

Rykalo N. A., Mordvinova O. M., Vasilets Y. O. Features cell cycle rat hepatocytes under the experimental hypothyroidism and hyperthyroidism. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(3):614-622. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.571223>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4444>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).  
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author(s) 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 27.03.2017. Revised 28.03.2017. Accepted: 29.03.2017.

## FEATURES CELL CYCLE RAT HEPATOCYTES UNDER THE EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM AND HYPERTHYROIDISM

N. A. Rykalo, O. M. Mordvinova, Y. O. Vasilets

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya

### Abstract

Thyroid hormones are necessary for normal development, growth and functioning of organs. The experiment investigated the changing phases of the cell cycle of liver cells in rats under simulated hypothyroidism and hyperthyroidism. The experiment was conducted on 40 white laboratory rats with body mass 120-150g. The animals were divided into groups: №1 - 15 animals - model hypothyroidism, administration Merkazolil 10 mg / kg, №2 - 15 animals - model hyperthyroidism due to introduction of the L-thyroxine 200 mg / kg. Drugs were administered intragastric with 1% starch slurry once a day. Group №3, control - 10 rats were injected only solvent. After the withdrawal of animals from the experiment by decapitation under ketamine anesthesia, part of the liver size 1x1 cm was removed from same location. Cytofluorometric analysis was conducted on the multifunctional research flow cytometer "PartecPAS" company Partec (Germany) SIC VNMU named after Pirogov.

In experimental hypothyroidism significant increase of the number of cells in a state of apoptosis and reduced proliferation activity was observed compared to controls. In experimental hyperthyroidism growing number of nuclei of cells in a state of apoptosis and increased proliferation activity was observed compared to controls, this indicates activation of reparative regeneration processes.

**Keywords: hyperthyroidism, hypothyroidism, apoptosis, cell cycle.**

## **ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПОТИРЕОЗА И ГИПЕРТИРЕОЗА**

**Н. А. Рыкало, Е. М. Мордвинова, Ю. А. Василец**

**Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова**

### **Реферат**

Гормоны щитовидной железы необходимы для нормального развития, роста и функционирования органов. В эксперименте исследовали изменения фаз клеточного цикла клеток печени у крыс в условиях моделируемого гипотиреоза и гипертиреоза. Эксперимент проведен на 40 белых лабораторных крысах, с массой тела 120-150г. Животных разделили на группы: №1 - 15 животных - модель гипотиреоза введением препарата Мерказолил 10 мг / кг, №2 - 15 животных - модель гипертиреоза введением препарата L-тироксин 200 мкг / кг. Препараты вводили интрагастрально на 1% суспензии крахмала 1р. / сут. Группа №3, контроль - 10 крыс, вводили только растворитель. После вывода животных из эксперимента путем декапитации под кетаминным наркозом, у них изымали часть печени размером 1x1 см с одного места. Цитофлуориметрический анализ проводился на многофункциональном научно-исследовательском проточном цитометре "PartecPAS" фирмы Partec (Германия) в НИЦ ВНМУ им. Н. И. Пирогова.

При экспериментальном гипотиреозе наблюдается достоверное возрастание количества клеток, находящихся в состоянии апоптоза и снижается пролиферативная активность по сравнению с контролем. При экспериментальном гипертиреозе наблюдается рост количества ядер клеток, находящихся в состоянии апоптоза и увеличивается пролиферативная активность по сравнению с контролем, что указывает на активацию процессов репаративной регенерации.

**Ключевые слова: гипертиреоз, гипотиреоз, апоптоз, клеточный цикл.**

# ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГІПОТИРЕОЗУ ТА ГІПЕРТИРЕОЗУ

Н. А. Рикало, О. М. Мордвінова, Ю. О. Василюк

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова  
кафедра патофізіології, вул. Пирогова, 56, Вінниця, Вінницька область, 21000

## Реферат

Гормони щитоподібної залози необхідні для нормального розвитку, зростання і функціонування органів. В експерименті досліджували зміни фаз клітинного циклу клітин печінки у щурів за умов модельованого гіпотиреозу та гіпертиреозу. Експеримент проведено на 40 білих лабораторних щурах, з масою тіла 120-150г. Тварин розділили на групи: №1 - 15 тварин - модель гіпотиреозу введенням препарату Мерказоліл 10 мг/кг, №2 - 15 тварин - модель гіпертиреозу введенням препарату L-тироксин 200 мкг/кг. Препарати вводили інтрагастрально на 1% суспензії крохмалю 1р/добу. Група №3, контроль - 10 щурів, вводили лише розчинник. Після виведення тварин з експерименту шляхом декапітації під кетаміновим наркозом, у них вилучали частину печінки розміром 1x1 см з одного місця. Цитофлуориметричний аналіз проводився на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "PartecPAS" фірми Partec (Німеччина) у НДЦ ВНМУ ім. М. І. Пирогова.

