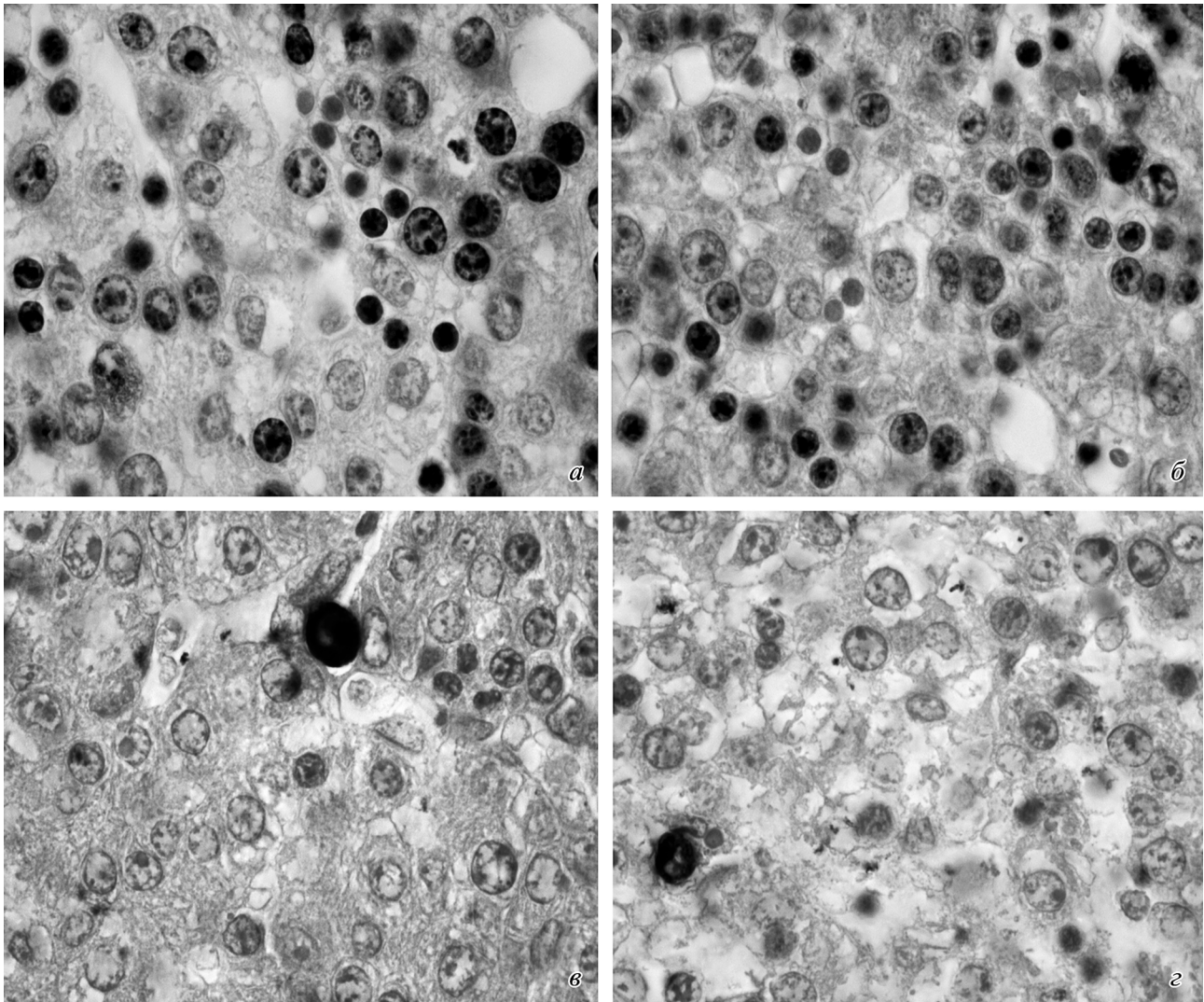


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание ядерного белка Ki67 через 24 ч после операции (а, б) и каспазы 3 через 36 ч после операции (в, з) в гепатоцитах плодов крысы после 20 % резекции печени на 17-е сут развития.

