

ОСОБЕННОСТИ РЕОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА ЯДЕР И ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ГЕПАТОЦИТОВ ПЕЧЕНИ РЫБ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОЙ ВНЕШНЕЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Антонова Е.И., Мкртчян О.З., Калининко Н.А., Омарова Д.И., Хамитова Л.Е., Шпак О.Ю.

Омский государственный педагогический университет, кафедра биологии, 644099, г. Омск, набережная Тухачевского, 14, antonov_67@mail.ru

Воздействие высокой внешней температуры на организм рыб вида *Carassius auratus gibelio* вызывает на клеточном уровне неспецифическую реакцию, что отражает проявления раннего этапа репаративной регенерации, которая осуществляется посредством реорганизации структуры хроматина в ядрах гепатоцитов. При этом увеличивается интегральная и оптическая плотность конденсированного хроматина и уменьшается площадь распределения деконденсированного хроматина. Вследствие этого увеличиваются показатели средней оптической плотности гетерохроматина, что определяет уменьшение общей площади ядер гепатоцитов. Выявленная конденсация/деконденсация хроматина ядер гепатоцитов является ключевым параметром, который приспосабливает размер генома к метаболической интенсивности организма. Данные цитофотометрические показатели отражают снижение соотношения «пролиферирующие/гиподиплоидные» гепатоциты за счет увеличения количества гиподиплоидных и снижения количества гепатоцитов в G₂-M-стадию.

Ключевые слова: печень, гепатоциты, перегревание, рыбы, ядро, эухроматин, гетерохроматин.

FEATURES OF REORGANIZATION AND INDICATORS CHROMATIN NUCLEAR CELL CYCLE FISH LIVER HEPATOCYTES AFTER EXPOSURE TO HIGH AMBIENT TEMPERATURE

Antonova E.I., Mkrтчян O.Z., Kalinenko N.A., Omarova D.I., Hamitova L.E., Shpak O.Y.

Omsk State Pedagogical University, Department of Biology, 14 Naberezhnaya Tukhachevskogo, 644099, Omsk, Russia, e-mail: antonov_67@mail.ru

Impact of high external temperature on an organism of fishes of a type of *Carassius auratus gibelio* causes nonspecific reaction that reflects manifestations of an early stage of reparative regeneration which is carried out by means of structure reorganization of chromatin in kernels of hepatocytes at cellular level. The integrated and optical density of condensed chromatin thus increases and the area of distribution of decondensed chromatin decreases. So, in a consequence of it, indicators of average optical density of heterochromatin increase that defines reduction of total area of kernels of hepatocytes. The revealed condensation / decondensation of chromatin in kernels of hepatocytes are key parameters which adapt the size of a genome for metabolic intensity of an organism. These cytophotometric indicators reflect about the ratios «proliferating / hypodiploidic» hepatocytes, at the expense of increase in quantity of hypodiploidic and decrease in quantity of hepatocytes in G₂ - a M-stage.

Keywords: a liver, hepatocytes, overheating, compensatory-adaptive reaction, fishes, oxidoreductase, caspase-3, programmed cell death.

Введение

Астатичность температуры окружающей среды обитания – один из экологических факторов, который определяет выживаемость, формирование и изменение показателей нормы реакции, темпов роста и развития организмов, интенсивность обмена веществ. Астатичность для гидробионтов усугубляется их постоянным перемещением в термоградиентном поле и является экологической нормой существования, обеспечивает реализацию потребности организмов в температурном разнообразии колебательных режимов, т.к. статичность условий

обитания определяет снижение эффективности аккумуляции энергии и окисления органических веществ [3; 4]. Нередко перегревание организма может происходить и в естественных условиях обитания. Особенно актуальным становится изучение этого вопроса в свете глобального потепления климата. По этой причине экспериментальное изучение влияния высокой температуры на организм имеет адекватную физиологическую (климато-географическая миграция, условия высокотемпературных технологий) и клиническую актуальность. При этом особое значение приобретает состояние органов, непосредственно участвующих в поддержании гомеостаза организма. Одним из таких органов является печень. Сложность структуры, полифункциональность, быстрота вовлечения в патологические и компенсаторно-приспособительные процессы – все это определяет неослабевающий интерес исследователей к проблемам регенерации печени: источники, масштабы, механизмы. Учитывая, что действие высокой температуры определяет состояние функционального напряжения организма, именно первичные реакции, возникающие непосредственно после перегревания, требуют исследования таких компенсаторно-приспособительных реакций, которые отражают мобилизацию в короткий срок динамичных, срочно возникающих, реализуемых в неадекватных условиях среды биологических потенциалов печени рыб.

