

В.Я. Березовський, Р.В. Янко, І.Г. Літовка

Вплив дозованої нормобаричної гіпоксії на фізіологічну регенерацію паренхіми печінки молодих і дорослих щурів

Исследовали влияние дозированной нормобарической гипоксии на показатели физиологической регенерации печени. После завершения 28-суточного эксперимента у 3- и 9-месячных крыс увеличивается количество гепатоцитов на единицу площади ткани, увеличение их ядер, уменьшается площадь цитоплазмы, что приводит к увеличению ядерно-цитоплазматического соотношения. Возрастает уровень экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста-1 у взрослых животных. Сделан вывод, что краткосрочная дозированная гипоксия повышает физиологическую регенерацию паренхимы печени как у молодых, так и у взрослых животных.

ВСТУП

Біологічними ефектами гіпоксії дослідники займаються досить тривалий час. Достатньо вивчено патогенетичну її роль у розвитку серцево-судинних захворювань. Останнім часом виявлено лікувально-стимулювальні властивості дозованої гіпоксії, які широко застосовуються в сучасній медицині. Запропоновано розрізняти індиферентний, саногенний, патогенний та абіогенний рівні гіпоксії. Саногенну гіпоксію використовують як засіб підвищення неспецифічної резистентності організму у лікуванні і профілактиці при анеміях, алергіях, радіоактивних ураженнях тощо [2, 3, 8, 12]. Особливу увагу дослідників привертає печінка, адже вона виконує декілька життєво важливих функцій, однією з яких є детоксикація – знешкодження та видалення з організму шкідливих речовин. На жаль, забруднення навколишнього середовища, зловживання алкоголем, дія гепатотропних вірусів, згубно впливають на фізіологічну діяльність печінки, призводячи до її пошкодження. Тому дослідження шляхів підвищення регенераторних процесів у паренхімі печінки та запобігання її

© В.Я. Березовський, Р.В. Янко, І.Г. Літовка

патології є вельми актуальним. Одним з можливих методів активації фізіологічної регенерації печінки ссавців різного віку може бути дихання штучними газовими сумішами зі зниженим парціальним тиском кисню [7]. З віком у зв'язку з формуванням епігенетичних змін організму швидкість регенераторних процесів печінки зменшується. У зв'язку з цим вивчення впливу дозованої нормобаричної гіпоксії на зміни інтенсивності процесів регенерації печінки в молодих та дорослих щурів можуть мати певні відмінності.

Мета цієї роботи – вивчення впливу дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ) на процеси фізіологічної регенерації паренхіми печінки молодих і дорослих щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження впливу ДНГ здійснювали протягом 28 діб на щурах-самцях лінії Вістар віком 3 міс (I, II групи) та 9 міс (III, IV групи). Перед початком експерименту було сформовано 4 групи: I, III – контрольні тварини, II і IV – щури, що отримували ДНГ. Гіпоксичну газову суміш з парціальним тиском кисню 90–110 мм рт. ст. (10 % кисню в азоті) подавали щодня за допо-

могою апарата гірського повітря “Борей” в переривчастому режимі: 10 хв деоксигенація і 10 хв реоксигенація протягом 4 год. Щотижнево контролювали масу тіла кожного щура. Роботу з лабораторними тваринами проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей (Страсбург, 1985).

Для морфологічних досліджень відбирали зразки тканини з правої та лівої частки печінки, які фіксували в рідині Буена. Зневоднення матеріалу проводили у спиртах зростаючої концентрації (від 70 до 96°) та діоксані. Зразки печінки заливали в парафін. Зрізи завтовшки 5–6 мкм виготовляли на санному мікромомі, фарбували за традиційною методикою – гематоксилином Бемера та еозином, заключали в канадський бальзам [4, 18].

Гістологічні препарати аналізували на світлооптичному мікроскопі за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15х та комп’ютерної програми IMAGE J. Функціональний стан і регенераторні властивості паренхіми печінки оцінювали на підставі підрахунку загальної кількості гепатоцитів у полі зору, кількості одноядерних і двоядерних гепатоцитів і вимірювання площі гепатоцитів, їх ядер і цитоплазми, а також відстані між сусідніми ядрами. Підрахунок кількості гепатоцитів проводили в 10 полях зору мікроскопа, а площу вимірювали, виходячи з середнього значення відносно 100 клітин. Морфометричні виміри проводили в полі зору мікроскопа при збільшенні в 400 разів [1].

