

Р.С. Досымбекова¹, Н.П. Бгатова², З.Б. Тунгушбаева¹, К.О. Шарипов³,
К.К. Омирзакова³, М.М. Исмаилова³, Д.Ш. Жетписбай³

¹Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан;

²Клиникалық және эксперименттік лимфология ғылыми-зерттеу институты —
РҒА СБ ЦГИ ФЗО бөлімшесі, Новосибирск, Ресей;

³С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медициналық университеті, КЕАҚ, Алматы, Қазақстан
(E-mail: dos.raushan@mail.ru)

Оқшауланған гепатоциттердің жасушалық гомеостазын сақтауда аутофагияның ролі

Мақалада оқшауланған гепатоциттердің ультрақұрылымдық ұйымы зерттелген және олардың өсу динамикасындағы жасушаішілік өзгерістердің сипаты анықталған. Нативтік қасиеттері сақталған гепатоциттерді өсіру әдісін әзірлеу, әртүрлі сыртқы факторлардың, химиялық қосылыстардың және жаңа дәрілік препараттардың гепатотоксикалық әсерлерін зерттеу үшін және бауырдың тұқым қуалайтын немесе терминалды ауруларын емдеуде жасушалық трансплантацияны жүргізуге мүмкіндік беретін қажеттілігімен анықталды. Бастапқы гепатоциттерді өсіру үлгілері бауыр метаболизмін, секрециясын және регенерациясын зерттеу үшін қолданылады. Бастапқы гепатоциттерді өсіру стандартты қоректік ортада жүргізілген, ал өсу динамикасы ағынды цитофлуориметрия, жарық және электронды микроскоптар арқылы зерттелген. Стандартты қоректік ортада өсірілген бастапқы гепатоциттерді зерттеу нәтижесінде, гепатоциттердегі базальды аутофагияның жоғарылауы гликофагия мен митофагия түрінде көрініс берді. Аутофагия стандартты өсірілген жағдайда оқшауланған гепатоциттердің жасушалық гомеостазын сақтауға мүмкіндік береді.

Кілт сөздер: оқшауланған гепатоциттер, базальды аутофагия, жасушалық цикл.

Kipicne

Соңғы уақытта бастапқы гепатоциттер жасушаларын өсіру бауырдың тұқым қуалайтын немесе терминалды ауруларын емдеуде трансплантация жүргізу қажеттілігі туындауына байланысты қарастырылуда [1]. Бауырдың ерекшелігі - патологиялық факторлар жойғаннан кейін, бауырдың қалыпты құрылымының қалпына келуі [2]. Бауырда көптеген функцияларды — паренхиматозды жасушалар немесе гепатоциттер атқарады [3]. Бауырдың паренхиматозды жасушасы — гепатоцит күрделі, энергетикалық қарқынды, поляризацияланған эпителиальды жасушалар болып табылады [1]. Гепатоциттер регенерация кезінде ағзаның тіршілігін қамтамасыз ететін бауырдың маңызды функцияларын сақтай отырып, 1000-нан астам гендерді экспрессиялайды [4].

Бауыр метаболизм мен залалсыздандырудың орталық органы болып табылатындықтан, оқшауланған гепатоциттер дәрілік препараттардың фармакологиялық және токсикологиялық реакцияларын анықтау үшін үлгі ретінде пайдаланылады [5]. Сонымен қатар, бастапқы гепатоциттерді өсірудің оңтайлы әдісі мен тиімділігін анықтау мәселелері сақталуда [6].

Жасушаішілік немесе жасушадан тыс микроортаның өзгеруі жағдайында жасушалардың гомеостазын сақтау механизмі аутофагия болып табылатыны белгілі [7]. Аутофагиялық механизм жасушадан тыс микроортаның метаболикалық өзгерістеріне өте сезімтал және стрестік жағдайларды жеңу үшін бейімделген аутофагиялық жауап маңызды болады [8]. Аутофагия және апоптоз — жасушаішілік екі қарама-қарсы үрдіс. Аутофагия — жасушаның тіршілігін сақтап қалу тәсілі [9], ал апоптоз — жасушаның жойылу түрінің бірі [10]. Аутофагия жасушалық гомеостазды сақтау және энергия өндіруге арналған субстраттарды қамтамасыз ететін лизосомалардағы дұрыс оралмаған ақуыздар мен зақымдалған цитоплазмалық компоненттердің тозу жолын білдіреді [11].

Зерттеу жұмысының мақсаты — оқшауланған гепатоциттердің цитоплазмасындағы базальды аутофагияны, оларды өсіру динамикасында зерттеу.

