

Краткие сообщения

УДК 616.36-003(045)

К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова, М.В. Сметанина

УМЕРЕННАЯ ФОРМА ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИЕЙ ГЕПАТОЦИТОВ

Цель работы – выяснить влияние гипергомоцистеинемии на регенеративные возможности клеток печени. У белых крыс *Rattus norvegicus Berk* (n=25, контрольная группа – 10 животных, группа сравнения с умеренной гипергомоцистеинемией – 15 животных) исследовали гистологическое строение печени. На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали: количество ядер, долю двуядерных клеток, площадь и диаметр ядра; рассчитывали ядерно-цитоплазматический индекс. Иммуногистохимически с помощью набора антител для выявления экспрессии маркера Ki-67 (кроличьи IgG, 1:200; CellMarque Corporation, USA) определяли количество и интенсивность экспрессии Ki-67-позитивных клеток в поле зрения микроскопа. В печени животных с умеренной гипергомоцистеинемией выявлено наличие двух одновременно идущих процессов: реактивно-дистрофического (наличие перипортальных лейкоцитарно-лимфоцитарных инфильтратов, появление клеток в состоянии дистрофии и некроза) и регенераторного характера (увеличение площади ядра с $52,51 \pm 4,5$ до $56,68 \pm 5,58$ мкм², ядерно-цитоплазматическое отношение, увеличение количества и интенсивности экспрессии Ki-67+ клеток). Характерным для гомотеинин-индуцированной патологии является факт наличия гепатоцитов с очень крупными ядрами (полиплоидными), которые составляют 12,5 % от всей популяции. Гипергомоцистеинемия наряду с уменьшением количества и дистрофией отдельных гепатоцитов приводит к увеличению диаметра и площади клеточного ядра, усилению интенсивности пролиферации, появлению полиплоидных ядер, что способствует повышению регенерационного потенциала печени и обеспечивает решающую роль в гомеостазе железы. Полученные данные требуют дальнейших исследований для определения «критической точки» перехода, что позволит модулировать функции ткани печени.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, гепатоциты, индекс пролиферации, полиплоидия.

DOI: 10.35634/2412-9518-2022-32-2-229-234

Гипергомоцистеинемия – состояние, при котором в крови повышен уровень аминокислоты гомотеина. Она представляет собой сульфгидрилсодержащую аминокислоту, которая не усваивается с пищей, а синтезируется в качестве промежуточного метаболита в печени. Содержание гомотеина в плазме в норме не должно превышать 15 мкмоль/л, умеренным уровнем считается его количество от 15 до 30 мкмоль/л. Гипергомоцистеинемия увеличивает выработку провоспалительных цитокинов, а именно: TNF- α , IL-1b, IL-6 и IL-8, что приводит к каскаду изменений, который негативно влияет на метаболизм метионина и цикл гомотеина в печени [1]. В здоровой печени гепатоциты в основном находятся в состоянии покоя [2]. Установлено, что в печени грызунов в течение 9,5–9,7 месяцев 84,1 % гепатоцитов не размножаются [3]. Известно также, что печень обладает высокой способностью к репаративной регенерации, и пролиферативная активность гепатоцитов возрастает при резекции и повреждении железы, но менее известны механизмы и биомаркеры лекарственного повреждения печени [4; 5]. Многочисленные работы показали, что во взрослой печени существует связь между модуляциями полиплоидии и различными клеточными стрессами, такими как метаболическая перегрузка, повреждение ДНК, химическое либо лекарственное повреждение печени [6-8]. Гипергомоцистеинемия – фактор неалкогольной жировой дистрофии печени [9]. В ряде работ имеются указания на взаимосвязь неалкогольного повреждения печени и формирования полиплоидных клеток [10; 11].

Цель работы – выяснить влияние гипергомоцистеинемии на регенеративные возможности клеток печени.

Материалы и методы исследований

Работа проведена на белых крысах *Rattus norvegicus Berk* обоего пола № 25 с массой тела 200-220 г в осенний период (октябрь-ноябрь), во второй половине дня. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздра-

ва РФ (апликационный № 656 от 23.04.2019.). Животные были разделены на 2 экспериментальные группы:

– № 1 – интактный контроль (n=10) – содержалась в условиях вивария на стандартном рационе питания (экструдированный корм со свободным доступом к воде);

– № 2 – группа сравнения (n=15) – животные с экспериментальной умеренной формой гипергомоцистеинемии (умГГЦ) [12].