Визначення рівня експресії інсуліноподібного фактора росту-1 (ІФР-1) здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього 20 мг печінки гомогенізували у 375 мл розчину “Рибозоль-А”. По закінченні процедури проби зберігали при -70°С до проведення ПЛР. За маркерний ген (внутрішнього контролю рівня експресії мРНК) приймали ген GAPDH (від англ. glyceraldehyde phosphate

dehydrogenase). РНК виділяли за допомогою наборів “Рибозоль” (“AmliSens”, Росія) за стандартною процедурою. Для видалення слідів геномної ДНК зразки обробляли 1 U RNasefree DNase (“Sigma”, США) при 37°С 30 хв згідно з інструкцією до набору. Реакцію оберненої транскрипції проводили з використанням стандартних наборів “Реверта-L-100” (“AmliSens”, Росія). В кожну пробу додавали по 0,5 мкл 3’ та 5’ генспецифічних праймерів.

Послідовність олігонуклеотидних праймерів кДНК, які використовували для RT-PCR мРНК IGF-1 та GAPDH, була такою: GAPDH

5’-ATCTTTGTGATGGGTGTGA A-3’

5’-TGGGAGTTGGTGTGAAGTC-3’

IGF-1

5’’-TGGACGCTCTTCAGTTCGTG-3’’

5’’-CTGCACTTCTCTACTTGTG-3’’

Реакційну суміш інкубували при 37°С протягом 30 хв. ПЛР проводили після реакції оберненої транскрипції. Кінцевий об’єм суміші для ампліфікації у кожному зразку становив 25 мкл. Склад ампліфікаційної суміші: по 0,5 мкл (1мкг/мкл) кожного 3’ та 5’ генспецифічного праймера, 2 мкл dNTR (2 ммоль), 2 мкл DEPC-обробленої води, 10 мкл кДНК (зразок після виділення ДНК або проведення реакції оберненої транскрипції), 10 мкл верхньої суміші для ПЛР (з Tag-полімеразою, 3 ммоль MgCl₂). Ампліфікацію проводили на термоциклері Corbett Research (Австралія). Використовували гарячий старт при 95°С протягом 5 хв, потім проводили цикли денатурації при 94°С – 10 с, випалу при 61°С – 10 с, подовження при 72°С – 10 с (25–30 повторів), кінцевий етап фази подовження при 72°С – 10 хв.

Електрофорез готової ПЛР-суміші проводили в 1,5%-му агаровому гелі з використанням тріс-боратного буфера (рН 8,3), який містив 0,5 мкг/мл бромиду етидіуму. Готовий гель візуалізували за допомогою ультрафіолетового транслюмінатора та фотографували. Розмір ПЛР-продукту

контролювали за допомогою маркерів з відомою довжиною фрагментів ДНК. Специфічність ампліфікованих фрагментів РНК у разі визначення рівня експресії генів контролювали за допомогою тих самих зразків, оброблених РНКазою, але без проведення реакції оберненої транскрипції (негативний контроль). Кількість ампліфікованої РНК визначали після сканування електрофореграм в ультрафіолетовому світлі. Кількість специфічної РНК представляли як добуток площі смуги на інтенсивність її світіння за допомогою програми "BioTestColor". Рівень експресії гена розраховували як відношення кількості специфічної РНК до кількості маркерної GAPDH-РНК у тому самому зразку та представляли в умовних одиницях.

Статистичну обробку одержаних морфометричних результатів здійснювали методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними групами оцінювали за критерієм *t* Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями досліду при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Початкова маса тіла 3-місячних щурів становила 140–170 г, а 9-місячних – 340–370 г. За 28 діб експерименту маса тіла 3-місячних щурів контрольної групи збільшилася на 74 %, а в групі, що зазнавала впливу ДНГ – на 81 %. Маса тіла 9-місячних щурів контрольної групи за цей період часу збільшилася лише на 7 %, а для тварин дослідної групи навіть зменшилася на 2 % (табл. 1).

Маса печінки 3-місячних щурів після 28-

добового впливу ДНГ була нижчою на 6%, а 9-місячних тварин – на 24 % порівняно з контрольними групами (див. табл. 1).

Співвідношення між масою печінки та масою тіла (печінковий індекс) в 3-місячних щурів, що дихали ДНГ, зменшилося на 5 %, а 9-місячних – на 18 % порівняно з контрольними групами тварин. Таким чином, у молодих і дорослих тварин маса печінки при ДНГ зменшується більш інтенсивними темпами, ніж маса тіла.