Зерттеу материалдары және әдістері

Гепатоциттерді бөліп алу және өсіру. Зерттеу бастапқы өсірілген гепатоциттерде жүргізілді. Салмағы 180–200 г. Вистар саласындағы аталық егеуқұйрықтардың гепатоциттері 0,03 % коллагеназа

ерітіндісін («ICN Biomedicals, Inc», АҚШ) пайдалана отырып, рециркуляторлы ферментативті перфузия әдісін қолданып, дифференциалды центрифугалау арқылы паренхимиялық емес жасушалардан бөлініп алынды. Жасушалардың тіршілік ұзақтығы трипанды көкті («Serva», Германия) жасушалар құрамынан шығару әдісімен бағаланды. Экспериментке тіршілік ұзақтығы 90 %-дан кем емес жасушалар алынды. Алынған жасушаларды концентрациясы $10 \cdot 10^4$ жасуша/ойық коллагенмен жабылған 6-ойығы бар планшеттерге (Corning) отырғызылды. Гепатоциттер келесі қоректік ортада RPMI-1640 (Gibco, АҚШ), рН 7,4, құрамында 10 % сиырдың эмбрионалды сарысуы (Gibco, АҚШ), 100 бірл./мл пенициллин, 50 мкг/мл гентамицин стандартты жағдайларда (5 % CO_2 , 37 °С температурада және 95 % ылғалдылықта) өсірілді.

Өсірілетін гепатоциттердің жасушалық циклын бағалау. Өсірілген гепатоциттердің жасушалық циклын талдау үшін Пропидий йодидінің (PI) интеркалибрлеуші флуоресцентті бояғыш ДНҚ қолдану арқылы, ағынды цитофлуориметрия әдісі қолданылды. Жасушалар 1, 24 және 48 сағат бойы өсірілді. Жасушаларды пластиктен алу үшін TrypLE реагентті (Gibco, АҚШ) пайдаланылды, центрифугалаумен жасушалар тұнып, фосфатты-тұзды буфермен (PBS) жуылды және мұздатылған 70 % этанолмен бекітілді. ДНҚ экстракциясы үшін буфермен инкубациядан кейін жасушалар қайтадан центрифугаланып және PBS-пен жуылды. Пропидий йодидімен боялған жасушалар CytoFlexS (Beckman Coulter, АҚШ) ағынды цитофлуориметрмен талданды.

Трансмиссиялық электронды микроскоп. Гепатоциттердің ультрақұрылымдық ұйымдастырылуын зерттеу үшін Хенкс ортасында дайындалған параформальдегидтің 4 % ерітіндісінде жасушаларының белгілі мөлшері фиксацияланды, одан кейін 1 сағат ішінде фосфатты буферде (рН=7,4) 1 % OsO_4 ерітіндісінде тағы да фиксация жүргізілді, дегидратацияны этил спиртінің ұлғаю концентрациясында жүргізіп, эпонмен (Serva, Германия) қапталды. Қалыңдығы 1 мкм болатын жартылай жіңішке кесінділер Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия) ультрамикротомында дайындалды, толудинді көкпен боялып, сәулелі микроскоп «LEICA DME» (Leica Microsystems, Германия) арқылы зерттелді. Қалыңдығы 70–100 нм болатын ультражіңішке кесінділерді сулы ерітіндіде қаныққан уранил-ацетат және қорғасын цитратымен контрастылығын келтіріп, электронды микроскоппен JEM 1010 (JEOL, Жапония) зерттелді.

Морфометрия және статистикалық мәліметтерді өңдеу. Морфометриялық талдау ImageJ (Wayne Rasband, АҚШ) компьютерлік бағдарламаның көмегімен жүргізілді. Гепатоциттердің ядролары мен цитоплазмасының диаметрі, ядролар мен цитоплазманың көлемі және ядролық-цитоплазмалық арақатынасы анықталды. Жасушаішілік органеллалардың концентрациясын 500 нүктеден тұратын жабық тест жүйесін пайдалана отырып, $\times 30000$ ұлғайған кезде бағаланды. Орташа мән (M) және стандартты ауытқу (SD) Microsoft Excel (Microsoft, АҚШ) бағдарламалық жасақтамасын пайдалану арқылы есептелді. Зерттелетін параметрлер арасындағы айырмашылықтардың анықтығы 95 % ($P < 0,05$) сенімділік деңгейінде U-критерия Манна-Уитни көрсеткішін қолдану арқылы Statistica 6.0 (StatSoft, АҚШ) бағдарламалық қамтамасыз ету көмегімен анықталды.