Вызываемый температурным фактором каскад структурно-функциональных компенсаций на фоне развития как деструктивных, так и репаративных процессов метаболической модуляции и пролиферативной активности во многом обеспечивается реорганизацией хроматина [1; 9; 10].

В связи с этим **целью** нашего исследования явилось выявить характерные проявления раннего этапа репаративной регенерации в период неспецифической реакции на субклеточном уровне печени рыб вида *Carassius auratus gibelio* Bloch, 1782 (карась серебряный).

Материал и методы исследования. Перегревание проводили при температуре 32 °С в условиях свободного плавания в термоградиентном лотке с дополнительной аэрацией в течение 30 минут, что определяло развитие теплового удара средней тяжести [8]. Эксперимент поставлен на 30 животных (15 служили контролем).

После перегревания на отпечатках печени методом оптико-структурного анализа (ОСА) ДНК определяли долю гепатоцитов по фазам клеточного цикла – G₀, S, G₂+M, гиподиплоидные. Мазки печени окрашивали по Фельгену в модификации G. Olson, в реактиве Шиффа. На препаратах определяли состояние обеих фракций хроматина (F – конденсированного, D – деконденсированного): интегральную плотность – (DI, FI), общую интегральную плотность (TI), площадь распределения (DP, FP), площадь ядра (TP),

оптическую плотность (DM, FM), среднюю оптическую плотность (T_SR), периметр (DL, FL), коэффициент округлости хроматина (DK, FK). Количество ДНК было измерено в 200 ядрах (одноядерные) [2]. Фотографирование и обработка препаратов проводилась на автоматизированном морфометрическом комплексе Axioplan (Carl Zeiss, Германия).

Статистическую обработку полученного материала осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6. Различия между независимыми выборками определяли с помощью критерия Стьюдента (t), значимыми считались различия при $P \leq 0,05$ [5]. Для выявления степени сопряженности исследуемых показателей использовался многофакторный дисперсный анализ MANOVA (Multivariate ANalysis Of VAriance) n-way analysis of variance.

Результаты исследования и их обсуждение

У интактных животных выявлены видовые особенности в количестве, топографии хроматина гепатоцитов. Так, распределение хроматина представлено: мелкозернистыми фракциями с равномерным распределением по всей площади ядра; сетчато-крупноглыбчатыми зонами, локализованными либо в центре ядра, либо диффузно и в области ядерной ламины; пикнотичными ядрами (сверхкомпактизация).

Согласно оптико-структурному цитофотометрическому анализу параметров Фельген - позитивного ДНК хроматина гепатоцитов у интактных животных DL хроматина на 8,6% превышает FL, а DK выше у конденсированного (61,4 и 38,6% соответственно). Пространственно-топографически в ядре деконденсированный хроматин имеет большую площадь распределения (69,7 и 30,3% соответственно), следовательно, и большую интегральную оптическую плотность (55,8 и 44,2% соответственно). Средняя оптическая плотность как показатель уровня конденсации выше у ДНК гетерохроматина (63,6%) в сравнении с ДНК эухроматина (36,4%). Согласно частотному анализу, проводимому по общей интегральной и оптической плотности хроматина, выявлено, что 92% гепатоцитов находятся в G₀-G₁ стадии клеточного цикла (2n2c); 6,5% – в S стадии (2n4c); 0,8% – в конечной стадии дифференцировки – гиподиплоидные гепатоциты; 0,7% – в G₂-M стадии (рис. 1, 2).

Анализ соотношения «митотической активности/количества гиподиплоидных гепатоцитов» интактных животных (G₂-M/D) выявил, что количество митотически делящихся гепатоцитов меньше, чем гиподиплоидных. Соотношение «полиплоидизации/пролиферации» (S/G₂-M) таково, что из гепатоцитов, находящихся в S-стадии, только 10% гепатоцитов вступают в G₂-M-стадию.