При експериментальному гіпотиреозі спостерігається вірогідне зростання кількості клітин, що знаходяться в стані апоптозу та знижується проліферативна активність порівняно з контролем. При експериментальному гіпертиреозі спостерігається зростання кількості ядер клітин, що знаходяться в стані апоптозу та збільшується проліферативна активність порівняно з контролем, що вказує на активацію процесів репаративної регенерації.

**Ключові слова:** гіпертиреоз, гіпотиреоз, апоптоз, клітинний цикл.

## Вступ

При порушенні функціональної активності щитоподібної залози спостерігаються певні зміни структури та функціональної активності ряду тиреоїдзалежних органів, у тому числі і печінки. Гормони щитоподібної залози тироксин і трийодтиронін необхідні для нормального розвитку, зростання і функціонування органів. Вони регулюють

рівень базального метаболізму всіх клітин, включаючи гепатоцити, що позначається на функціонуванні печінки, а печінка, в свою чергу, метаболізуючи тиреоїдні гормони, регулює їх системні ендокринні ефекти. Порушення функцій щитовидної залози можуть призводити до змін функцій печінки, а при захворюваннях печінки можуть виникати відхилення в метаболізмі тиреоїдних гормонів [6, 7]. Згідно аналізу офіційних статистичних даних, патологія ендокринної системи посідає одне з провідних місць у структурі загальної захворюваності населення. Поширеність гіпотиреозу серед дорослого населення постійно становить 22,1 на 100 000, а гіпертиреозу 80 випадків на кожні 100 тисяч населення [3, 4].

Встановлено, що в переважній більшості випадків хронічного ураження печінки основним механізмом загибелі клітин є апоптоз [2]. Даний процес є нормальним і абсолютно необхідним біохімічним механізмом і як фізіологічний процес, носить захисний характер. У фізіологічному сенсі апоптоз є запрограмованою загибеллю клітини у відповідь на зовнішні або внутрішні сигнали. 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 [8, 9].

Для вимірювання характеристик клітин, їх органел та процесів, які у них відбуваються, використовують проточну цитометрію. Цей метод дозволяє досліджувати дисперсні середовища в режимі поштучного аналізу елементів дисперсної фази за сигналами світлорозсіювання та флуорисценції [1, 5]. У зв'язку з тим, що для проведення цитофлуориметричного аналізу необхідна тканина печінки – це ускладнює виконання даного дослідження. Тому для перевірки змін, дослідження було проведене на тваринах.

**Мета.** Дослідити зміни фаз клітинного циклу клітин печінки у щурів за умов експериментального гіпотиреозу та гіпертиреозу.

### **Матеріали та методи**

Дослідження проведені на 40 білих лабораторних щурах, з масою тіла 120-150г. Експерименти на тваринах здійснювали у відповідності до “Правил проведення робіт з використанням лабораторних тварин” (1977), “Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей” (Страсбург, 1986), Директиви ЄЕС №609 (1986) та наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. “Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин”. При виконанні експериментальних

досліджень дотримувалися рекомендацій О. В. Стефанова (2001). Група №1 складала 15 тварин - модель гіпотиреозу введенням препарату Мерказоліл (ТОВ "Здоров'я") 10 мг/кг (Чугунова Л.Г. та співавт., 1997, патент №2165648 ). Група №2, 15 тварин - модель гіпертиреозу введенням препарату L-тироксин (Берлін-Хемі) 200 мкг/кг (Айвазова А.С. та співавт., 2007, №2007143562/14). Препарати вводили інтрагастрально на 1% суспензії крохмалю 1р/добу. Група №3, контроль - 10 щурів, вводили лише розчинник. Виводили тварин з експерименту шляхом декапітації під кетаміновим наркозом. Частину печінки щурів розміром 1x1 см негайно вилучали з одного місця у всіх досліджуваних тварин. Суспензії ядер з клітин печінки одержували за допомогою набору «CyStainDNA» фірми «Partec» (Німеччина) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Цитофлуориметричний аналіз проводився на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі «PartecPAS» фірми Partec (Німеччина) у НДЦ ВНМУ ім. М. І. Пирогова.

