

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ КЛІТИН ПЕЧІНКИ ПІСЛЯ РЕЗЕКЦІЇ
Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (м. Вінниця)

pivtorakv@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження є фрагментом НДР кафедри клінічної анатомії та оперативної хірургії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова «Структурні зміни в органах травної та сечостатевої систем після проведення оперативних втручань». № державної реєстрації: 0114U003688.

Вступ. Резекція печінки, у більшості випадків, залишається методом вибору і єдиним способом, що дозволяє домогтися радикального лікування і збільшення тривалості життя пацієнтів [1]. Печінка людини має значні регенераторні можливості і відновлюється, навіть, після видалення 70% її маси [2]. Однак, операційне втручання на печінці, навіть в малому обсязі може призвести до серйозних наслідків, в тому числі, і тому, що ряд факторів природної резистентності синтезується саме в печінці [3]. Так, резекція 42 % та більше паренхіми печінки призводить до виражених змін структур дванадцятипалої кишки [4]. Найчастішим ускладненням після резекції печінки є післярезекційна печінкова недостатність, яка проявляється порушенням синтетичної функції печінки, печінковою енцефалопатією та в ряді випадків може привести до смерті [5,6].

Встановлено, що регенерація печінки при її хронічному ушкодженні поєднаною дією етанолу та ССІ4 відбувається за механізмом поліплоїдизації ядер гепатоцитів [7]. Гепатоцити вступають у мітотичний цикл, забезпечуючи самопідтримку популяції [8]. Визначено, що гепатоцити нормальної печінки володіють потенційними властивостями стовбурових клітин. Вони здатні до необмеженої проліферації і можуть набувати фенотипічні ознаки стовбурових і прогеніторних клітин [9]. У процесі регенерації печінки беруть участь всі її клітинні елементи: гепатоцити, синусоїдальні клітини, клітини сполучної тканини та позаклітинний матрикс [10]. Результати досліджень ряду авторів [11] показують, що гіпертрофія, а не проліферація, є основним механізмом, завдяки якому печінку відновлює свій об'єм при кровотечі після резекції печінки.

Сьогодні ще недостатньо досліджені механізми, які запускають процеси регенерації і регулюють їх вплив у залежності від втрати маси органу.

Мета дослідження. Визначити особливості показників клітинного циклу клітин печінки, що залишилася після часткової резекції у статевозрілих щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Експеримент проведено на 42 щурах-самцях масою 200-250 г. Тварин утримували в умовах віварію при вільному доступі до їжі та води на раціоні харчування, що відповідає нормативам для щурів. В контрольній групі шести щурів ніяких втручань не проводили. Всім тваринам дослідної групи (36 щурів) виконували оперативне втручання резекцію печінки. Для цього видаляли серединну передню частку печінки та ліву передню

частку печінки (~70% загальної маси печінки). Резекція печінки у даному дослідженні трактувалася як модель гострої печінкової недостатності [12,13]. Тварин виводили з досліду по 6 тварин на кожний термін: через 1, 2, 3, 7, 10, 14 днів після резекції печінки шляхом внутрішньо-плеврального введення тіопенталу-натрію (50 мг/кг).

Утримання та маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), також керувалися рекомендаціями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) і положеннями «Правил доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)».

Вміст ДНК в ядрах клітин печінки щурів визначали методом проточної ДНК-цитометрії. Суспензії ядер з клітин печінки щурів отримували за допомогою розчину для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 1 (Partec, Німеччина) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний розчин дозволяє виконувати екстракцію ядер та маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI). У процесі виготовлення ядерних суспензій використовували одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина). Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі «Partec PAS» (Partec, Німеччина). Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії реєструвалось 20 тис. подій.

Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина), де визначались: G0G1 – відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2с); S – відсоткове співвідношення клітин фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2с та < 4с.); G2M – відсоткове співвідношення фази G2M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4с або поліплоїдні). Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах – RN2 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2с.

Статистична обробка отриманих результатів була проведена в ліцензованому пакеті «STATISTICA 8» із застосуванням непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним із отриманих варіаційних рядів, середні значення кожної ознаки, що вивчалася, та стандартне квадратичне відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерія Мана-Уїтні. При порівняльному аналізі трьох і більше груп за кількісними ознаками використовувався критерій Крассела-Уолліса.