После перегревания интегральная плотность деконденсированного хроматина не проявляет значимых отличий от контрольных показателей. Интегральная плотность гетерохроматина увеличиваются на 11% и общая интегральная плотность на 6%. В связи с

этим отмечается уменьшение площади распределения эу- и гетерохроматина на 12 и 5% соответственно. Вследствие увеличения показателей средней оптической плотности конденсированного и деконденсированного хроматина на 12,5 и 11% соответственно уменьшается общая площадь ядер на 9%.

Известно, что тепловая пластичность проявляется в наличии биофизических ограничений – размер ядер гепатоцитов. Увеличение в эволюции размера генома, соответственно, увеличение объема ядер, вовлечено в регулирование метаболизма клетки, с параллельным замедлением жизненного цикла, морфогенеза, устойчивостью к гипоксии, это обеспечивает реализацию более разнообразных метаболических путей при адаптации к изменениям температуры [6; 7]. Это подтверждается выбором различных стратегий метаболической адаптации у животных с большим размером генома – *Carassius auratus gibelio*. В свою очередь увеличение размера генома по пути полиплоидизации связано с энергетической емкостью клетки, с первичной устойчивостью, способностью к репарации, увеличению биоэлектрического заряда ядра с изменением физического состояния таких крупномасштабных структур, как хроматин.

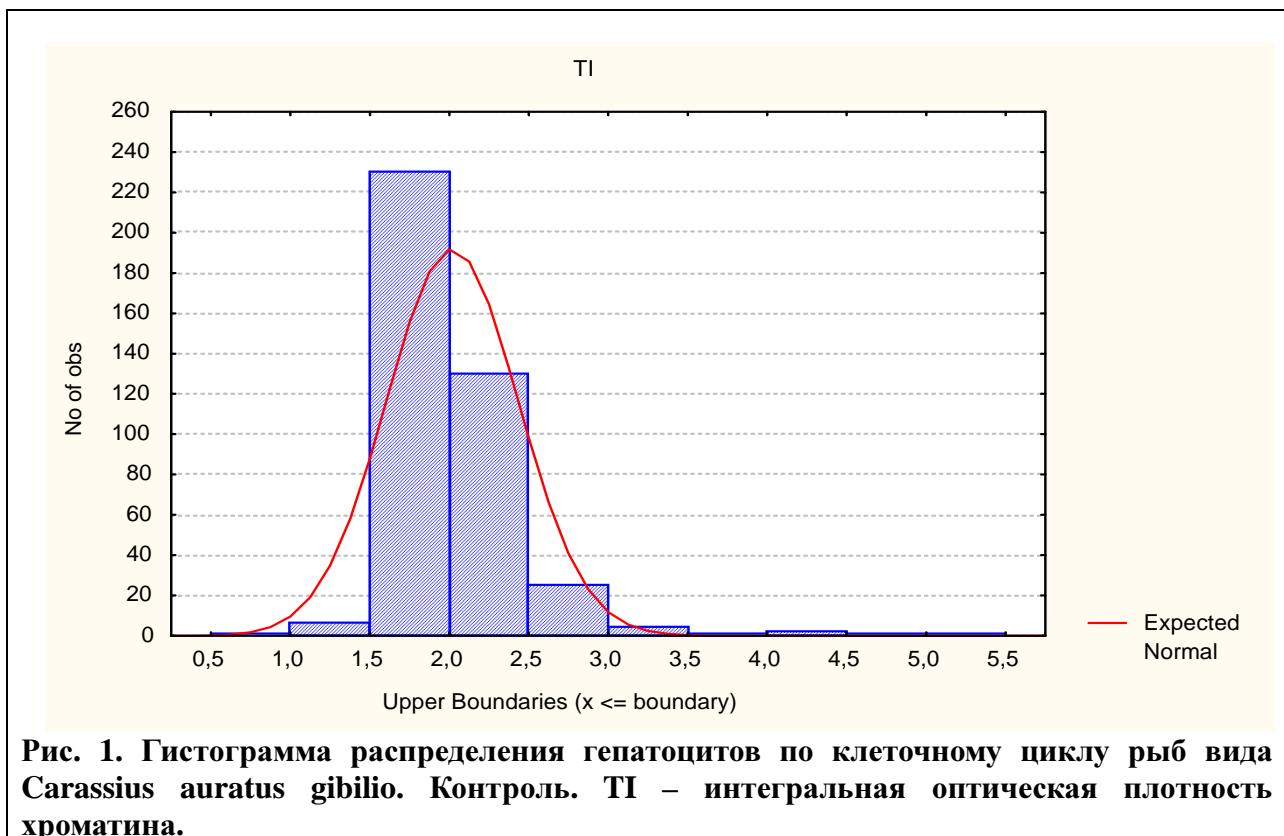


Рис. 1. Гистограмма распределения гепатоцитов по клеточному циклу рыб вида *Carassius auratus gibelio*. Контроль. TI – интегральная оптическая плотность хроматина.