Животные содержались с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984 г.) и Межгосударственного стандарта «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными (2016). После эвтаназии животных эфирным наркозом печень извлекали, фиксировали в 10 % формалине, заливали в парафиновую среду Histomix, готовили серийные срезы органа. Часть гистологических препаратов окрашивалась гематоксилином и эозином для оценки гисто- и цитоструктуры ткани, другая часть – окрашивалась иммуногистохимически с помощью набора антител для выявления экспрессии маркера Ki-67 (кроличьи IgG, 1:200; CellMarque Corporation, USA). Для двойного иммунофлуоресцентного окрашивания использовали смесь вторых антител, ассоциированных с AlexaFluor 488 (антикроличьи IgG 1:300; Abcam, USA) и AlexaFluor 647 (антимышьиные IgG 1:300; Abcam, USA). На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали: количество ядер (на 100 мкм²), долю двуядерных клеток (%), площадь (мкм²) и диаметр (мкм) ядра; рассчитывали ядерно-цитоплазматический индекс. Количество Ki-67-позитивных клеток оценивалось микроскопированием при увеличении 400 крат в 10 случайных полях зрения на каждом 5 срезе препарата; измерение интенсивности свечения иммунореактивного продукта (в усл. ед) проводили на фронтальных срезах при помощи морфометрических программ ImageProInsite 8.0, ImageProPlus 6.0 (MediaCybernetics). Срезы изучали с помощью люминесцентного микроскопа Nikon ECLIPSE E200.

В работе использовался статистический метод с определением средней арифметической (M), ее ошибки (m). Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Shapiro-Wilk's. Данные при сравнении показателей групп анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программного обеспечения SPSS. Различия между группами считались статистически значимыми при p<0,05.

Результаты и их обсуждение

Уровень гомоцистеина в крови опытных крыс с умГГЦ составил 28,9±2,65 мкмоль/л против 8,5±0,6 мкмоль/л в крови контрольных животных. Патогистологическое исследование печени животных с умГГЦ выявило наличие двух одновременно идущих процессов в ткани: реактивно-дистрофического и регенераторного характера. Реактивно-дистрофические процессы включали наличие перипортальных лейкоцитарно-лимфоцитарных инфильтратов, появление клеток в состоянии дистрофии и некроза. Достоверно (в 1,75 раза, p<0,05) снижалась плотность расположения клеток-гепатоцитов в единице площади (с 448,1±23,3 у контрольных животных до 256,2±15,5 мкм² – у крыс с гипергомоцистеинемией), в 1,55 раза – площадь цитоплазмы гепатоцита (с 326,03±19,69 до 210,19±27,2 мкм²). При этом средняя площадь отдельного ядра увеличивается с 52,51±4,5 до 56,68±5,58 мкм², в 1,65 раз повышается ядерно-цитоплазматическое отношение (с 0,17±0,04 до 0,28±0,06, p<0,05).

Для оценки регенеративных возможностей клеток печени нами проведен иммуногистохимический анализ экспрессии белка Ki-67 у животных с гипергомоцистеинемией. В контрольной группе животных белок Ki-67 имеется в небольшой части клеток (11,5±1,11 шт/мкм²), интенсивность свечения гистохимического продукта незначительна (39,85±1,86 уе в поле зрения), тогда как гипергомоцистеинемия приводит как к увеличению клеток, экспрессирующих маркер пролиферации в 2,63 раза (30,3±4,09 шт/мкм²), так и к увеличению интенсивности экспрессии в 1,68 раза (67,01±1,62 у. е. в поле зрения) (рис. 1, 2).

Индекс пролиферации при гипергомоцистеинемии возрастает в 4 раза: с 0,03±0,01 в популяции контрольных гепатоцитов до 0,12±0,07 у. е. – при умГГЦ (p<0,05). Известно, что после токсического повреждения печени, вызванного АРАР (парацетамол), клетки, окружающие зону некроза, подвергаются пролиферации, но сопровождаются десинхронизацией клеточного цикла во время регенерации [5]. Кроме того, недавние работы раскрывают роль Ki-67 в регуляции клеточного цикла в целом, поддержании гетерохроматина и сборке перихромосомного слоя на митотических хромосомах [13; 14].