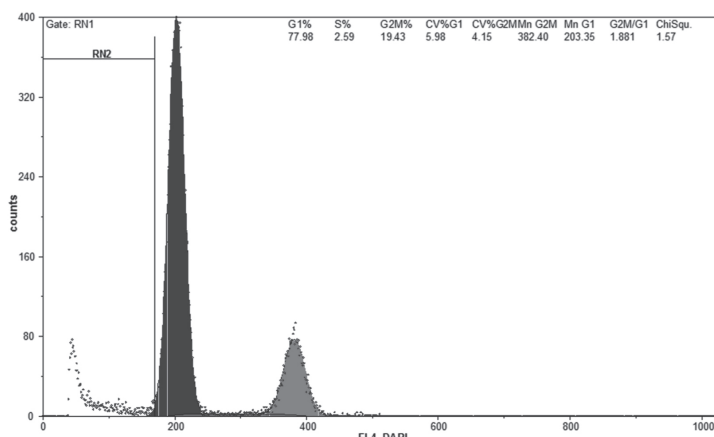


Рис. 1. ДНК-гістограма ядерної суспензії клітин печінки щурів до проведення резекції.

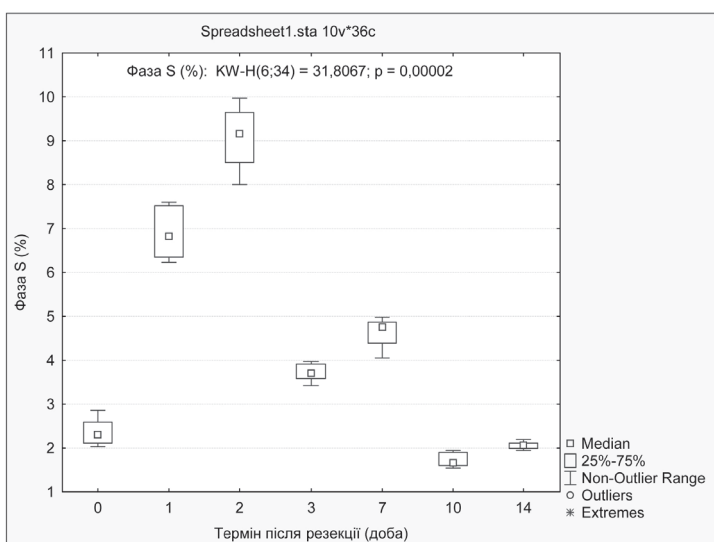


Рис. 2. Кількість клітин печінки, що знаходяться у фазі S у різні терміни після резекції.

Примітка: різниця між групами у залежності від терміну після резекції статистично значима ($p=0,00002$ за критерієм Краскела-Уолліса).

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз показників клітинного циклу і фрагментації ДНК клітин печінки показав певний баланс процесів синтезу та фрагментації ядерної ДНК у клітинах печінки інтактних тварин. Спостерігається переважання частки клітин, які перебувають у фазі проліферативного спокою (G0G1). У стані проліферативної активності (S фаза, G2+M фази) знаходиться значно менша кількість клітин (рис. 1). Отримані нами результати дослідження вмісту ДНК у клітинах печінки інтактних тварин цілком узгоджуються з даними інших дослідників [14,15].

Характеризуючи синтетичну діяльність клітин печінки, потрібно відмітити статистично значуще більшу кількість клітин у фазі S через одну (у 2,9 раза) та дві доби (у 3,8 раза) після резекції печінки у порівнянні з тваринами контрольної групи. В подальшому через три доби після резекції кількість клітин була меншою (у 2,4 раза; $p<0,05$) порівняно з тваринами, що виведені з дослі-

дження на другу добу, але у 1,6 раза ($p<0,05$) більшою у порівнянні з тваринами контрольної групи. Через сім діб кількість клітин у цій фазі була більшою у 1,3 раза ($p<0,05$) порівняно з третьою добою. Через десять діб порівняно з сьомою добою виявили меншу кількість клітин у 2,7 раза ($p<0,05$). Через чотирнадцять діб порівняно з десятою добою кількість клітин була більшою в 1,3 раза ($p<0,05$) та наближалась до показника у контрольній групі тварин (рис. 2).

