

УДК 616.36-002:599.323.4:591.436

Н.А. Рикало,

С.Г. Полінкевич

Вінницький національний медичний  
університет ім. М.І. ПироговаОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ  
ГЕПАТОЦИТІВ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ  
ЗА УМОВ ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО  
ГЕПАТИТУ**Ключові слова:** клітинний цикл,  
вікові особливості, хронічний  
гепатит**Резюме.** У статті представлені дані дослідження, що пов'язано з визначенням вікових особливостей клітинного циклу гепатоцитів у щурів за умов хронічного токсичного гепатиту. Виявлено, що у молодих статевонезрілих та статевозрілих щурів з хронічним токсичним гепатитом відмічається активація захисних механізмів, пов'язаних з посиленням процесів репаративної регенерації, тоді як у групі старих статевозрілих щурів на фоні хронічного токсичного гепатиту відмічається зниження мітотичної активності.**Вступ**

Фундаментальні дослідження клітинної загибелі стають невід'ємною частиною експериментальних робіт, які присвячені вивченню різноманітних захворювань печінки. Встановлено, що в переважній більшості випадків хронічного ураження печінки основним механізмом загибелі клітин є апоптоз [1, 5]. Одним з ключових генів апоптозу є ген p53, який відіграє ключову роль в регуляції клітинного циклу - при отриманні сигналу про пошкодження ДНК він запускає синтез білків p21, p27 та p16 (інгібіторів циклозалежних кіназ), які призупиняють клітинний цикл у перевірочних точках та активізують систему репарації ДНК. Зупинка клітинного циклу відбувається на стадіях переходу з пізньої G1-фази в S-фазу та перед входженням з G2-фази в мітоз. Якщо репарація ДНК виявляється неефективною, ген p53 запускає механізми апоптозу, які ліквідують пошкоджену клітину [2, 3, 4].

**Мета дослідження**

Дослідити зміни фаз клітинного циклу клітин печінки у щурів різних вікових груп за умов хронічного тетрахлорметанового гепатиту.

**Матеріал і методи**

Дослідження виконали на 30 щурах. Основну групу дослідження склали 15 щурів, які були розподілені на наступні групи: група молодих статевонезрілих щурів - 5 тварин, віком 2 міс. (група ХТГ №1), група молодих статевозрілих щурів - 5 тварин, віком 6 міс. (група ХТГ №2), група старих щурів - 5 щурів, віком 18-20 міс (група ХТГ №3). Контроль - 15 інтактних щурів, які також були поділені на три групи, аналогічних за віком. Експериментальну модель ХТГ на щурах основної групи відтворили за допомогою інтра-

гастрального введення 20% олійного розчину СС14 з розрахунку 0,1 мл/ 100 г маси тварини тричі на тиждень у поєднанні з 5% розчином етанолу в якості пиття протягом десяти тижнів [Рикало Н.А. та співавт., 2008, патент України № 43704]. Цитофлуометричний аналіз проводили на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми "Partec", Німеччина в НДЦ ВНМУ ім М.І. Пирогова.

Статистичний аналіз отриманих даних було проведено з використанням програми Statistica 6.1 (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний номер ВХR901E246022FA) з використанням непараметричних методів дослідження в залежності від розподілу отриманих даних.

**Обговорення результатів дослідження**

При проведенні оцінки вікових особливостей показників клітинного циклу в інтактних щурів нами виявлено статистично достовірне збільшення в молодих статевонезрілих щурів на 7,99 % ядер гепатоцитів, які знаходились у фазі G1 у порівнянні з старими статевозрілими щурами ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Крім того, в групі старих статевозрілих щурів відмічається наростання на 8,68 % клітин, які знаходяться в фазі G2/M клітинного циклу порівняно з групою молодих статевонезрілих щурів ( $p < 0,02$ ) та на 7,65 % у порівнянні з групою молодих статевозрілих щурів ( $p < 0,05$ ). Беручи до уваги той факт, що дана фаза клітинного циклу свідчить про перехід клітин до мітозу, можна відмітити, що особливістю даної вікової групи у тварин з групи контролю є природне зменшення мітотичної активності. Також, слід відмітити тенденцію до зниження кількості ядер гепатоцитів, які знаходяться в S-фазі клітинного циклу в інтактних тварин залежно від віку - дане спостереження може бути пояснено за