а, в — срез печени оперированного плода; б, з — срез печени интактного плода. Об. 400×.

Результаты

В оперированной печени плодов крысы митотический индекс гепатоцитов через 6 ч после резекции был ниже, чем в контроле ($P < 0.001$). Далее митотическая активность гепатоцитов нарастала (рис. 1), через 12 ч и до 36 ч после операции включительно у подопытных животных МИ гепатоцитов был всегда выше, чем в контроле ($P < 0.05$). Спустя 15 ч после частичной гепатэктомии МИ гепатоцитов оперированной печени снижался относительно 12 ч ($P < 0.001$), однако через 18 ч и до 24 ч после операции происходило возрастание МИ по сравнению с 15 ч ($P < 0.001$). Таким образом, наибольшая митотическая активность гепатоцитов регенерирующей печени плода наблюдалась через 12 ($14.0 \pm 0.6 \%$) и через 24 ч ($16.1 \pm 0.6 \%$) после операции. На последующих сроках до 48 ч после операции мы наблюдали постепенное снижение митотической активности гепатоцитов.

Через 6 ч после частичной гепатэктомии доля профаз в печени оперированных животных была меньше, а доля анафаз больше, чем в контроле ($P < 0.05$). Через 12 ч после вмешательства, напротив, профаз и анафаз было боль-

ше, а телофаз меньше, чем в печени интактных животных ($P < 0.05$). Через 24 ч соотношение фаз митоза изменялось таким образом, что доля телофаз в регенерирующей печени была меньше, чем в контроле ($P < 0.05$). Через 36 ч у подопытных животных количество телофаз гепатоцитов было больше, чем в контроле, а метафаз меньше, чем у интактных животных ($P < 0.05$). Спустя 39 ч после частичной гепатэктомии плода в опыте количество профаз было меньше, чем в контроле ($P < 0.05$).

Чаще всего среди делящихся гепатоцитов в оперированной и интактной печени встречались метафазы (рис. 2, 3), что обусловлено наибольшей их длительностью по сравнению с другими фазами митоза у данного типа клеток (Заварзин, 1967). Доля метафаз на разных сроках после операции неизменно составляла около 70 % (рис. 2), что обусловило сильную положительную корреляцию между митотическим индексом гепатоцитов и индексом метафаз в опытных и контрольных группах ($r = 0.96$, $P < 0.05$ и $r = 0.90$, $P < 0.05$ соответственно).

Индекс Ki67 (ИнKi67) гепатоцитов регенерирующей печени плода через 12, 15 и 24 ч был выше ($P < 0.001$), а через 36 ч — ниже, чем в контроле ($P < 0.001$), через 48 ч

после резекции печени плода крысы различий не было (рис. 4; 5, а, б). Через 15 ч после операции ИнКі67 гепатоцитов регенерирующей печени плодов крысы был максимальным ($8.4 \pm 0.3\%$).

Как в оперированной, так и в интактной печени были выявлены лишь единичные клетки, меченные с помощью антител к каспазе 3 (рис. 5, в, г). Эти клетки принадлежали в основном к гемопоэтическому ряду.

Обсуждение

Сведения о митотической активности гепатоцитов в печени плодов крыс разноречивы: по данным различных авторов, МИ в возрасте 15—21 пренатальных сут колеблется от 0.3 до 22.0 % (Грачева, 1966; Романова, Жихарева, 1972). Колебания митотической активности у контрольных животных (от 3.9 до 10.2 %) отмечены и нами.