Таким чином, дані можна трактувати як трьохразове зростання синтетичної діяльності клітин печінки у найближчому післяопераційному періоді після резекції печінки. Найбільше зростання відмічено на другу добу, менше – на сьому добу, ще менше на 14 добу. Така реакція гепатоцитів відмічена також іншими дослідниками [13,16,17].

Порівняння показників клітинного циклу клітин печінки на 10 та 14 добу (табл.) після її часткової резекції з дослідженнями попередніх термінів післяопераційного періоду показало, що на тлі зниження частки клітин фази G0G1 і збільшення частки клітин фази G2M істотно зріс індекс проліферації ($p<0,05$). Відомо, що перехід клітин з фази G0 у фази G1, S, G2M, свідчить про включення механізмів регенерації, спрямованих на збереження органу [7].

Збільшення індексу проліферації на десятую добу (рис. 3) свідчить про включення захисних механізмів репаративної регенерації.

За даними вчених [18] використання щурачої та мишачої моделі резекції 2/3 печінки показало, що її маса відновлюється до вихідного рівня протягом ~ 7 діб, в той час як людям потрібно майже 100 днів для повного відновлення маси печінки.

Аналізуючи основні показники клітинного циклу, слід відмітити, що через 14 діб

Таблиця.

Показники (%) клітинного циклу клітин печінки у найближчий післяопераційний період (ПП) після резекції печінки Me(Q1-Q3)

Термін дослідження	G0G1	S	G2M	IP
Контроль (n=6)	71,37 (68,98-77,98)	2,38 (2,11-2,59)	26,25 (19,43-28,72)	28,63 (22,16-31,02)
1 доба ПП (n=6)	73,92 (71,22-76,40)	6,90* (6,35-7,52)	19,18 (17,25-21,18)	26,08 (23,60-28,78)
2 доба ПП (n=6)	67,93 (66,31-68,42)	9,08*# (8,76-9,48)	22,99 (22,07-25,15)	32,07# (31,58-33,69)
3 доба ПП (n=6)	86,22*# (80,81-89,95)	3,72*# (3,58-3,91)	10,06* (6,63-15,28)	13,78*# (10,05-19,19)
7 доба ПП (n=6)	81,73* (81,69-83,82)	4,61*# (4,39-4,87)	13,70* (11,79-14,22)	18,31* (16,18-19,27)
10 доба ПП (n=6)	59,84*# (54,79-63,34)	1,73*# (1,60-1,90)	38,43*# (35,07-43,66)	40,16*# (36,67-45,20)
14 доба ПП (n=6)	58,59* (55,76-61,55)	2,18# (1,99-2,22)	39,23* (36,46-42,17)	41,41* (38,45-44,23)

Примітки: * – вірогідність відмінностей ($p<0,05$) у порівнянні з контрольною групою; # – вірогідність відмінностей ($p<0,05$) у порівнянні з попереднім терміном післяопераційного періоду.

відбулося відновлення показників клітинного циклу (G0G1, G2+M та S) до значень, які спостерігалися у групі тварин без резекції печінки (рис. 4).

Знання механізмів регенерації печінки має важливе практичне значення для розробки способів корекції різних патологічних станів печінки.

Висновки

1. Клітинний цикл клітин печінки у статевозрілих тварин у найближчому післяопераційному періоді після резекції печінки має свої особливості: кількість клітин у синтетичний період клітинного циклу (фазу S) зростає хвилеподібно. Перша хвиля зростання (найбільша) спостерігалася на 1-2 добу, друга хвиля – на 7 добу, третя – на 14 добу після операційного періоду.

2. На 10-14 добу спостереження після резекції печінки виявлено, що кількість клітин у фазі G0G1 статистично значуще менше, а у фазі G2+M – статистично значуще більше порівняно з показниками більш раннього післяопераційного періоду.

Перспективи подальших досліджень. Перспективно вивчити вплив різних способів корекції патологічних станів на клітинний цикл клітин печінки, з метою комплексної оцінки механізмів регуляції регенерації печінки.