Зерттеу нәтижелері және оны талдау

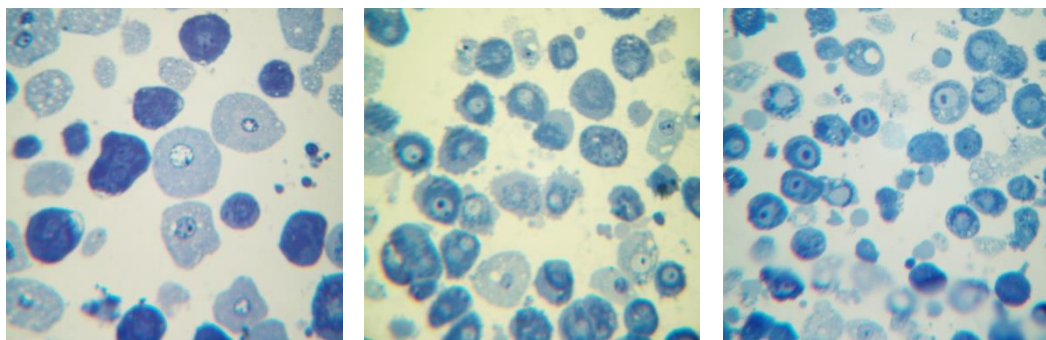
Оқшауланған гепатоциттерді өсіру кезінде 48 сағат ішінде жасушалардың абсолюттік көлемінің біртіндеп төмендегені байқалды. Өсірілген гепатоциттер жасушасының көлемі 24 сағаттан кейін 57 %-ға кеміді, ал 48 сағаттан кейін 76 %-ға кеміді, 1 сағат өткендегі жасушалар көлемімен салыстырғанда. Бұл ретте гепатоциттер ядроларының абсолюттік көлемі нақты өзгерген жоқ. Ядролық-цитоплазмалық арақатынас 24 сағаттан кейін 2 есе, 48 сағаттан кейін 4 есе артты (1 А-Б сурет). Демек, өсіру процесінде гепатоциттер көлемінің төмендеуі, жасушалардың цитоплазмасының көлемдік үлесінің төмендеуі есебінен жүрді.

Жасушалық циклды бағалау стандартты қоректік ортада өсіру кезінде 24 сағаттан кейін G0/G1-де гепатоциттердің тоқтауын көрсетті. 48 сағат ішінде зерттеу апоптоз сатысындағы жасушалар пайызының көтерілмегенін, гепатоциттер өздерінің тіршілік ұзақтығын сақтап қалғанын айқындады (2-сурет).

Гепатоциттердің ультрақұрылымдық ұйымдасуын зерттеуде 24 сағаттық өсіруден кейін гепатоциттердің цитоплазмасында табақша тәрізді гликогендер мен цитоплазма фрагменттерінде аутофагосомалар (3А сурет) және ішінара тозған материалмен аутолизосом анықталды (3Ә сурет).

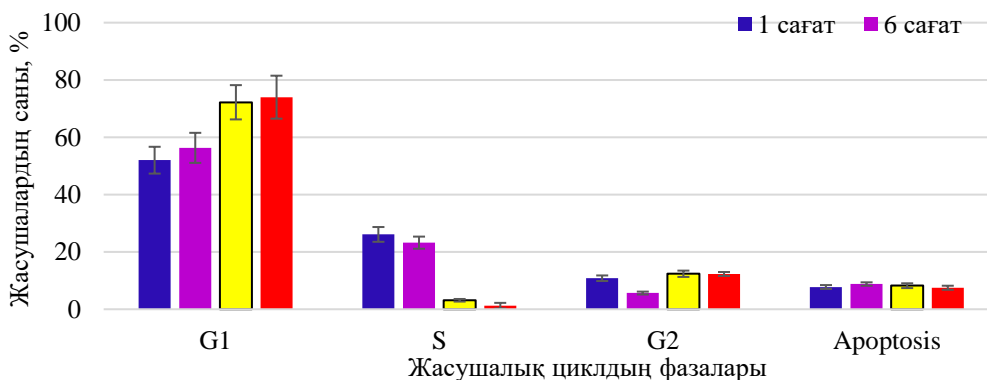
Егер 24 сағаттық өсіруден кейін аутофагосом құрамында гликогеннің түйіршіктері байқалса, онда гепатоциттердің ультрақұрылымдарын 48 сағаттан кейін зерттеу кезінде цитоплазма және митохондрияның фрагменттері бар аутофагосомалар анықталды (3Б, В сурет). Митохондриялар түйіршікті эндоплазмалық ретикулум цистерналарымен жиі қоршалған (3Г сурет). Сонымен қатар, митохондрия-

лардағы кристалар құрылымының бұзылу және ыдырап-бұзылудың әртүрлі сатысындағы мембраналық құрылымдардың қосылуымен аутолизосомалардың санының жоғарылауы байқалды (3Д сурет).