После резекции печени 17-суточных плодов крысы происходила активация пролиферации гепатоцитов. Ядерный белок Кі67 определяется в клетке, которая находится в поздней фазе G₁ и в фазах S, G₂ и митозе, т. е. клетки, в которых началась экспрессия Кі67, в дальнейшем с большой вероятностью вступают в митоз (Lindboe, Torp, 2002). Это согласуется с нашими данными, согласно которым наибольший подъем ИнКі67 в регенерирующей печени плодов крысы наблюдается через 15 ч после операции и предшествует пику МИ гепатоцитов через 24 ч после резекции печени плодов крысы. Поскольку гистохимическую реакцию на Кі67 ставили на сроках 12, 15, 24, 36 и 48 ч, проследить вступление в клеточный цикл гепатоцитов, массово делящихся митозом через 12 сут после операции, не представилось возможным.

Наличие пиков пролиферации после резекции печени плодов свидетельствует о синхронизации размножения гепатоцитов и высокой активности пролиферации (Lambotte et al., 1997).

Процентная доля митотических фаз отражает соотношение длительности фаз митоза рассматриваемой клеточной популяции (Алов, 1972). Почти на всех сроках нашего исследования индекс профаз у оперированных плодов был больше, чем в контроле. Это указывает на активизацию пролиферации гепатоцитов плода после гепатэктомии, но не позволяет определить относительную продолжительность митоза, основываясь на контрольных данных по ранее предложенной методике (Доброхотов, Валвас, 1981), поскольку основным условием для этого является равенство количества профаз в опыте и контроле. Увеличение доли профаз через 12 ч после повреждения печени плода соответствует повышению МИ гепатоцитов относительно контроля и, таким образом, может рассматриваться как показатель активации пролиферации гепатоцитов регенерирующей печени плодов крысы (Доброхотов, Валвас, 1981; Большакова, 2008).

Большинство митозов (примерно 70 %) находилось в стадии метафазы, что свидетельствует о ее наибольшей длительности по сравнению с другими фазами митоза. Поскольку достоверных различий между долями метафаз в опыте и контроле на большинстве сроков не было обнаружено, можно предположить, что и длительность всего митоза в опыте и контроле не сильно различалась.

Уменьшение доли метафаз и увеличение количества телофаз через 36 ч после вмешательства, а также уменьшение доли профаз через 39 ч по сравнению с контролем совпадают со снижением митотической активности и

ИнКі67 гепатоцитов на этих сроках. Эти изменения соотношений фаз отражают, на наш взгляд, завершение периода активной пролиферации гепатоцитов в регенерирующей печени плодов крысы.

Одним из основных факторов, вызывающих апоптоз в гепатоцитах регенерирующей печени взрослых особей, является окислительный стресс, признаки которого обнаруживаются в данном органе после резекции (Sigal et al., 1999; Bras et al., 2005; Azad et al., 2010). Однако метаболические пути, приводящие к повышенному образованию активных форм кислорода, в печени плодов млекопитающих неактивны (Guo et al., 2009), что, видимо, и объясняет низкий уровень клеточной гибели и отсутствие нарушения митоза и митотического цикла гепатоцитов. Экспрессия каспазы 3 в гемопоэтических клетках как в оперированной, так и в интактной печени, видимо, отражает процесс угасания кроветворной функции в печени плодов крысы на этом сроке развития (Guo et al., 2009).

Таким образом, резекция примерно 20 % печени плодов крысы активизирует пролиферацию гепатоцитов, о чем свидетельствуют пики показателей клеточного деления. Регенерация фетальной печени происходит за счет размножения гепатоцитов. Апоптоза гепатоцитов в процессе восстановления печени плодов крыс не было выявлено.