© Н.А. Рикало, С.Г. Полінкевич, 2014

Таблиця 1

Показники клітинного циклу гепатоцитів у щурів контрольної групи в залежності від віку

	Молоді, статевонезрілі (n=5)	Молоді, статевозрілі (n=5)	Старі, статевозрілі (n=5)
G <sub>1</sub> %	81,89±3,18*	81,47±4,5	73,9±8,89
S%	1,81±0,67	1,2±0,17	1,12±0,26
G <sub>2</sub> M%	16,29±2,63**	17,32±4,53*	24,97±8,81

Примітка: \*p<0,05 – достовірність різниці показників між групами молодих статевозрілих та статевонезрілих щурів та групою старих статевозрілих щурів

\*\*p<0,02 – достовірність різниці показників між групою молодих статевонезрілих та групою старих статевозрілих щурів

рахунок зниження мітотичної активності клітин.

Нами проведено оцінку показників клітинного циклу в щурів з ХТГ із різних вікових груп. Відмічено зростання відсотку ядер клітин печінки, що знаходилися в S-фазі в групі молодих статевонезрілих щурів у 1,7 та у 2,15 раза порівняно з аналогічним показником у групах молодих статевозрілих та старих статевозрілих щурів з

ХТГ (p<0,05 та p<0,03, відповідно) (табл. 2).

Провівши оцінку фаз клітинного циклу в молодих статевонезрілих щурів з ХТГ нами відмічено статистично достовірне зменшення відсотку клітин, які перебувають в G<sub>1</sub>-фазі на 4,04 % у порівнянні з аналогічним показником у щурів з групи контролю (77,85±2,12 проти 81,89±3,18, p<0,03) (рис. 1). Крім того, спостерігається дос-

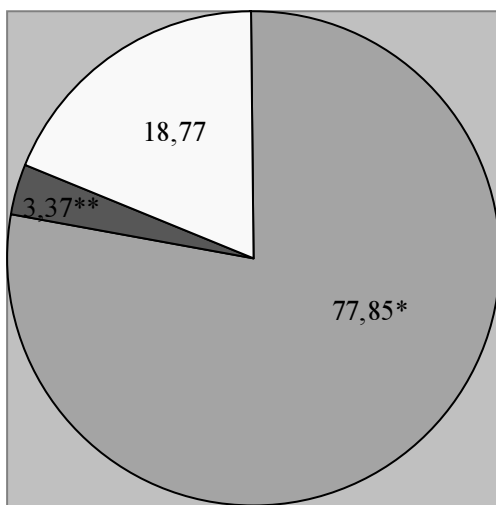
Таблиця 2

Показники клітинного циклу гепатоцитів у щурів основної групи в залежності від віку

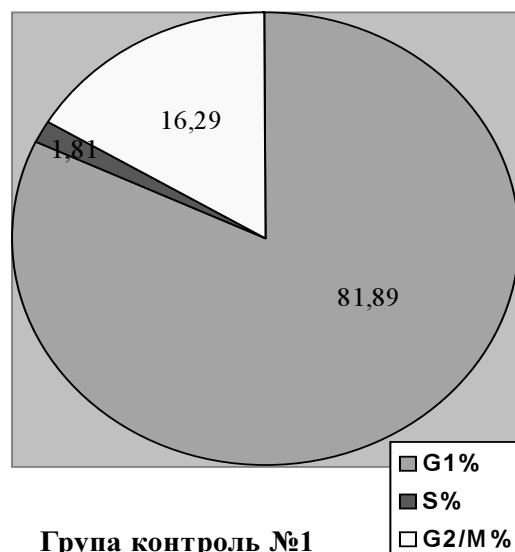
	Молоді, статевонезрілі (n=5)	Молоді, статевозрілі (n=5)	Старі, статевозрілі (n=5)
G <sub>1</sub> %	77,85±2,12	78,33±2,92	81,28±3,77
S%	3,37±1,29	1,96±0,63*	1,56±0,55**
G <sub>2</sub> M%	18,77±1,78	20,1±3,79	17,15±4,21