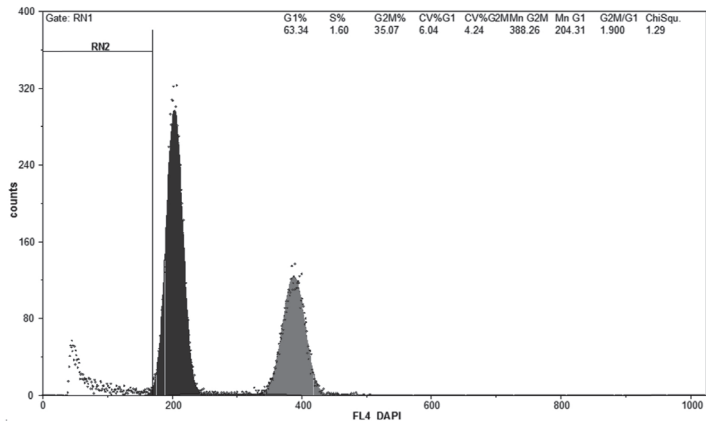


Рис. 3. ДНК-гістограма ядерної суспензії клітин печінки щурів через 10 діб після проведення резекції.

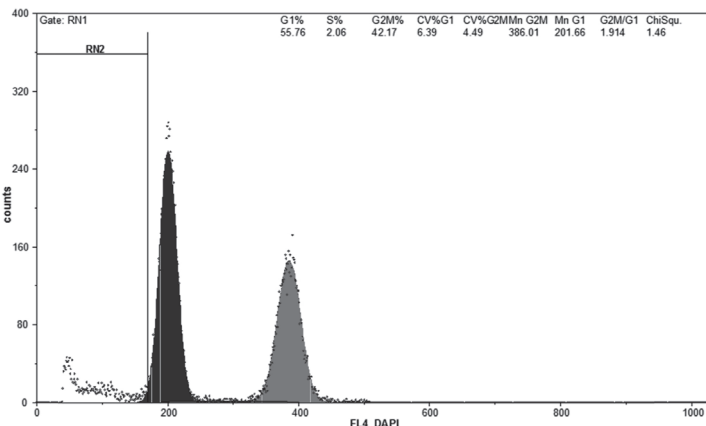


Рис. 4. ДНК-гістограма ядерної суспензії клітин печінки щурів через 14 діб після проведення резекції.