При циклічному аналізі клітин визначали:  $G_0G_1$  - відсоткове співвідношення клітин фази  $G_0G_1$  до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2с); S - відсоткове співвідношення фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2с та < 4с.);  $G_2+M$  - відсоткове співвідношення фази  $G_2+M$  до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4с); IP - індекс проліферації, який визначається за сумою показників S+ $G_2+M$ . Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB- $G_0G_1$  ділянки на ДНК-гістограмах - RN<sub>2</sub> перед піком  $G_0G_1$ , яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2с. Статистичний аналіз отриманих даних було проведено з використанням програми Statistica 6.1 (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний номер BXR901E246022FA) з використанням непараметричних методів дослідження в залежності від розподілу отриманих даних.

**Результати:** При дослідженні ДНК-ядер гепатоцитів контрольної групи тварин встановлено, що кількість ядер, перебуваючих в стані апоптозу (ділянка sub- $G_0G_1$ ), складала  $6,43 \pm 0,72\%$ , інтервал  $G_0G_1$  -  $73,04 \pm 2,71\%$ , S фаза -  $0,86 \pm 0,07\%$ ,  $G_2+M$  -  $26,10 \pm 2,72\%$ . Індекс проліферації (IP) становив  $26,96 \pm 2,71\%$ .

У тварин з гіпотиреозом виявили, що вірогідно ( $p < 0,05$ ) збільшується на 12% кількість ядер клітин в стані апоптозу, на 2% збільшується кількість ядер в  $G_0G_1$  інтервалі, знижуються на 12% кількість ядер у S та на 5,5% у  $G+M$  фазі та IP на 5,5%, порівняно з групою контролю відповідно. Тобто вірогідно ( $p < 0,05$ ) збільшується кількість ядер перебуваючих в стані апоптозу (sub- $G_0G_1$ ), збільшується кількість ядер в  $G_0G_1$  інтервалі, знижується кількість ядер, що знаходяться у S та  $G+M$  фазі та індекс

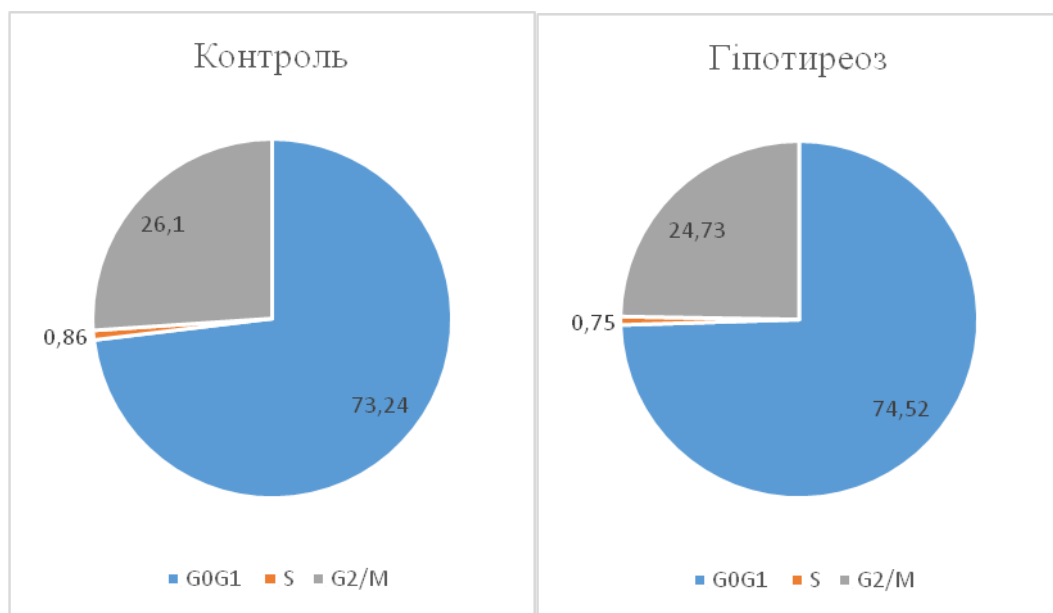
проліферації. Зниження рівня тиреоїдних гормонів перешкоджає процесам репарації, як результат знижується репарація і проліферація, так як гормони впливають на початковий етап синтезу пуринів і піримідинів.