Примітка: \*p<0,05 – вірогідність різниці показників між групами ХТГ №2 та ХТГ №3

\*\*p<0,03 – вірогідність різниці показників між групами ХТГ №1 та ХТГ №3



Група ХТГ №1



Група контроль №1

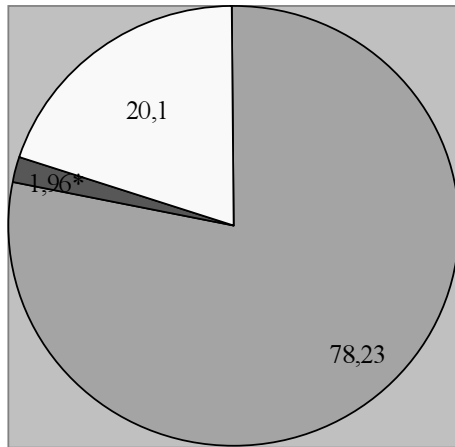
Рисунок 1. Показники клітинного циклу гепатоцитів у молодих статевонезрілих щурів з основної групи та групи контролю.

Примітка: \*p<0,03 - достовірність різниці між основною групою та групою контролю

\*\*p<0,05 - достовірність різниці між основною групою та групою контролю

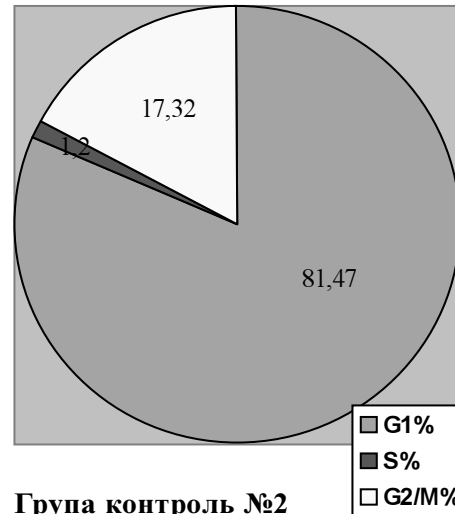
товірне збільшення відсотку клітин, які перебувають в S-фазі у 1,86 раза порівняно з групою контролю ( $3,37 \pm 1,29\%$  проти  $1,81 \pm 0,67\%$ ,  $p < 0,03$ ). Статистично достовірної різниці між кількістю клітин, що перебувають у G2/M-фазі нами відмічено не було.

Проаналізувавши показники клітинного циклу



Група ХГТ №2

у молодих статевозрілих щурів із хронічним токсичним гепатитом нами відмічено достовірне зростання кількості ядер печінкових клітин, які перебувають у S-фазі в 1,6 раза в порівнянні даного показника з аналогічним у щурів з групи контролю ( $1,96 \pm 0,63\%$  проти  $1,2 \pm 0,17\%$ ,  $p < 0,03$ ) (рис. 2). Провівши оцінку кількості ядер гепатоцитів,



