

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

Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск

Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск

ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА Ki-67 КЛЕТКАМИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ У КРЫС

Цель исследования – определение экспрессии белка Ki-67 в гепатоцитах в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии. **Материал и методы.** На гистологических срезах печени белых беспородных крыс интактной группы (n=10) и группы с экспериментальной гипергомоцистеинемией (ЭГГЦ) (n=15) проведено иммуногистохимическое окрашивание для выявления экспрессии маркера Ki-67 (кроличьи IgG, 1:200; Cell Marque Corporation, USA), при окраске гематоксилином и эозином подсчитывали: количество ядер (на 100 мкм²), долю двуядерных клеток (%), площадь (в мкм²) и диаметр (в мкм) ядра; совокупную площадь ядерного материала (на 100 мкм²). **Результаты и обсуждение.** Выявлено, что у животных с ЭГГЦ статистически значимо (p<0,05) возрастало: количество клеток, маркируемых Ki-67 – в 2,6 раза, средняя интенсивность свечения (экспрессия маркера) – в 1,68 раз, пролиферативный индекс – в 4 раза. Морфометрия ядер показала увеличение площади (на 7,4%, p>0,05) и диаметра (на 5,7%, p>0,05) ядра, ядерно-цитоплазматического индекса (на 20%, p<0,05), при этом количество ядер и их совокупная площадь значительно снижались (в 1,9 раз и 1,7 раз, соответственно p<0,05). Доля двуядерных гепатоцитов была снижена в 2,2 раза (p<0,05). Снижение количества ядер, изменение их морфометрических данных при одновременном увеличении экспрессии маркерного белка Ki-67 связано с молекулярно-клеточным механизмом действия повышенного уровня гомоцистеина, обуславливающего стресс эндоплазматического ретикулума и ядрышковый стресс, тогда как увеличение экспрессии белка Ki-67 отражает регенеративные возможности клеток печени при гипергомоцистеинемии. **Выводы.** 1. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается снижением большинства морфометрических показателей ядерного аппарата гепатоцитов. 2. Интенсивность экспрессии белка Ki-67 в гепатоцитах при моделируемой форме гипергомоцистеинемии резко возрастает, что отражает возросший регенеративный потенциал клеток.

Ключевые слова: Ki-67, гипергомоцистеинемия, гепатоциты

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

INTENSITY OF Ki-67 PROTEIN EXPRESSION BY LIVER CELLS IN EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN RATS

The **aim** of the study was to determine the expression of the Ki-67 protein in hepatocytes under conditions of experimental hyperhomocysteinemia. **Material and methods.** Immunohistochemical staining was performed on histological sections of the liver of white mongrel rats of the intact group (n=10) and the group with experimental hyperhomocysteinemia (EHHC) (n=15) to detect the expression of the Ki-67 marker (rabbit IgG, 1:200; Cell Marque Corporation, USA), when stained with hematoxylin and eosin, morphometric assessment of hepatocyte nuclei (number, area, diameter) and the proportion of binuclear hepatocytes was performed. **Results and discussion.** It was revealed that in animals with EHHC, the number of cells labeled with Ki-67 increased statistically significantly ($p<0.05$) by 2.6 times, the average luminescence intensity (marker expression) by 1.68 times, and the proliferative index by 4 times. The morphometry of the nuclei showed an increase in the area (by 7.4%, $p>0.05$) and diameter (by 5.7%, $p>0.05$) of the nucleus, the nuclear cytoplasmic index (by 20%, $p<0.05$), while the number of nuclei and their total area significantly decreased (by 1.9 times and 1.7 times, respectively, $p<0.05$). The proportion of binucleated hepatocytes was reduced by 2.2 times ($p<0.05$). A decrease in the number of nuclei, a change in their morphometric data with a simultaneous increase in the expression of the marker protein Ki-67 is associated with the molecular-cellular mechanism of action of an increased level of homocysteine, causing stress of the endoplasmic reticulum and nucleolar stress, whereas an increase in the expression of the protein Ki-67 reflects the regenerative capabilities of liver cells in hyperhomocysteinemia. **Conclusions.** 1. Experimental hyperhomocysteinemia is accompanied by a decrease in most morphometric parameters of the nuclear apparatus of hepatocytes. 2. The intensity of Ki-67 protein expression in hepatocytes in the simulated form of hyperhomocysteinemia increases sharply, which reflects the increased regenerative potential of cells.