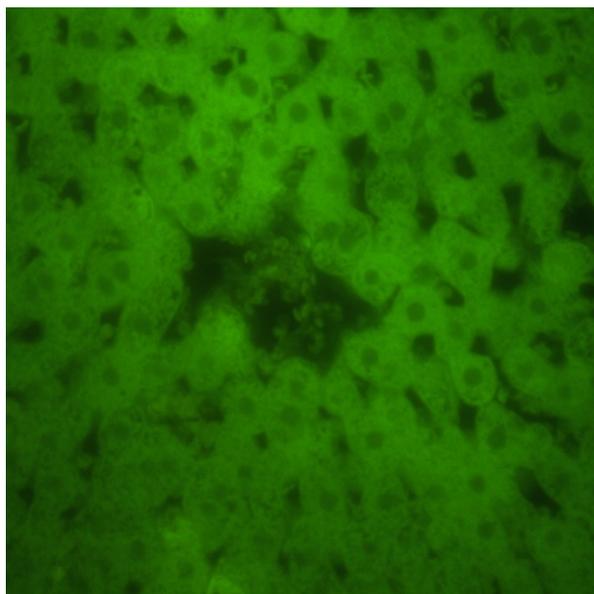


Рис. 1. Контрольная популяция гепатоцитов крыс с низкой интенсивностью экспрессии маркера. Иммуногистохимическая окраска антителами Ki-67, вторые антитела, ассоциированные с AlexaFluor 488 (увеличение: Об.40, Ок.20)

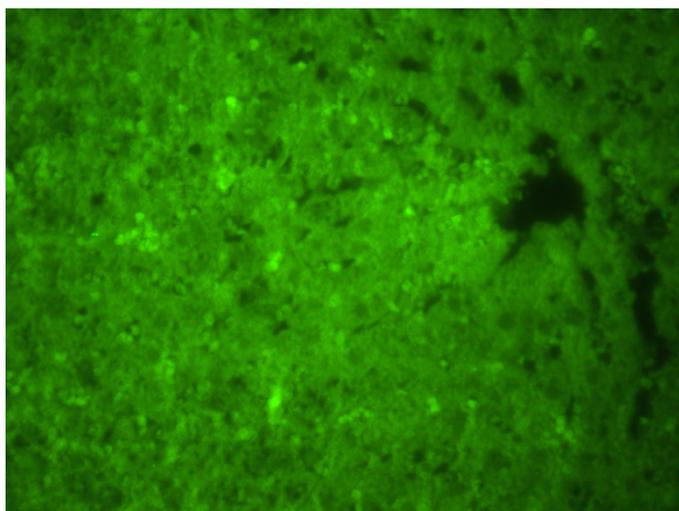


Рис. 2. Популяция гепатоцитов, содержащая белок Ki-67, при умеренной гипергомоцистеинемии. Иммуногистохимическая окраска антителами Ki-67, вторые антитела, ассоциированные с AlexaFluor 488 (увеличение: Об.40, Ок.10)

Характерным для гомоцистеин-индуцированной патологии печени является факт наличия гепатоцитов с очень крупными ядрами (рис. 3) и высоким ядерно-цитоплазматическим отношением ($0,296 \pm 0,17$ vs $0,197 \pm 0,12$ – контроль), которые составляют 12,5 % от всей популяции. В контроле подобных клеток отмечено не было.

Предположительно, такие гепатоциты являются полиплоидными. Полиплоидные гепатоциты обеспечивают регенерационные и адаптационные возможности печени, защиту железы от окислительного стресса и генотоксического повреждения [6; 15]. Факт появления крупноядерных (полиплоидных) гепатоцитов можно связать с увеличением пролиферационного индекса. Известно, что полиплоидия гепатоцитов является результатом как ядерной полиплоидии (увеличение количества ДНК на ядро), так и клеточной полиплоидии (увеличение количества ядер на клетку), клетки при этом могут уменьшаться в размерах [6].