Кількість гепатоцитів є суттєвим показником функціональної активності та фізіологічної регенерації печінки. Відомо, що і при фізіологічній, і при репаративній регенерації печінки відбувається збільшення загальної кількості гепатоцитів [6, 9, 17]. У наших дослідженнях середня кількість гепатоцитів у молодих і дорослих щурів при ДНГ збільшилася на 6 і 7 % відповідно порівняно з контрольними групами тварин такого самого віку (табл. 2).

Більшість гепатоцитів печінки є одноядерними, рідше зустрічаються двоядерні. За нашими результатами, середня кількість одноядерних гепатоцитів у молодих і дорослих щурів дослідних груп мала тенденцію до збільшення порівняно з контролем. У 3-місячних тварин спостерігали лише тенденцію до зниження числа двоядерних гепатоцитів, а у 9-місячних щурів цей показник вірогідно знизився на 20 %.

Співвідношення двоядерні/одноядерні гепатоцити у контрольній групі 3-місячних тварин становить 5,07 %, а у дослідній групі воно знижується до 4,08 %. У 9-місячних контрольних щурів цей коефіцієнт дорівнює 7,19 %, а в групі, що зазнавала впливу

Таблиця 1. Маса тіла та печінки молодих і дорослих щурів після 28-добового впливу дозованої нормобаричної гіпоксії ($M \pm m$, $n=8$)

Показник	3-місячні щури		9-місячні щури	
	Контроль	Гіпоксія	Контроль	Гіпоксія
Маса тіла, г	250±14,24	248±5,07	393±8,58	367±11,16
Маса печінки, г	9,8±0,56	9,2±0,34	11,4±0,71	8,7±0,07*
Співвідношення маса печінки/маса тіла, %	3,92	3,71	2,9	2,37

Примітка: тут і в табл. 2, 3* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Таблиця 2. Кількість гепатоцитів печінки молодих і дорослих щурів після 28-добового впливу дозованої нормобаричної гіпоксії (M±m, n=8)

Показник	3- місячні щури		9- місячні щури	
	Контроль	Гіпоксія	Контроль	Гіпоксія
Загальна кількість гепатоцитів	145±2,12	153±4,61	149±4,42	159±8,32
Кількість гепатоцитів				
одноядерних	138±2,18	147±4,66	139±3,95	151±8,02
двоядерних	7±0,71	6±0,7	10±0,42	8±1,07*
Співвідношення двоядерні/одноядерні гепатоцити, %	5,07	4,08	7,19	5,3
Відстань між сусідніми ядрами гепатоцитів, мкм	12±2,54	12,4±1,96	10,7±2,49	11,5±2,14

ДНГ, – знижується до 5,3 % (див. табл. 2).

При вимірюванні відстані між ядрами гепатоцитів ми не спостерігали вірогідних розбіжностей між дослідними та контрольними групами тварин (див. табл. 2).

Серед морфометричних показників функціонального стану і регенераторного процесу відіграє значну роль ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів (індекс Гертвіга). При вимірюванні площі гепатоцитів, їх ядер та цитоплазми як у дорослих, так і у молодих дослідних тварин спостерігали вірогідне зниження цих показників порівняно з контрольними групами (табл. 3).

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів вірогідно підвищувалось у дослідних 3- та 9-місячних щурів на 54 і 43 % відповідно, порівняно з контрольними значеннями, що характеризує збільшення розмірів ядер гепатоцитів тварин II і IV груп. Вважаємо, що це може свідчити про підготовку клітин до мітозу, який супроводжується синтезом нуклеїнових кислот і білків. Наші результати збігаються з новітніми даними, що збільшення розмірів ядер гепатоцитів зумовлена збільшенням кількості

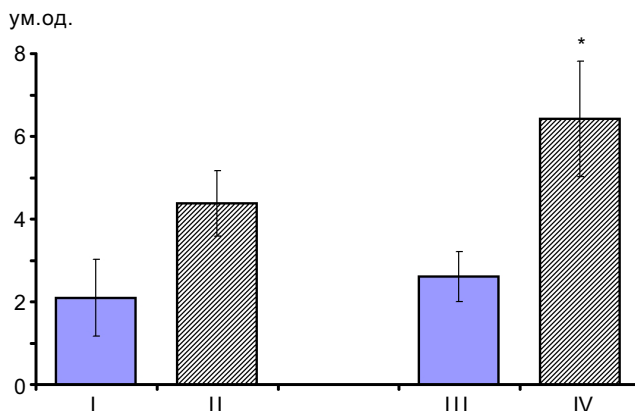
тетра- та октаплоїдних гепатоцитів [5, 10, 11].