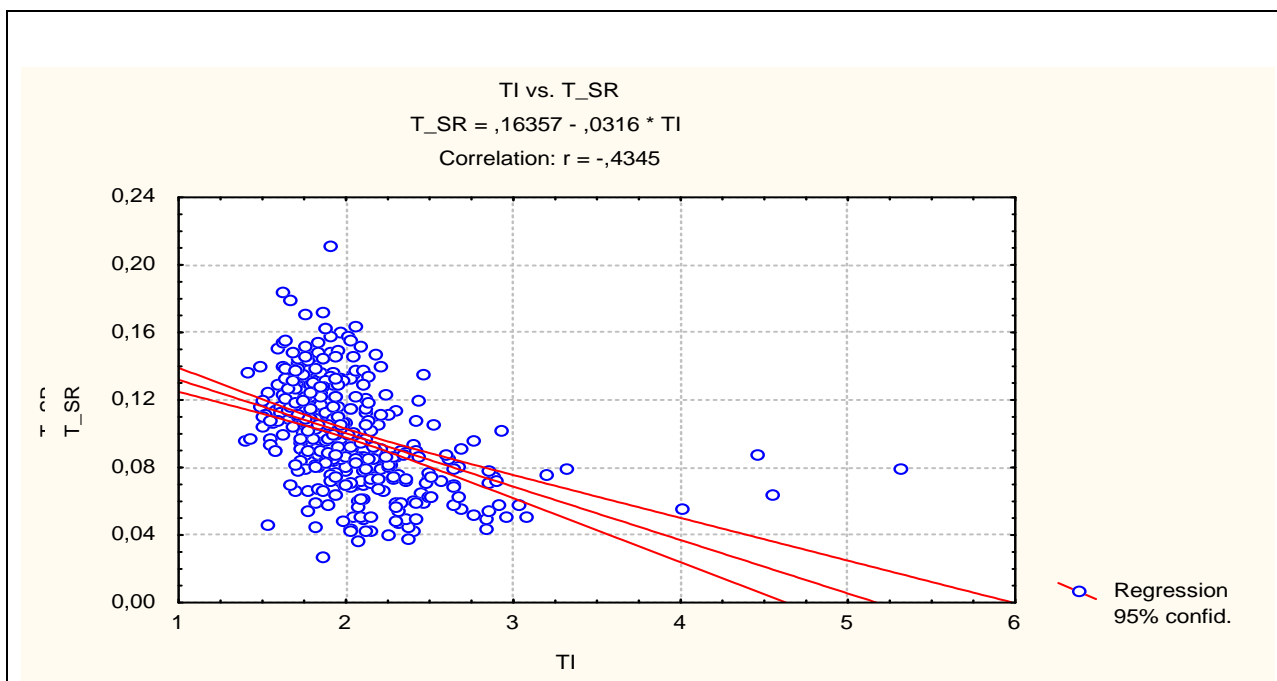


Рис. 2. Двумерное распределение ядер по TI – интегральной оптической плотности ДНК и T_RS – средней оптической плотности ДНК гепатоцитов рыб вида *Carassius auratus gibelio*. Контроль. Многофакторный дисперсный анализ MANOVA.

Выявленная конденсация/деконденсация хроматина ядер гепатоцитов и изменение ядерного размера являются ключевыми параметрами, которые приспособливают размер генома к метаболической интенсивности организма [9].

После перегревания уменьшается количество гепатоцитов в G₂-M-стадии, увеличивается количество гиподиплоидных гепатоцитов и гепатоцитов в S-стадии клеточного цикла. При этом проявляется снижение соотношения количества пролиферирующих и гиподиплоидных гепатоцитов (G₂-M/D).