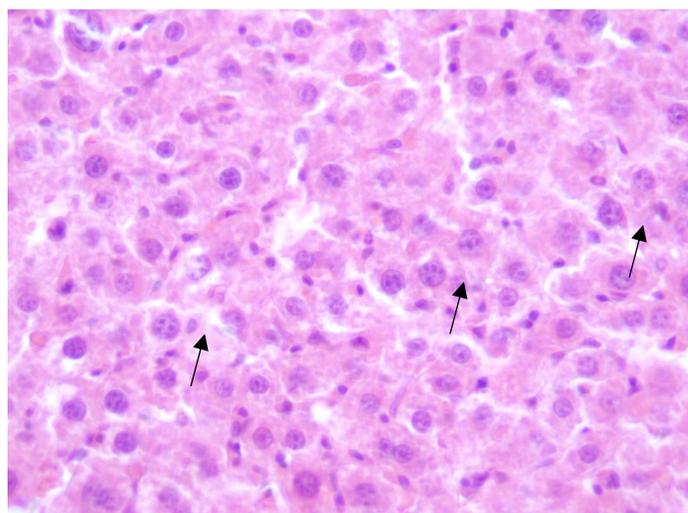


Рис. 3. Гепатоциты с крупным ядром (стрелки) при умеренной гипергомоцистеинемии (окраска: гематоксилин и эозин; увеличение: Об. 20, Ок. 10)

Заключение

Полученные нами разнонаправленные изменения популяции гепатоцитов с одной стороны – уменьшение количества клеток, дистрофические изменения в них, с другой – увеличение диаметра и площади клеточных ядер в части клеток, усиление интенсивности пролиферации, появление полиплоидных ядер. Все это свидетельствует о различных механизмах влияния повышенного содержания гомоцистеина на клеточные популяции печени: общего цитотоксического действия аминокислоты и, одновременно, повышения регенерационного потенциала печени, обеспечивающего решающую роль в гомеостазе железы. Полученные данные требуют дальнейших исследований для определения «критической точки» перехода регенеративных клеточных потенциалов в патологический процесс, что позволит модулировать определенные функции ткани печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Al Mutairi, F. Hyperhomocysteinemia: Clinical Insights / F. Al Mutairi // *J. Cent Nerv Syst Dis.* – 2020. – Oct 9. – URL: 12:1179573520962230. doi: 10.1177/1179573520962230. PMID: 33100834; PMCID: PMC7549175.
2. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications / G.K. Michalopoulos, B. Bhushan // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* –2021. – Vol. 18, no. 1.– P. 40-55.
3. Broad distribution of hepatocyte proliferation in liver homeostasis and regeneration / F. Chen, R.J. Jimenez, K. Sharma, H.Y. Luu, B.Y. Hsu, A. Ravindranathan, B.A. Stohr, H. Willenbring // *Cell Stem Cell.* – 2020. – Vol. 26, no. 1. – P. 27-33.
4. Clemens, M.M. Mechanisms and biomarkers of liver regeneration after drug-induced liver injury / M.M. Clemens, M.R. McGill, U. Apte // *AdvPharmacol.* –2019. – No.85. – P. 241-262.
5. Bhushan B., Gunewardena S., Edwards G.,Apte U. Comparison of liver regeneration after partial hepatectomy and acetaminophen-induced acute liver failure: A global picture based on transcriptome analysis / B. Bhushan, S. Gunewardena, G. Edwards, U. Apte // *Food ChemToxicol.* – 2020. – No. 139. – P.111-186.
6. La polyplôidie hépatique – Dr Jekyll ou Mr Hyde [Hepatic polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hyde] / R. Donné, M. Saroul, V. Maillat, S. Celton-Morizur, C. Desdouets // *Med Sci (Paris).*2019. – Vol. 35. –No. 6-7. – P. 519-526.
7. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury/ S. Lin, E.M. Nascimento, C.R. Gajera, L. Chen, P. Neuhöfer, A. Garbuzov, S. Wang, S.E. Artandi // *Nature.* – 2018. – Vol. 556, no. 7700. – P. 244-248.
8. Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications/ L. Campana, H. Esser, M. Huch, S. Forbes // *Nat Rev Mol Cell Biol.* –2021. – Vol. 22, no. 9. – P. 608-624.
9. Characterization of Early-Stage Alcoholic Liver Disease with Hyperhomocysteinemia and Gut Dysfunction and Associated Immune Response in Alcohol Use Disorder Patients / V. Vatsalya, K.S. Gala, A.Z. Hassan, J. Frimodig, M. Kong, N. Sinha, M.L. Schwandt // *Biomedicines.* – 2020. – Vol. 9, no. 1. – P. 7.
10. Чучкова Н.Н. Морфофункциональная оценка нуклеолярного аппарата гепатоцитов и лимфоцитов брыжеечных лимфоузлов крыс при измененном характере питания / Н.Н. Чучкова, Н.В. Кормилина, П.В. Смирнов // *Вестн. Удм. ун-та. Сер. Биология. Науки о Земле.* 2016. – Т. 26, вып. 3. С.

11. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease / G. Gentric, V. Maillet, V. Paradis, D. Couton, A. L'Hermitte, G. Panasyuk, B. Fromenty, S. Celton-Morizur, C. Desdouets // *J Clin Invest.* – 2015. – Vol. 125, no. 3. – P. 981-992.
12. Dynamics of Biochemical and Cytological Parameters of Rat Blood in Simulated Chronic Alimentary Methionine-Induced Homocysteinemia / K.A. Pazinenko, N.N. Chuchkova, M.V. Smetanina, O.A. Pazinenko, K.E. Panteleev, G.V. Ivanov, N.V. Kormilina // *Journal Biomed.* – 2021. – Vol. 17, no. 2. – P. 46-57.
13. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes / S. Cuylen, C. Blaukopf, A.Z. Politi, T. Müller-Reichert, B. Neumann, I. Poser, J. Ellenberg, A.A. Hyman, D.W. Gerlich // *Nature.* – 2016. – Vol. 535, no. 7611. – P. 308-312.
14. Sun, X. Ki-67: more than a proliferation marker / X. Sun, P.D. Kaufman // *Chromosoma.* – 2018. – Vol. 127, no. 2. – P. 175-186.
15. In vivo lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration / T. Matsumoto, L. Wakefield, B.D. Tarlow, M. Grompe // *Cell Stem.* – 2020. – Vol. 26, no. 1. – P. 34-47.

Поступила в редакцию 03.05.2022

Пазиненко Ксения Андреевна, ассистент кафедры медицинской биологии

E-mail: k.pazinenko@yandex.ru

Чучкова Наталья Николаевна, доктор медицинских наук, профессор,

заведующая кафедрой медицинской биологии

E-mail: biologya@igma.udm.ru

Сметанина Марина Викторовна, старший преподаватель кафедры медицинской биологии

E-mail: biologya@igma.udm.ru

ФГБОУВО Ижевская государственная медицинская академия

425056, Россия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

K.A. Pazinenko, N.N. Chuchkova, M.V. Smetanina

A MODERATE FORM OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA IS ACCOMPANIED BY POLYPLOIDIZATION OF HEPATOCYTES

DOI: 10.35634/2412-9518-2022-32-2-229-234

The aim of research is to find out the effect of hyperhomocysteinemia on the regenerative process of liver cells. The histological structure of the liver was studied in *Rattus norvegicus Berk* white rats (n=25) (control group – 10 animals, comparison group with moderate hyperhomocysteinemia – 15 animals). On histological sections stained with hematoxylin and eosin, the following were calculated: the number of nuclei, the proportion of binuclear cells, the area and the diameter of the nucleus; the nuclear cytoplasmic index was calculated. With the use of immunohistochemical stain by antibodies to detect the expression of the Ki-67 marker (rabbit IgG, 1:200; Cell Marque Corporation, USA), the number and intensity of expression of Ki-67-positive cells in the field of view of the microscope were determined. In the liver of animals with moderate hyperhomocysteinemia, the presence of two processes was revealed at the same time. It is reactive-dystrophic (the presence of periportal leukocyte-lymphocyte infiltrates, the appearance of cells in a state of dystrophy and necrosis) and regenerative (an increase in the core area from $52,51 \pm 4,5$ to $56,68 \pm 5,58 \mu\text{m}^2$, nuclear-cytoplasmic ratio, an increase in the number and intensity of Ki-67+cells expression). The presence of hepatocytes with very large nuclei (polyploid), which make up 12,5 % of the entire population is characteristic of homocysteine-induced liver pathology. Hyperhomocysteinemia, along with a decrease in the number and dystrophy of individual hepatocytes, leads to an increase in the diameter and area of the cell nucleus, an increase in the intensity of proliferation, the appearance of polyploid nuclei, which increases the regenerative potential of the liver and provides a crucial role in the homeostasis of the gland. The findings require further research to determine the "critical point" of transition, which will allow modulation of liver tissue function.

Keywords: hyperhomocysteinemia, hepatocytes, proliferation index, polyploidy.