А, Ә, В — 1, 24 және 48 сағаттан кейін, гепатоциттерді сәйкесінше өсіру. Толуидинді көкпен боялған. Ұлғайтылған $\times 400$

1-сурет. Оқшауланған гепатоциттерді өсіру динамикасының морфологиясы



2-сурет. Гепатоциттерді стандартты коректік ортада өсіру кезінде жасуша циклінің фазалары бойынша таралуы

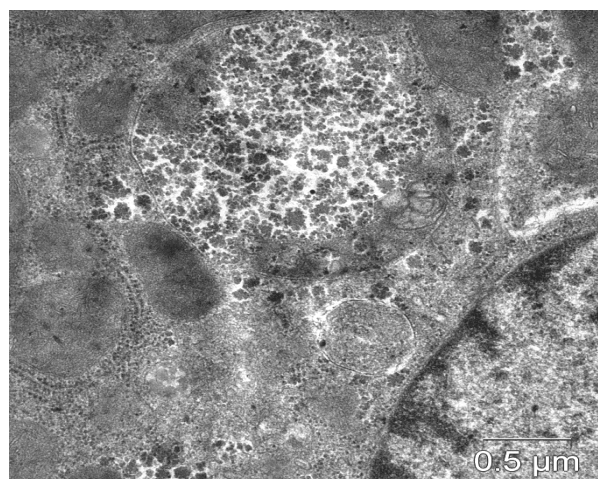
Гепатоциттердің ультрақұрылымдық ұйымдасуына 48 сағат ішінде морфометриялық зерттеу жүргізу, өсірілген гепатоциттерде гликогеннің және митохондрияның көлемдік тығыздығы 84 % және 27 % ($p < 0,05$) сәйкес төмендегенін көрсетті (1-кесте). Бұл ретте, аутофагосом және аутолизосомның көлемдік тығыздығы 50 % және 7 есеге ($p < 0,05$), сәйкес артты (1-кесте).

1 - к е с т е

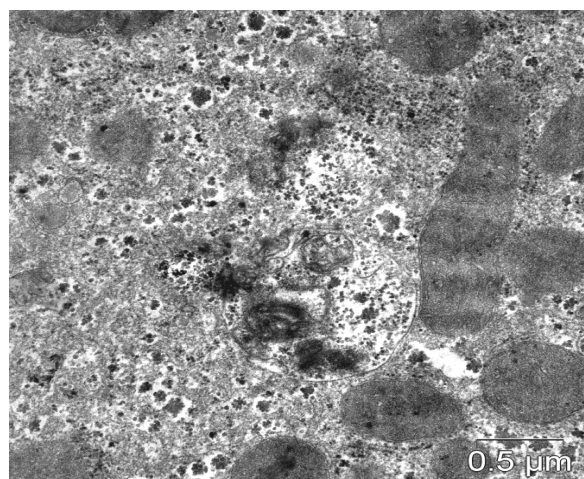
Гепатоциттерді өсіру динамикасындағы морфометрияның нәтижелері (M±SD)

Параметрлері	1сағат	24 сағат	48 сағат
Гепатоциттер, V (мкм ³)	8089,77±3465,86	7322,782±3682,01*	4154,77±1904,82*
Гепатоциттер ядросы, V (мкм ³)	423,04±137,21	427,73±127,91	514,83±124,8
ЯЦИ	0,052±0,0215	0,074±0,0515	0,179±0,0315*
Митохондрия, Vv (%)	14,2±2,72	14,7±1,78	10,4±2,38*
ЭПР, Vv (%)	4,41±0,43	3,92±1,04	2,02±0,56
Аутофагосомдар, Vv (%)	5,87±1,45	21,2±5,13*	8,78±3,56*#
Аутолизосомдар, Vv (%)	0,94±1,22	2,65±2,51*	6,88±2,21*#
Гликоген, Vv (%)	5,41±1,14	1,42±1,08*	0,86±0,84*