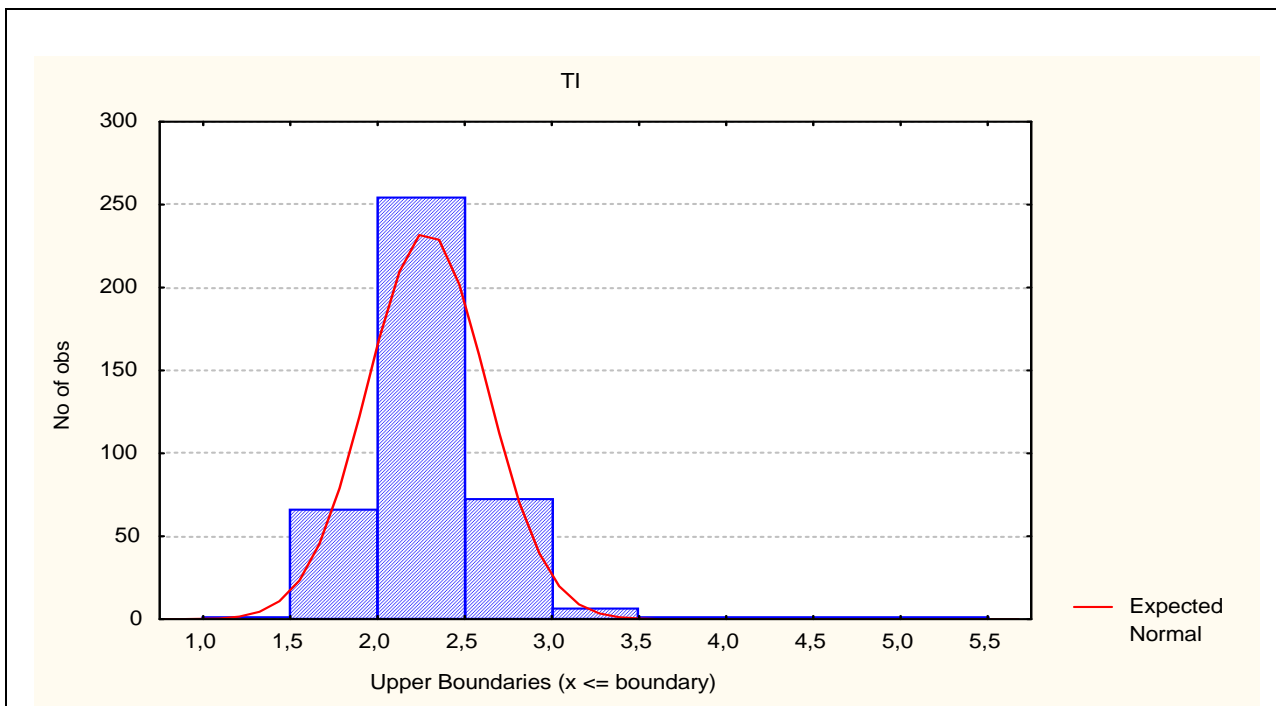


Рис. 3. Гистограмма распределения популяции гепатоцитов по клеточному циклу рыб вида *Carassius auratus gibelio*. Перегревание. TI – интегральная оптическая плотность хроматина.