REFERENCES

1. Al Mutairi F. Hyperhomocysteinemia: Clinical Insights, in *J Cent Nerv Syst Dis.*, 2020, Oct 9; 12:1179573520962230. doi: 10.1177/1179573520962230. PMID: 33100834; PMCID: PMC7549175.
2. Michalopoulos G.K., Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications, in *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 40-55.

3. Chen F., Jimenez R.J., Sharma K., Luu H.Y., Hsu B.Y., Ravindranathan A., Stohr B.A., Willenbring H. Broad distribution of hepatocyte proliferation in liver homeostasis and regeneration, in *Cell Stem Cell*, 2020, vol. 26, no. 1, pp. 27-33.e4.
4. Clemens M.M., McGill M.R., Apte U. Mechanisms and biomarkers of liver regeneration after drug-induced liver injury, in *Adv Pharmacol*, 2019, no. 85, pp. 241-262.
5. Bhushan B., Gunewardena S., Edwards G., Apte U. Comparison of liver regeneration after partial hepatectomy and acetaminophen-induced acute liver failure: A global picture based on transcriptome analysis, in *Food Chem Toxicol*, 2020, no. 139, pp. 111-186.
6. Donné R., Saroul M., Maillat V., Celton-Morizur S., Desdouets C. La polyplôidie hépatique – Dr Jekyll ou Mr Hyde [Hepatic polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hyde], in *Med Sci (Paris)*, 2019, vol. 35, no. 6-7, pp. 519-526.
7. Lin S., Nascimento E.M., Gajera C.R., Chen L., Neuhöfer P., Garbuzov A., Wang S., Artandi S.E. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury, in *Nature*, 2018, vol. 556, no. 7700, pp. 244-248.
8. Campana L., Esser H., Huch M., Forbes S. Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications, in *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, vol. 22, no. 9, pp. 608-624.
9. Vatsalya V., Gala K.S., Hassan A.Z., Frimodig J., Kong M., Sinha N., Schwandt M.L. Characterization of Early-Stage Alcoholic Liver Disease with Hyperhomocysteinemia and Gut Dysfunction and Associated Immune Response in Alcohol Use Disorder Patients, in *Biomedicine*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 7.
10. Chuchkova N.N., Kormilina N.V., Smirnov P.V. [Morfofunkcional'naya ocenka nukleolyarnogo apparata gepatocitov i limfocitov bryzhechnyh limfouzlov kryis pri izmenennom haraktere pitaniya], in *Vestn. Udmurt. Univ. Ser. Biologiya. Nauki o Zemle*, 2016, vol. 26, iss. 3, pp. 98-104, (in Russ.).
11. Gentric G., Maillat V., Paradis V., Couton D., L'Hermitte A., Panasyuk G., Fromenty B., Celton-Morizur S., Desdouets C. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease, in *J Clin Invest*, 2015, vol. 125, no. 3, pp. 981-992.
12. Pazinenko K.A., Chuchkova N.N., Smetanina M.V., Pazinenko O.A., Panteleev K.E., Ivanov G.V., Kormilina N.V. Dynamics of Biochemical and Cytological Parameters of Rat Blood in Simulated Chronic Alimentary Methionine-Induced Homocysteinemia, in *Journal Biomed*, 2021, vol. 17, no. 2, pp. 46-57.
13. Cuylen S., Blaukopf C., Politi A.Z., Müller-Reichert T., Neumann B., Poser I., Ellenberg J., Hyman A.A., Gerlich D.W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes, in *Nature*, 2016, vol. 535, no. 7611, pp. 308-312.
14. Sun X., Kaufman P.D. Ki-67: more than a proliferation marker, in *Chromosoma*, 2018, vol. 127, no. 2, pp. 175-186.
15. Matsumoto T., Wakefield L., Tarlow B.D., Grompe M. In vivo lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration, in *Cell Stem*, 2020, vol. 26, no. 1, pp. 34-47.

Received 03.05.2022

Pazinenko K.A., Assistant of the Department of Medical Biology

E-mail: k.pazinenko@yandex.ru

Chuchkova N.N., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Medical Biology

E-mail: biologya@igma.udm.ru

Smetanina M.V., Senior Lecturer of the Department of Medical Biology

E-mail: biologya@igma.udm.ru

Izhevsk State Medical Academy

Kommunarov st, 281, Izhevsk, Russia, 425056