Список литературы

- Алов И. А. 1972. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина. 264 с.
- Большакова Г. Б. 2008. Проллиферация кардиомиоцитов у плодов крыс в норме и после повреждения сердца. Бюл. эксперим. биол. мед. 145 (4) : 471—474.
- Грачева Н. Д. 1966. Автордиографическое изучение пролиферативных процессов в гистогенезе печени крыс. Арх. анат. 50 (5) : 38—47.
- Доброхотов В. Н., Валвас В. С. 1981. Динамика фаз митоза и относительная продолжительность клеточного деления. Бюл. эксперим. биол. мед. 92 (8) : 76—78.
- Ельчанинов А. В., Большакова Г. Б. 2010. Репаративная регенерация печени плодов крыс после частичной гепатэктомии. Бюл. эксперим. биол. мед. 150 (9) : 352—355.
- Заварзин А. А. 1967. Синтез ДНК и кинетика клеточных популяций в онтогенезе млекопитающих. Л.: Наука. 219 с.
- Романова Л. К., Жихарева И. А. 1972. К вопросу о гуморальной регуляции восстановительного роста в легких, почках и печени. Бюл. эксперим. биол. мед. 73 (1) : 84—87.
- Сидорова В. Ф., Рябина З. А., Лейкина Е. М. 1966. Регенерация печени у млекопитающих. М.: Медицина. 205 с.
- Юнкеров В. И., Григорьев С. Г. 2002. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА. 267 с.
- Azad N., Iyer A., Vallyathan V., Wang L., Castranova V., Stehlik C., Rojanasakul Y. 2010. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1203 : 1—6.
- Bras M., Queenan B., Susi S. A. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. Biochemistry (Mosc.). 70 (2) : 231—239.
- Brito D. A., Yang Z., Rieder C. L. 2008. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. J. Cell Biol. 182 : 623—629.
- Castedo M., Perfettini J. Z., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemer G. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene. 23 : 2825—2837.
- Chen S., Zheng J., Hao Q., Yang S., Wang J., Chen H., Chen L., Zhou Y., Yu C., Jiao B., Cai Z. 2010. p53-insensitive PUMA down-regulation is essential in the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. J. Hepatol. 52 : 864—871.

Guo Y., Zhang X., Huang J., Zeng Y., Liu W., Geng C., Li K. W., Yang D., Wu S., Wei H., Han Z., Qian X., Jiang Y., He F. 2009. Relationships between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles. PLoS ONE. 4 : e7641. doi:10.1371/journal.pone.0007641.

Lambotte L., Saliez A., Triest S., Tagliaferri E. M., Barker A. P., Baranski A. G. 1997. Control of rate and extent of the proliferative response after partial hepatectomy. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 273 : 905—912.

Lindboe C. F., Torp S. H. 2002. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. J. Clin. Pathol. 55 : 467—471.

Sigal S. H., Rajvanshi P., Gorla G. R., Sokhi R. P., Saxena R., Gebhard D. R., Jr., Reid L. M., Gupta S. 1999. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 276 : 1260—1272.

Vakifahmetoglu H., Zhitovitsky O. M. B. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death and Differentiation. 15 : 1153—1162.

Поступила 20 VI 2011

PROLIFERATION AND CELL DEATH OF HEPATOCYTES IN REGENERATING RAT FETAL LIVER

A. V. Elchaninov, G. B. Bolshakova

Research Institute of Human Morphology RAMS, Moscow;
e-mail: elchandrey@yandex.ru

Proliferation and death of hepatocytes in regenerating liver of 17-day white rat fetuses were investigated. During 2 days after liver resection (20 %), animals were sacrificed every 3 h. In experimental groups, the index of Ki67-positive hepatocytes increased sharply in 15 h after liver resection. In all experimental and control groups, the ratio of the metaphase, the longest phase of mitosis, and index to mitotic index remained unchanged, indicating identical duration of hepatocytes mitoses in regenerating liver. In the regenerating and intact liver hepatocytes labeled with antibodies to caspase 3 were not detected. Thus, resection of 20 % rat fetal liver did not contribute to increased apoptosis of hepatocytes.

Key words: regeneration, liver, embryogenesis, hepatocytes, proliferation, apoptosis.