У наших дослідженнях виявлена тенденція до підвищення експресії гена ІФР-I у молодих щурів і вірогідне підвищення цього показника у дорослих тварин (рисунок). Фактори росту, до яких належить і ІФР-I є поліпептидами, що здійснюють різноспрямовані впливи на клітини-мішені, включаючи мітогенез, підвищують або знижують експресію генів, ступінь поляризації клітин та їхні секреторні можливості. Майже весь внутрішній пул ІФР-I синтезується та секретується печінкою. Наявні літературні джерела вказують на значну роль ІФР-I у розвитку та проліферації клітин печінки протягом життя. Діє ІФР-I на гепатоцити через специфічні рецептори I типу (ІФР-IR), блокада яких призводить до значного зниження проліферації гепатоцитів [14].

Дослідження показали, що в культурі гепатоцитів ІФР-I стимулює синтез ДНК і підвищує проліферацію клітин [15]. In vitro ІФР-I і ІФР-I-незалежний фактор від гепатоцитів можуть стимулювати вироблення зірчастими клітинами печінки фактора росту гепатоцитів, який має пряму дію на

Таблиця 3. Розміри гепатоцитів, їхніх ядер цитоплазми печінки молодих і дорослих щурів після 28-добового впливу дозованої нормобаричної гіпоксії (M±m, n=8)

Показник	3- місячні щури		9- місячні щури	
	Контроль	Гіпоксія	Контроль	Гіпоксія
Площа, мкм ²				
гепатоцита	371,1±32,87	208,5±21,57*	313,2±38,08	193±26,19*
ядра гепатоцита	43,3±2,5	34,7±1,12*	38,9±1,96	33,6±1,07*
цитоплазми	328,7±26,98	171,6±30,46*	276,1±34,78	164,5±30,5*
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,13±0,02	0,20±0,01*	0,14±0,02	0,20±0,01*



Зміни рівня експресії гена інсуліноподібного фактора росту-1 в гомогенаті печінки молодих (I, II групи) і дорослих (III, IV групи) щурів. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

проліферацію гепатоцитів [19].

Позитивні результати впливу саногенного рівня гіпоксії на печінку було виявлено багатьма дослідниками. Показано, що при такому ступені гіпоксії внаслідок підвищення функціональної активності ядер та активізації пластичних процесів, спостерігається збільшення розмірів ядер, ядерець і кількості пор у каріолемі гепатоцитів, кількості двоядерних гепатоцитів [7], насиченості клітини структурами, з якими пов'язані енергозабезпечуючі функції: мітохондріями, пероксисомами, мембранами ендоплазматичного ретикулула, лізосомальними та ліпофусциновими утвореннями [13]. Позитивні результати гіпоксії було отримано і на зірчастих клітинах печінки, які безпосередньо беруть участь у проліферації і рості гепатоцитів [16].

За нашими результатами у молодих і дорослих тварин після 28-добового впливу ДНГ маса печінки зменшується інтенсивніше, ніж маса тіла, але у 9-місячних щурів активніше, ніж у 3-місячних. Тобто молоді тварини більш витривалі до дії ДНГ, ніж дорослі щури. Тенденція до збільшення кількості гепатоцитів і значне підвищення ядерно-цитоплазматичного співвідношення, що вказує на відносне збільшення розмірів ядра, може свідчити про посилення функціональної активності та підготовку гепатоцита до мітозу. Вірогідне підвищення

експресії гена ІФР-1 у 9-місячних і тенденція до збільшення у 3-місячних щурів також свідчить на користь стимулювальної дії саногенної гіпоксії на фізіологічну регенерацію паренхіми печінки.

ВИСНОВКИ

1. Дія переривчастої нормобаричної саногенної гіпоксії протягом 28 діб збільшує кількість гепатоцитів у полі зору, підвищує ядерно-цитоплазматичний індекс у печінці молодих і дорослих щурів, а також посилює експресію гена ІФР-1 у 9-місячних тварин, активуючи регенерацію гепатоцитів.