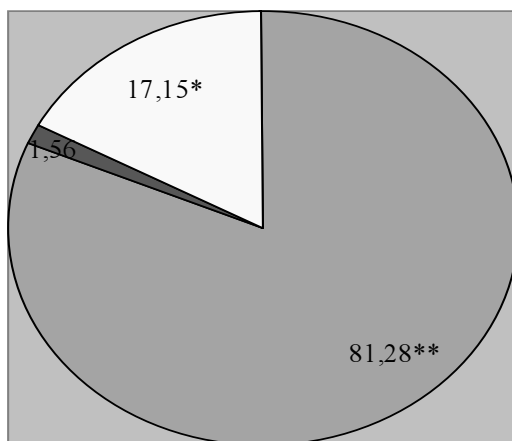
Група контроль №2

**Рисунок 2. Показники клітинного циклу гепатоцитів у молодих статевозрілих щурів з основної групи та групи контролю.**

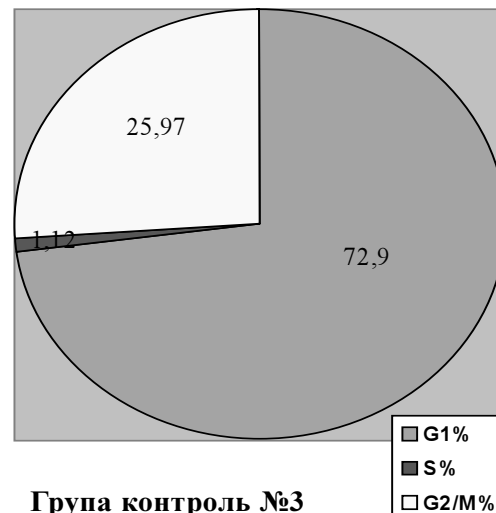
Примітка: \* $p < 0,03$  - достовірність різниці показників між основною групою та групою контролю

які перебували в G1 та G2/M фазах у щурів даної групи різниці у порівнянні з ідентичними за віком тваринами з групи контролю виявлено не було ( $78,33 \pm 2,92\%$  проти  $81,47 \pm 4,5\%$  та  $20,1 \pm 3,79\%$  проти  $17,32 \pm 4,53\%$  відповідно,  $p > 0,05$ ). На нашу думку, відсутність різниці за кількістю ядер печінкових клітин, які перебувають саме в цих фазах клітинного циклу вказує на той факт, що у тварин з ХГТ даної вікової групи не відбувається зупинка поділу клітин у контрольних точках внаслідок експресії гена p53.

У результаті проведеного нами статистичного аналізу фаз клітинного циклу у старих статевозрілих щурів з ХГТ виявлено достовірно більший відсоток ядер клітин печінки, що перебували у фазі G1 на  $8,38\%$  ( $81,28 \pm 3,77\%$  проти  $72,9 \pm 7,42\%$ ,  $p < 0,05$ ) та меншу кількість ядер гепатоцитів, що перебувають у G2/M фазі на  $8,82\%$  порівняно з аналогічним показником у інтактних тварин такого ж віку ( $17,15 \pm 4,21\%$  проти  $25,97 \pm 7,38\%$ , \* $p < 0,03$ ) (Рис. 3). Рівень кількості ядер печінкових клітин, які перебувають в



Група ХГТ №3



Група контроль №3

**Рисунок 3. Показники клітинного циклу гепатоцитів у старих статевозрілих щурів з основної групи та групи контролю.**

Примітки: \* $p < 0,03$  - достовірність різниці між основною групою та групою контролю

\*\* $p < 0,05$  - достовірність різниці між основною групою та групою контролю

S-фазі в даній віковій групі статистично не відрізнявся від аналогічного показника групи контролю такого ж віку ( $1,56 \pm 0,55$  % проти  $1,12 \pm 0,26$  %,  $p > 0,05$ ). На нашу думку, отримані показники клітинного циклу в цій віковій групі у щурів з ХГТ вказують на зниження репаративних та регенеративних можливостей органу, зокрема це можна пояснити зниження кількості ядер гепатоцитів, що перебувають в S-фазі, а також наростання відсотку ядер клітин печінки в G1-фазі клітинного циклу, що вказує на зупинку поділу клітини в контрольних точках, та є свідченням неефективної репарації ДНК.