**Таблиця 1**

**Показники клітинного циклу гепатоцитів у дослідних групах**

Показник	Група тварин		
	Інтактні	Гіпотиреоз	Гіпертиреоз
G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	73,04±2,71	74,52±2,27	70,12±2,30**
S	0,86±0,07	0,75±0,18	1,56±0,22**
G <sub>2</sub> /M	26,10±2,7	24,73±2,24	28,33±2,30*
Sub-G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	6,43±0,72	7,22±0,73*	8,54±0,25**
IP	26,96±2,71	25,48±2,27	29,88±2,30**
BP	0,03±0,01	0,03±0,01	0,06±0,01**

Примітка. \* – достовірна відмінність у порівнянні з контрольною групою (\* – p<0,05, \*\* – p<0,01);

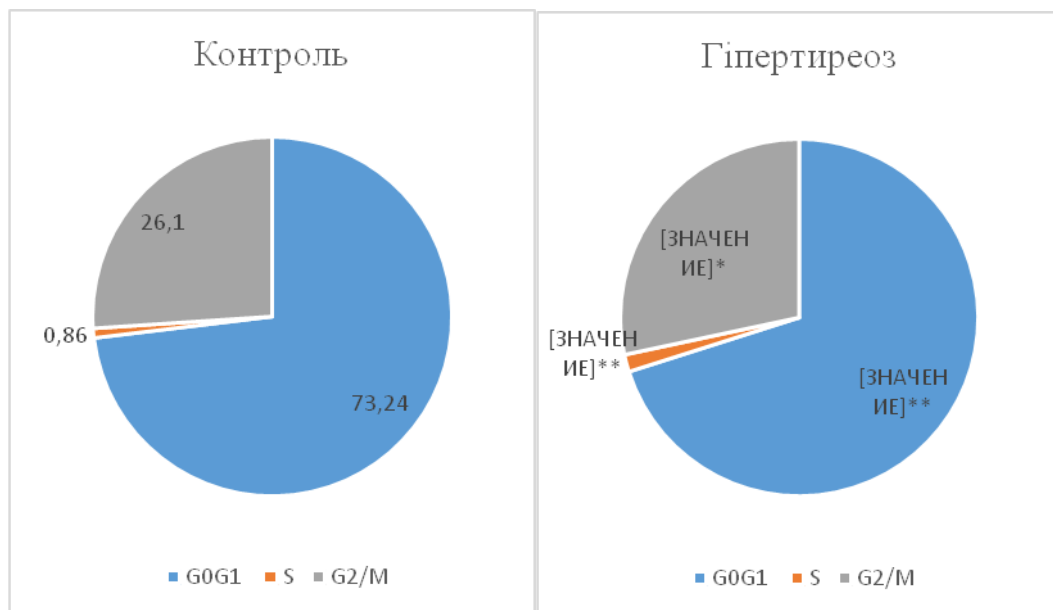


**Рис. 1. Показники клітинного циклу гепатоцитів у контрольній групі та моделі гіпотиреозу**

При дослідженні ДНК-ядер гепатоцитів тварин з гіпертиреозом встановлено, що достовірно (p<0,01) збільшується на 33% кількість ядер клітин в стані апоптозу,

зменшується на 4% кількість ядер в G0G1 інтервалі та збільшуються на 81% кількість ядер у S та на 8,5% вірогідно ( $p < 0,05$ ) у G+M фазі і достовірно ( $p < 0,01$ ) зростає на 11% IP. Тобто спостерігається зростання кількості ядер клітин, що знаходяться в стані апоптозу та збільшується проліферативна активність порівняно з контролем.