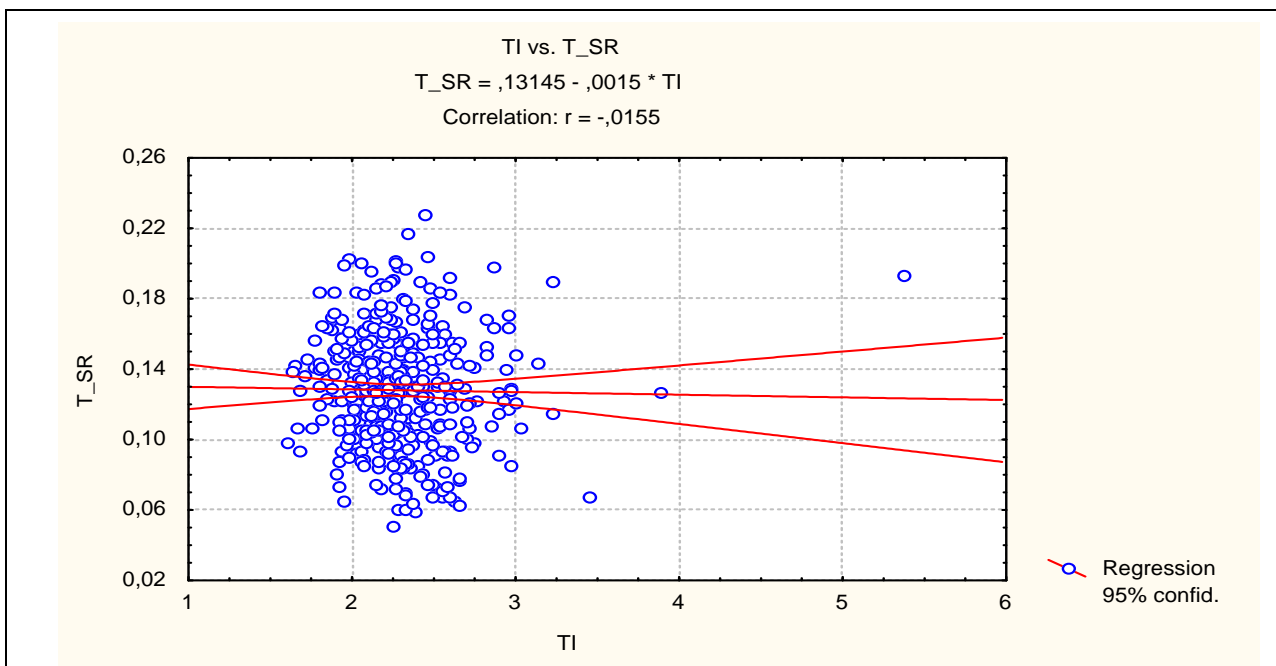


Рис. 4. Двумерное распределение ядер по TI – интегральной оптической плотности ДНК и T_RS – средней оптической плотности ДНК гепатоцитов рыб вида *Carassius auratus gibelio*. Перегревание. Многофакторный дисперсный анализ MANOVA.

Таким образом, структура хроматина ядер проявляет адаптивную реорганизацию в соответствии с потребностями в синтезе РНК и белка, обеспечивая, таким образом, согласование между уровнем транскрипции и трансляции.

На основании полученных данных можно сделать **заключение** о том, что в период

неспецифической реакции на клеточном уровне печени рыб проявления раннего этапа репаративной регенерации осуществляются посредством реорганизации хроматина и увеличения количества гиподиплоидных гепатоцитов и гепатоцитов в S-стадию клеточного цикла.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Пloidометрическая диагностика функционального состояния гепатоцитов в области воздействия плазменного луча / Г.Г. Автандилов, М.Д. Байрамкулов // Научн.-практ. журн. для клиницистов. – 2004. – № 1. – С. 2-6.
2. Козинец Г.И. Клетки крови. Современные технологии их анализа / Г.И. Козинец [и др.]. – М. : Триада-Фарм, 2002. – 171 с.
3. Константинов А.С. Влияние колебаний абиотических факторов на метаболизм некоторых гидробионтов / А.С. Константинов, В.Я. Пушкарь, О.В. Аверьянова // Изв. АН. Сер. Биология. – 2003. – № 6. – С. 728-734.
4. Константинов А.С. Энергобюджет молоди осетровых в постоянном, переменном терморегимах и при свободном плавании в термоградиентном пространстве / А.С. Константинов [и др.] // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. – 2004. – № 1. – С. 38-43.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М. : МедиаСфера, 2002. – 305 с.
6. Шахбазов В.Г. Экологическая и биофизическая генетика : избр. тр. – Харьков : Штрих, 2001. – 436 с.
7. Cavalier-Smith T. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion // *Ann. Bot. (Lond)*. – 2005. – Vol. 95. – № 1. – P. 147-75.
8. Chang Y.-M. Thermal acclimation of metabolic rate may be seasonally dependent in the subtropical anuran latouches frog (*Rana latouchii*, Boulenger) [Text] / Y.-M. Chang, P.-C. L. Hou // *Physiological and Biochemical Zoology*. – 2005. – Vol. 78. – № 6. – P. 947-955.
9. Chubb J.R. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells / J. R. Chubb, S. Boyle, P. Perry, W.A. Bickmore // *Curr. Biol*. – 2002. – Vol. 12. – P. 439-445.
10. Douglas R.M. Genetic Models in Applied Physiology Invited Review: Effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest / R.M. Douglas, G.G. Haddad // *J. Appl Physiol*. – 2003. – Vol. 94. – P. 2068-2083.

Рецензенты

Григорьев А.И., д.б.н., профессор кафедры экологии и природопользования ОмГПУ, г. Омск.
Богданов И.И., д.б.н., профессор кафедры экологии и природопользования ОмГПУ, г. Омск.