2. Активуюча дія саногенного рівня гіпоксії на фізіологічну регенерацію паренхіми печінки проявляється як у 3-місячних, так і у 9-місячних щурів, незважаючи на різницю у віці та інтенсивності енергетичного метаболізму.

3. Відносна втрата маси тіла та маси печінки у 9-місячних щурів виявилась істотно більшою, ніж у 3-місячних тварин.

V.A. Berezovskiy, R.V. Yanko, I.G. Litovka

THE EFFECT OF DOSED NORMOBARIC HYPOXIA ON PHYSIOLOGIC REGENERATION OF LIVER PARENCHIMA IN YOUNG AND OLD RATS.

We studied the effect of dosed normobaric hypoxia during 28 days on functional state and physiological regeneration of liver

parenchyma. After completion of experiments in 3 and 9-month old rats we observed an increase in the amount of hepatocytes per unit of tissue area, with hypertrophied nucleus and decreased cytoplasmic area. IGF-I gene expression in 9-month old animals was increased. Thus, our study suggests that normobaric hypoxia stimulates physiological regeneration of liver parenchyma in young and adult rats.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 385 с.
2. Березовский В.А., Дейнега В.Г. Физиологические механизмы саногенных эффектов горного климата. – К.: Наук. думка, 1988. – 222 с.
3. Березовский В.А., Левашов М.И. Введение в оротерапию. – М.: Изд-во Академии проблем гипоксии РФ. – 2000, 2-е изд. – 76 с.
4. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
5. Воробьева О.В. Влияние экспериментального цирроза печени у самок крыс на патологию и регенерацию печени у потомства: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.: 14.00.15. – Чувашский гос. универ. им. И.Н. Ульянова. – Ульяновск, 2007. – 23 с.
6. Карапетян А.Ф., Дживанян К.А. О регенераторном потенциале печени озерной лягушки RANA RIDIBUNDA после частичной гепатэктомии // Цитология. – 2003 – **48**, № 4. – С.346–354.
7. Лебкова Н.П., Чижов А.Я., Бобков Ю.И. Адаптационные внутриклеточные механизмы регуляции энергетического гомеостаза при прерывистой нормобарической гипоксии // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1999. – **85**, №3. – С.403–411.
8. Литовка І.Г. Дозирована гіпоксія як фактор корекції остеопенії бездієвності // Космічна наука і технологія. – 2002. – **8**, №4. – С.81–85.
9. Оболенська М.Ю. Регенерація печінки у щурів: молекулярно-біологічні процеси та їх регуляція: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.03. Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України. – К., 1999. – 34 с.
10. Сакута Г. А., Кудрявцев Б.Н. Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени крыс. Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов // Цитология. – 2005 – **47**, №5. – С.379–387.
11. Слинко М.С. Морфофункциональные показатели печени нутрий в постнатальном онтогенезе: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.: 16.00.02. Ставроп. гос. аграр. ун-т. – Ставрополь, 2007. – 23 с.
12. Стрелков Р.Б., Чижов А.Я. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. – Екатеринбург: Урал. рабочий. – 2001. – 400 с.
13. Doliba M.M., Hordii S.K., Korobov V.M. The effect of hypoxic hypoxia on energy metabolism in the liver mitochondria and the acetylcholine content of different tissues // Fiziol. Zh. – 1996. – **42**, № 5–6. – P. 45–50.
14. Desbois-Mouthon C., Wendum D., Cadoret A., Rey C. et al. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knock-out // The FASEB J. – 2006. – №20. – P.773–775.
15. Kimura M., Oginara M. Effects of insulin-like growth factor I and II on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes // Source. – 1998. – **354**, №2–3. – P.271–281.
16. Ping-Sheng C., Wei-Rong Z. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells // World J. Gastroenterol. – 2001. – **7**, №5. – P.647–651.
17. Rozga J. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure // Med. Sci. Monit. – 2002. – **8**, №2. – P.32–38.
18. Rudzki Z., Szczudrawa J., Stachura J. Morphometry of normal, regenerating and cancerous hepatocytes // Folia Histochem. Cytobiol. – 1999. – **27**, №3. – P.141–148.
19. Skrtic S., Wallenius K., Sjugren K. et al. Possible roles of insulin-like growth factor in regulation of physiological and pathophysiological liver growth // Horm. Res. – 2001. – №55. – P.11–16.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: brolag@biph.net*

*Матеріал надійшов до
редакції 08.07.2008*