Внаслідок надлишку тиреоїдних гормонів переважає катаболізм білків та ліпідів, що викликає альтерацію і збільшення кількості субдиплоїдних ядер. Також в результаті виснаження пулу глутатіону виникає оксидативний стрес, що посилює апоптоз. Передбачається існування такого ланцюжка подій: генерація супероксиданіону → пошкодження ДНК → зниження пулу глутатіону → збільшення вмісту супероксиданіону → пошкодження мембрани → розпад органели → вихід в цитоплазму цитохрому C, який індукує апоптоз → апоптоз. Пошкодження білків викликає збільшення продукції оксидантів - розкручується так зване «замкнене коло». Надлишок  $H_2O_2$  призводить до зупинки клітинного циклу, зниження кількості мітохондрій. Збільшення рівня тиреоїдних гормонів посилює ці процеси.



**Рис. 2. Показники клітинного циклу гепатоцитів у контрольній групі та моделі гіпертиреозу**

Примітка. \* – достовірна відмінність у порівнянні з контрольною групою (\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ );

## **Висновки:**

1. Таким чином, при експериментальному гіпотиреозі спостерігається вірогідне зростання кількості клітин, що знаходяться в стані апоптозу та знижується проліферативна активність порівняно з контролем, про що свідчить зниження кількості ядер у S та G+M фазах і індексу проліферації.

2. При експериментальному гіпертиреозі спостерігається зростання кількості ядер клітин, що знаходяться в стані апоптозу та збільшується проліферативна активність порівняно з контролем, що вказує на активацію процесів репаративної регенерації. Також відмічається більш виражене пошкодження клітин, про що свідчить більший відсоток ядер клітин що знаходяться в стані апоптозу.

## **Reference**

1. Zaleskyj V.N. Molekuljarnaja dyagnostyka: lazernaja skanyrujushhaja y protochnaja cytometryja v yssledovanuu apoptoza [Molecular diagnostics: laser scanning and flow cytometry in the study of apoptosis] *Ukrajinskyj medychnyj chasopys*, 2010; 4:27 (in Ukrainian)

2. Zaleskiy V.N. Mekhanizmy apoptoza pri zabolevaniyakh pecheni (obzor) [Mechanisms of apoptosis in liver diseases (review)] *Sovremennye problemy toksikologii*, 2002; 4: 27-32 (in Ukrainian)

3. Yu. I. Karachentsev, A. M. Timchenko, O. V. Kozakov *Sovremennye tendentsii endokrinnoy zabolevaemosti naseleniya i perspektivy razvitiya endokrinologicheskoy sluzhby* [Current trends in the endocrine morbidity of the population and prospects for the development of endocrinology service] *Zdorov'ya Ukraïni*, 2015 (in Ukrainian)

4. Kravchenko V.I. Dynamika zakhvorjuvanosti na patologhiju shhytopodibnoji zalozy v Ukraïni [Dynamics of the incidence of thyroid cancer in Ukraine] *Mezhdunarodnyj Endokrynologhycheskyj zhurnal*, 2011; 3(35): 56–59 (in Ukrainian)

5. Mykytjuk O. Ju Protochna cytometrija: fizychni osnovy ta praktychne zastosuvannja u medycyni i biologhiji [Flow cytometry: physical fundamentals and practical applications in medicine and biology] *Visnyk problem biologhiji i medycyny*, 2015; 2,1 (118): 214-217 (in Ukrainian)

6. Nechyporuk V. M., Korda M. M. Metabolizm pry ghipo- ta ghipertyreozі [Metabolism at hypo- and hyperthyroidism] *Visnyk naukovykh doslidzhenj*, 2015; 3: 4 (in Ukrainian)



7. Prystupjuk O. M. Ghipotyreoz: ushkodzhennja orghaniv ta system [Hypothyroidism, damage organs and systems] Mizhnarodnyj endokrynologhichnyj zhurnal, 2011; 4: 104-109 (in Ukrainian)

8. Rykalo N.A. Fraghmentacija jadernoji dnk ghepatocytiv pry khronichnomu toksychnomu ghepatyti u statevonezrilykh shhuriv: patoghenetychna korekcija [The fragmentation of nuclear DNA hepatocytes in chronic toxic hepatitis in immature rats: pathogenetic correction] Teoretychna i eksperymentaljna medycyna, 2010; 4: 15-18 (in Ukrainian)

9. Guicciardi M.E. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury Gut., 2005; 54: 1024–1033 ( in USA)