Література

1. Kovalenko Yu, Tupikin K, Vishnevskiy V. Prognostic preoperative system for postresection liver failure. *HPB*. 2016 Apr;18(S1):e298. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2016.02.764>
2. Dieltsova OI, Herashchenko SB, Kulynych HB. Stovburovi klityny i reheneratsiia pechinky. *Naukovyi visnyk Uzhhorodskoho universytetu, seriia «Medytsyna»*. 2012;1(43):175-9. [in Ukrainian].
3. Kiseleva EA, Tsvetkova LN, Andreev AA. Postrezektsionnaya regeneratsiya pecheni. *Vestnik Voronezhskogo instituta vyisokih tehnologiy*. 2016;2(17):8-12. [in Russian].
4. Tatarchuk LV, Hnatiuk MS, Yasinovskiy OB. Morfometrychna otsinka osoblyvostei remodeliuvannya struktur dvanadtsiatypaloi kyshky pry rezektsiiakh riznykh ob'iemiv pechinky. *Naukovyi visnyk Uzhhorodskoho universytetu. Seriiia "Medytsyna"*. 2016;1(53):92-5. [in Ukrainian].
5. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N. Engl. J. Med.* 2013 Dec 26;369(26):2525-34. DOI: 10.1056/NEJMr1208937
6. Jin S, Fu Q, Wuyun G, Wuyun T. Management of post-hepatectomy complications. *World J. Gastroenterol.* 2013 Nov 28;19(44):7983-91. DOI: 10.3748/wjg.v19.i44.7983
7. Rikalo NA. The mechanisms of reparative regeneration of liver tissue in immature rats at chronic toxic hepatitis. *Journal of Education, Health and Sport*. 2015 Sep 29;5(9):587-98. Available from: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.31627>
8. Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008 Feb;1782(2):61-74. DOI: 10.1016/j.bbadis.2007.12.004
9. Palitsev MA. *Biologiya stvolovykh kletok i kletochnyie tehnologii*. Moskva: Meditsina; 2009. 456 s. [in Russian].
10. Onischenko NA, Lyundup AV, Deev RV, Shagidulin MYu, Krashennikov ME. Sinusoidalnyie kletki pecheni i kletki kostnogo mozga kak komponenty i edinoi funktsionalnoy sistemyi regulyatsii vosstanovitel'nogo morfogeneza v zdorovoy i povrezhdennoy pecheni. *Genyi i kletki*. 2011;6(2):78-92. [in Russian].
11. Matot I, Nachmansson N, Duv O, Schulz S, Schroeder-Stein K, Frede S, et al. Impaired liver regeneration after hepatectomy and bleeding is associated with a shift from hepatocyte proliferation to hypertrophy. *The FASEB Journal*. 2017 Dec;31(12):5283-95. DOI: 10.1096/fj.201700153R
12. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*. 2004 Apr;25(9):1601-11.
13. Michalopoulos GK. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *The American Journal of Pathology*. 2010 Jan;176(1):2-13. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090675
14. Pivtorak KV. Osoblyvosti klitynnoho tsykladu hepatotsytiv pry eksperymentalni nealkoholnii zhvrovii khvorobi pechinky ta yii korektsii. *Visnyk problem biolohii i medytsyny*. 2017;1(135):270-4. [in Ukrainian].
15. Rykalo NA, Yarovenko LO. Doslidzhennia faz klitynnoho tsykladu yader hepatotsytiv u shchuriv riznykh vikovykh hrup pry khronichnomu alkoholnomu ushkodzhenniui pechinky ta medykamentoznii korektsii kvartsetynom i L-arhininom L-htumatatom. *Dosiakhennia biolohii ta medytsyny*. 2015;(25):27-31. [in Ukrainian].
16. Elchaninov AV, Bolshakova GB. Proliferatsiya i kletochnaya gibel gepatotsitov regeneriruyushey pecheni plodov kryis. *Tsitologiya*. 2012;54(4):313-7. [in Russian].
17. Lyizikov AN, Skuratov AG, Osipov BB. Mehanizmy regeneratsii pecheni v norme i pri patologii. *Problemy zdorovya i ekologii*. 2015;1(43):4-9. [in Belorussian].
18. Cook D, Ogunnaike BA, Vadigepalli R. Systems analysis of non-parenchymal cell modulation of liver repair across multiple regeneration modes. *BMC Syst Biol*. 2015 Oct 22;9:71. DOI: 10.1186/s12918-015-0220-9. PubMed PMID: 26493454; PubMed Central PMCID: PMC4618752.

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ КЛІТИН ПЕЧІНКИ ПІСЛЯ РЕЗЕКЦІЇ

Півторак В. І., Булько М. П., Костюк Г. Я.

Резюме. Визначені особливості клітинного циклу клітин печінки у статевозрілих тварин у найближчому післяопераційному періоді після резекції печінки: кількість клітин у синтетичний період клітинного циклу (фазу S) зростає хвилеподібно. Вершина зростання спостерігалася на 1-2 добу, друга хвиля зростання – на 7 добу, третя – на 14 добу післяопераційного періоду. На 10-14 добу спостереження після резекції печінки виявлено, що кількість клітин у фазі G0G1 статистично значуще менше, а у фазі G2+M – статистично значуще більше порівняно з показниками більш раннього післяопераційного періоду.

Ключові слова: печінка, резекція, регенерація, клітинний цикл.

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТЧНОГО ЦИКЛА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ

Пивторак В. И., Булько Н. П., Костюк Г. Я.

Резюме. Определены особенности клеточного цикла клеток печени у половозрелых животных в ближайшем послеоперационном периоде после резекции печени: количество клеток в синтетический период клеточного цикла (фазу S) растет волнообразно. Вершина роста наблюдалась на 1-2 сутки, вторая волна роста – на 7 сутки, третья – на 14 сутки послеоперационного периода. На 10-14 сутки наблюдения после резекции печени выявлено, что количество клеток в фазе G0G1 статистически значительно меньше, а в фазе G2 + M – статистически значительно больше по сравнению с показателями более раннего послеоперационного периода.