Keywords: Ki-67 protein, hyperhomocysteinemia, hepatocytes

Актуальность. Первоначально белок Ki-67 рассматривался большинством исследователей как клинически значимый маркер опухолевых клеток [5]. Недавние работы раскрывают роль Ki-67 в регуляции клеточного цикла в целом, поддержании гетерохроматина, сборке перихромосомного слоя на митотических хромосомах [4, 10, 12]. Так, во время интерфазы Ki-67 необходим для нормального клеточного распределения антигенов гетерохроматина и для ядрышковой ассоциации гетерохроматина [12]. Изменение функционального статуса клетки, выход ее из состояния покоя сопровождаются изменениями в количестве белка, а, следовательно, реорганизацией хроматина, обеспечивающего биогенез рибосом [10, 12], что, в свою очередь, может сопровождаться изменениями в количестве и распределении белка. Печень играет ключевую роль в метаболизме

гомоцистеина [8, 11]. В ряде работ, посвященных морфологической оценке печени в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии, указывается на факт увеличения объема ядер гепатоцитов, увеличение числа двуядерных клеток [1]. Известно, что полиплоидия гепатоцитов является результатом как ядерной полиплоидии (увеличение количества ДНК на ядро), так и клеточной полиплоидии (увеличение количества ядер на клетку) [5].

Цель работы состояла в том, чтобы определить экспрессию белка Ki-67 в гепатоцитах в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Материалы и методы. Работа была проведена на белых крысах *Rattus norvegicus Berk* обоего пола № 37 с массой тела 200-220г. в осенний период (октябрь-ноябрь). Животные были разделены на 3 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, получавшие дополнительно к стандартному питанию мясной фарш (0,15г/100г) без добавок; экспериментальная группа №3 – животные с экспериментальной гипергомоцистеинемией (ЭГГЦ), которую формировали, добавляя в мясной фарш навеску метионина [2].

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). Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава РФ (аппликационный № 656 от 23.04.2019.). 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; Cell Marque Corporation, USA). Для двойного иммунофлуоресцентного окрашивания использовали смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 488 (антикроличьи IgG 1:300; Abcam, USA) и Alexa Fluor 647 (антимышинные IgG 1:300; Abcam, USA). На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином подсчитывали: количество ядер (на 100 мкм²), долю двуядерных клеток (%), площадь (в мкм²) и диаметр (в мкм) ядра; совокупную площадь ядерного материала (на 100 мкм²), рассчитывали ядерно-цитоплазматический индекс. Количество Ki-67-позитивных клеток оценивалось на поле зрения микроскопа 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 Image ProInsite 8.0, Image ProPlus 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 работы.

Морфометрические показатели ядер гепатоцитов экспериментальных животных при стандартной окраске гематоксилином и эозином представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Морфометрические показатели ядер гепатоцитов экспериментальных животных ($M \pm m$)

Параметры ядра	Единицы измерения	Экспериментальные группы		
		Интактные животные	Группа сравнения	Группа с ЭГГЦ
Площадь ядра	мкм ²	51,25 ± 2,24	52,51 ± 4,5	56,68 ± 5,58
Диаметр ядра	мкм	8,65 ± 0,12	8,75 ± 0,18	9,28 ± 0,18
Количество ядер	на площадь 100 мкм ²	520,34 ± 12,6	505,91 ± 30,2	270,55 ± 21,4*
Двухядерные гепатоциты	%	14,6 ± 3,66	12,5 ± 2,52	5,67 ± 0,48*
Совокупная площадь ядер	на 100 мкм ²	27348,32 ± 125,16	26565,31 ± 324,2	15334,77 ± 125,8*
Ядерно-цитоплазматический индекс	уе	0,195 ± 0,10	0,197 ± 0,12	0,236 ± 0,11*

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с интактной группой при $p < 0,05$