### Висновки

1. У молодих статевонезрілих та статевозрілих щурів порівняно з групами інтактних тварин аналогічного типу спостерігається статистично достовірне збільшення відсотка ядер клітин, що знаходяться в S - фазі клітинного циклу, що вказує на активацію процесів репаративної регенерації, так як саме в цій фазі відбувається реплікація ДНК та подвоєння хромосом.

2. У групі старих статевозрілих щурів відмічається збільшення відсотка ядер гепатоцитів, що знаходяться в G1 та G2/M фазах клітинного циклу, що є свідченням зниження мітотичної активності.

### Перспективи подальших досліджень

Дослідження вікових особливостей репаративної регенерації дозволить поглибити знання щодо механізмів розвитку хронічних уражень печінки.

**Література.** 1. Apoptosis and necrosis in the liver / Guicciardi M.E., Malhi H., Mott J.L. [et al.] // *Comprehensive Physiology*. - 2013. - Vol. 3(2). P. - 977-1010. 2. Decoding cell death signals in liver inflammation / Brenner C., Galluzzi L., Kepp O. [et al.] // *Journal of Hepatology*. - 2013. - Vol. 59 (3). - P. 583-594. 3. Malhi H. Cellular and molecular mechanisms of liver injury / Malhi H., Gores G.J. // *Gastroenterology*. - 2008. - Vol. 134(6). - P. 1641-1654. 4. Жижица Г.П. Роль апоптоза в нормальном онтогенезе, патогенезе и старении / Г.П. Жижица // *Клин. геронтол.* - 2002. - № 4. - С. 3-10. 5. Лук'янова О.М. Роль клітинної смерті у прогресуванні хронічних вірусних гепатитів у дітей / О.М. Лук'янова, Т. Д. Задорожна, В. С. Березенко // *Ж. Акад. Мед. Наук України*. - 2009. - Том 15 N 4. - С. 670-683.

## ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ГЕПАТОЦИТОВ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

*Н.А. Рыкало, С.Г. Полинкевич*

**Резюме:** В статье представлены данные исследования, которые связаны с определением возрастных особенностей клеточного цикла гепатоцитов у крыс в условиях хронического токсического гепатита. Выявлено, что у молодых неполовозрелых и половозрелых крыс с хроническим токсическим гепатитом отмечается активация защитных механизмов, связанных с усилением процессов репаративной регенерации, тогда как в группе старых половозрелых крыс на фоне хронического токсического гепатита отмечается снижение митотической активности.

**Ключевые слова:** клеточный цикл, возрастные особенности, хронический гепатит

## FEATURES OF THE HEPATOCYTE'S CELLULAR CYCLE IN RATS OF DIFFERENT AGE GROUPS UNDER CONDITIONS OF CHRONIC TOXIC HEPATITIS

*N.A. Rikalo, S.G. Polinkevich*

**Abstract.** The data of investigation connected with determining age peculiarities of the cellular cycle of hepatocytes in rats under conditions of chronic toxic hepatitis are presented in the article.

The research was carried made on 30 laboratory rats, which according to the age were distributed to three subgroups. The first subgroup included 5 young immature rats aged 2 months, the second subgroup - 5 young mature rats aged 6 months. The third subgroup was represented by 5 old mature rats aged 18-20 months. The control group included 15 intact rats of the same age, which was also divided into three subgroups. In rats of the main group was experimentally reconstructed a model of chronic toxic hepatitis. Study of the cellular cycle features were carried out using the flow cytometry.

We have found out that in young immature and mature rats with chronic toxic hepatitis activation of protective mechanisms associated with increased reparative regeneration processes occurs, whereas in the group of old immature rats with chronic toxic hepatitis a decrease of the mitotic activity takes.

**Key words:** cell cycle, age features, chronic hepatitis

**Vinnitsa National Medical University named after**

**M.I. Pirogov**

*Clin. and experim. pathol.* - 2014. - Vol.13, №3 (49). - P.138-141.

*Надійшла до редакції 05.09.2014*

*Рецензент – проф. І.С.Давиденко*

© *Н.А. Рыкало, С.Г. Полинкевич, 2014*