Ключевые слова: печень, резекция, регенерация, клеточный цикл.

FEATURES OF THE CELL CYCLE OF LIVER CELLS AFTER PARTIAL HEPATECTOMY

Pivtorak V. I., Bulko M. P., Kostyuk G. Ya.

Abstract. Introduction. The liver resection, in most cases, remains the method of choice and the only way to achieve radical treatment and increase the life expectancy of patients. The human liver has significant regenerative capacity and is restored, even after removing 70% of its mass. However, surgeries on the liver, even a small amount can lead to serious consequences, including, and because a number of factors natural resistance is synthesized in the liver.

The purpose of the study is to determine the characteristics of the cellular cycle of liver cells remaining after partial resection in sexually mature rats.

Object and methods. The experiment was conducted on 42 male rats weighing 200-250 g. Animals were kept under vivarium conditions with free access to food and water in a diet that meets the standards for rats. In the control group, no rats were given any of the six rats. All animals of the experimental group (36 rats) performed surgical intervention for liver resection. The middle front lobe of the liver and the left lobe of the liver were removed (~ 70% of the total weight of the liver).

Animals were taken out from the experiment of 6 animals for each term: after 1, 2, 3, 7, 10, 14 days after resection of the liver by intra-pleural administration of thiopental-sodium (50 mg/kg).

Maintenance and manipulation of the animals were carried out according to the “General ethical animal experimentation” adopted the first National Congress on Bioethics (Kyiv, 2001), also guided by the recommendations of the “European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985) and the provisions of the “Rules of preclinical safety evaluation of pharmacological agents (GLP)”.

The DNA content of the rat liver cell nuclei was determined by flow DNA cytometry. Liver cell nucleus suspensions from rats were prepared using a CyStain DNA Step 1 (Partec, Germany) nuclear DNA dilution solution in accordance with the manufacturer’s protocol. This solution allows for the extraction of nuclei and the labeling of nuclear DNA by diaminophenylindole (DAPI). In the process of making nuclear suspensions disposable filters CellTrics 50 microns (Partec, Germany) were used. Flow analysis was performed on multifunctional research flow cytometer “Partec PAS” (Partec, Germany).

Results and discussion. Analysis of cell cycle and fragmentation of liver cell DNA showed a certain balance of processes of synthesis and fragmentation of nuclear DNA in liver cells of intact animals. There is a predominance of the proportion of cells that are in the phase of proliferative rest (G0G1). In the state of proliferative activity (S phase, G2+M phase) there is a significantly smaller number of cells.

Characterizing the synthetic activity of liver cells, it is necessary to note statistically significantly more cells in the phase S in one (2,9 times) and two days (3,8 times) after liver resection compared with animals in the control group. Subsequently, three days after the resection, the number of cells was smaller (2,4 times; $p < 0,05$) compared with the animals withdrawn from the study for the second day, but 1,6 times ($p < 0,05$) higher in comparison with control animals. After seven days, the number of cells in this phase was greater than 1,3 times ($p < 0,05$) compared to the third day. Ten days later, compared with the seventh day, a smaller number of cells was detected in 2,7 times ($p < 0,05$). In fourteen days compared to the tenth day, the number of cells was 1,3 times larger ($p < 0,05$) and was closer to the indicator in the control group of animals.

Conclusions. The features of the cell cycle of liver cells in the sexually mature animals in the immediate postoperative period after liver resection are determined: the number of cells in the synthetic cycle of the cell cycle (phase S) grows wavelike. The peak of growth was observed for 1-2 days, the second wave of growth – for 7 days, the third – at 14 days postoperative period. At 10-14 days of observation after liver resection, it was found that the number of cells in the G0G1 phase is statistically significantly lower, and in the G2+M phase it is statistically significantly more significant compared to those of the earlier postoperative period.

Key words: liver, hepatectomy, regeneration, cell cycle.

Рецензент – проф. Проніна О. М.
Стаття надійшла 08.10.2018 року