ЭГГЦ – экспериментальная гипергомоцистеинемия

При ЭГГЦ увеличивалась площадь (на 7,4%, $p > 0,05$) и диаметр (на 5,7%, $p > 0,05$) ядра, ядерно-цитоплазматический индекс (на 20%, $p < 0,05$). Однако количество ядер (в 1,9 раз, $p < 0,05$) и их совокупная площадь (в 1,7 раз, $p < 0,05$) значимо снижались. Доля двухядерных гепатоцитов была снижена в 2,2 раза ($p < 0,05$). Увеличение ядерно-цитоплазматического индекса и незначительное повышение площади ядра клеток при одновременном снижении совокупной

площади ядерного материала связано с появлением в популяции гепатоцитов, имеющих увеличенную площадь ядра при неизменном объеме цитоплазмы. Подобные гепатоциты не обнаруживались у интактных животных, тогда как при ЭГГЦ они встречались в 12,5%.

Белок Ki-67 В контрольной группе животных был представлен в небольшой части клеток, интенсивность свечения гистохимического продукта оказалась незначительной. Общее количество клеток, экспрессирующих маркер пролиферации, составляло $11,5 \pm 1,11$ шт/мкм² (Таблица 2).

Таблица 2 – Количество клеток и интенсивность экспрессии белка Ki-67 в экспериментальных группах ($M \pm m$)

Параметры	Единицы измерения	Экспериментальные группы		
		Интактный животные	Группа сравнения	Группа с ЭГГЦ
Количество Ki-67	шт/поле зрения	$10,2 \pm 2,50$	$11,5 \pm 1,11$	$30,3 \pm 4,09^*$
Экспрессия маркера	в поле зрения, у.е.	$40,54 \pm 2,16$	$39,85 \pm 1,86$	$67,01 \pm 1,62^*$
Индекс пролиферации	у.е.	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,07^*$

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с интактной группой при $p < 0,05$

ЭГГЦ – экспериментальная гипергомоцистеинемия

У животных с ЭГГЦ статистически значимо ($p < 0,05$) возросло: количество клеток, маркируемых Ki-67, в 2,6 раза, средняя интенсивность свечения (экспрессия маркера) в 1,68 раз, пролиферативный индекс в 4 раза.

Обсуждение. Снижение количества ядер, изменение их морфометрических данных при одновременном увеличении экспрессии маркерного белка Ki-67 вполне укладывается в молекулярно-клеточный механизм действия повышенного уровня гомоцистеина, обуславливающего стресс эндоплазматического ретикулума [15] и ядрышковый стресс [3]. Ключевой особенностью интегрированного стрессового ответа является концепция, согласно которой семейство протеинкиназ фосфорилирует эукариотический иницирующий фактор трансляции (eIF2), подавляя общий синтез белка для сохранения клеточных ресурсов [7]. Угнетение биосинтетических процессов в клетке сопровождается апоптозом клеток, что, в свою очередь, стимулирует регенеративный потенциал для обеспечения стабильности клеточных популяций. Одновременное появление в популяции «крупноядерных» гепатоцитов на фоне снижения общего количества ядерного материала может быть связано с явлением полиплоидизации. Vig P. с соавт., 2006 [13] было показано, что механизмом полиплоидизации гепатоцитов

является эндомитоз, характеризующийся накоплением клеток в премитотическом периоде клеточного цикла и сопровождающийся увеличением объема ядер. При этом оставшиеся гепатоциты сохраняют потенции к пролиферации [9, 14]. Повышенный уровень гомоцистеина в крови, превышение физиологически обоснованной функциональной нагрузки на клетки печени создают условия для стимуляции регенеративного потенциала, что находит отражение в увеличении Ki-67-положительных гепатоцитов и интенсивности экспрессии иммуногистохимического продукта в них.

Выводы. 1. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается снижением большинства морфометрических показателей ядерного аппарата гепатоцитов. 2. Интенсивность экспрессии белка Ki-67 в гепатоцитах при моделируемой форме гипергомоцистеинемии резко возрастает, что отражает возросший регенеративный потенциал клеток.

Список литературы

1. Новгородская Я.И., Кравчук Р.И., Островская О.Б., Курбат М.Н. Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии // Гепатология и гастроэнтерология. 2019. № 1. С. 93-98.
2. . Пазиненко К.А., Чучкова Н.Н., Сметанина М.В. и др. Динамика биохимических и цитологических показателей крови крыс при моделировании хронической алиментарной метионин-обусловленной гомоцистеинемии // Биомедицина. 2021. Т.17, № 2. С. 46-57.
3. Чучкова Н.Н., Пазиненко К.А., Сметанина М.В., Кормилина Н.В. Ядерно-ядрышковые взаимоотношения и нуклеолярный стресс в гепатоцитах при гипергомоцистеинемии // Гены и Клетки. 2021. Т. 16, № 1. С. 37-42.
4. Cuylen S., Blaukopf C., Politi A.Z., Müller-Reichert T. [et al.]. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes // Nature. 2016. Vol. 535, № 7611. P. 308-312.
5. Donne R., Saroul-Aïnama M., Cordier P., Celton-Morizur S., Desdouets C. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020. Vol.17, № 7. P. 391-405.
6. Dowsett M., Nielsen T.O., A'Hern R. International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group // J Natl Cancer Inst. 2011. Vol. 103, № 22. P. 1656-1664.
7. Jonsson W.O., Margolies N.S., Anthony T.G. Dietary sulfur amino acid restriction and the integrated stress response: Mechanistic Insights // Nutrients. 2019. № 11. P.1349.
8. Pacana T., Cazanave S., Verdianelli A., 2015 Pacana T, Cazanave S, Verdianelli A. Dysregulated Hepatic Methionine Metabolism Drives Homocysteine Elevation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease // PLoS One. 2015. Vol.10, №8. P. e0136822.

9. Patterson M., Swift S.K. Residual Diploidy in Polyploid Tissues: A Cellular State with Enhanced Proliferative Capacity for Tissue Regeneration // *Stem. Cells Dev.* 2019. Vol. 28, № 23. P. 1527-1539.
10. Sobiecki M., Mrouj K., Colinge J., Gerbe F. [et al.]. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels *Cancer Res.* Vol. 77, №10. P. 2722-2734.
11. Stead L.M., Brosnan M.E., Brosnan J.T. Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver // *Biochem. J.* 2000. Vol. 350, Pt 3, № Pt 3. P. 685-692. PMID: 10970780.
12. Sun X., Kaufman P.D. Ki-67: more than a proliferation marker // *Chromosoma.* 2018. Vol. 127. № 2. P. 175-186.
13. Vig P., Russo F.P., Edwards R.J. The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice // *Hepatology.* 2006. Vol. 43, № 2. P. 316-324.
14. Wilkinson P.D., Alencastro F., Delgado E.R. Polyploid hepatocytes facilitate adaptation and regeneration to chronic liver injury // *Am. J. Pathol.* 2019. Vol. 189, № 6. P. 1241-1255.
15. Wu X., Zhang L., Miao Y. Homocysteine causes vascular endothelial dysfunction by disrupting endoplasmic reticulum redox homeostasis // *Redox Biol.* 2019. № 20. P.46-59.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Контактная информация и сведения об авторах

Чучкова Наталья Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой медицинской биологии, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск, Россия* email: mig05@inbox.ru

Пазиненко Ксения Андреевна, ассистент кафедры медицинской биологии, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск, Россия, адрес электронной почты k.pazinenko@yandex.ru

Сметанина Марина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры медицинской биологии, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск, Россия, адрес электронной почты lisenok0910@rambler.ru

Пазиненко Олег Алексеевич, студент 5 курса, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск, Россия, адрес электронной почты pazinenko.dima@yandex.ru

Чучков Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, профессор кафедры физиологии, клеточной биологии и биотехнологии, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

Информация о вкладе каждого автора

Чучкова Н.Н. – концепция, анализ данных, написание статьи

Пазиненко К.А. – сбор материала, статистическая обработка

Сметанина М.В. – сбор и анализ полученных данных

Пазиненко О.А. – сбор данных, работа с животными

Чучков В.М. – дизайн исследования