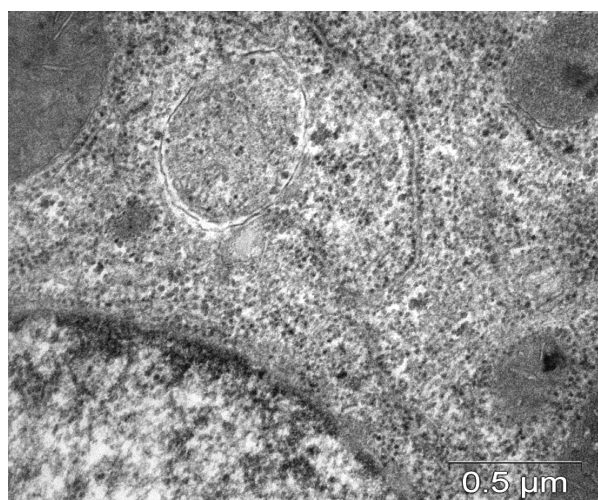
Ескертпе. Vv — құрылымдардың көлемді тығыздығы; ЭПР — эндоплазматикалық ретикулум; ЯЦИ — ядролық-цитоплазмалық индекс (VV ядро/VV цитоплазмалар). 1, 24, 48 сағат — гепатоциттерді өсіру уақыты. * — 1 сағ. өсіру арқылы сәйкес шамалардан айырмашылығы, # — 24 сағ. өсіру арқылы сәйкес шамалардан айырмашылығы ($p \leq 0,05$).



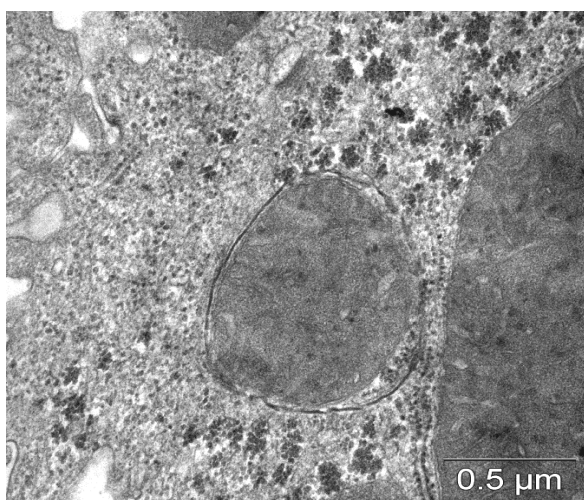
A



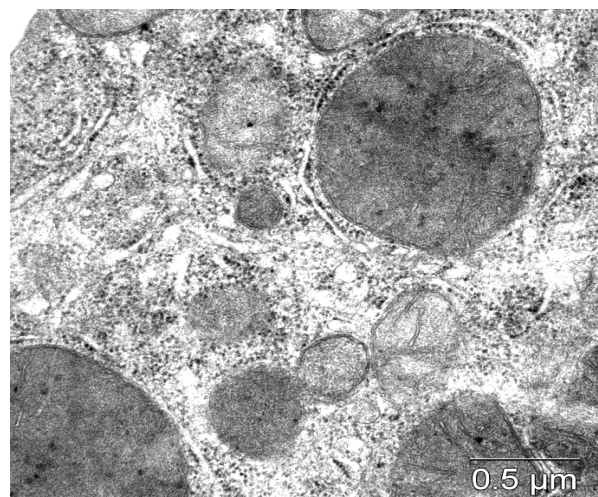
Ә



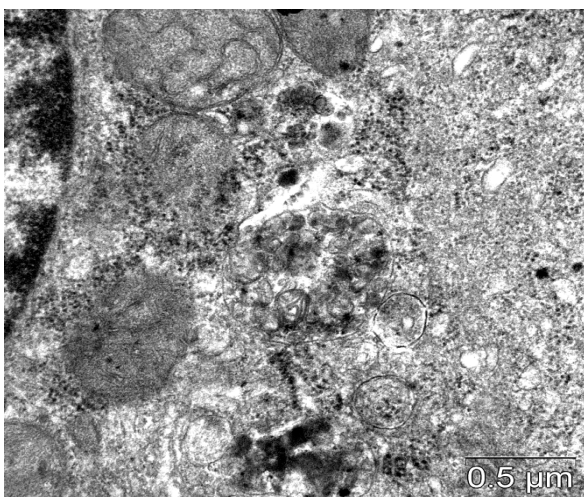
Б



В



Г



Д

A — 24 сағаттық өсіруден кейін аутофагосомадағы табақша тәрізді гликогендер; *Ә* — 24 сағаттық өсіруден кейін ішінара тозған материалдары бар аутолизосома; *Б* — 48 сағаттық өсіруден кейін цитоплазма фрагменті бар аутофагосома; *В* — 48 сағаттық өсіруден кейін митохондриясы бар аутофагосома; *Г* — 48 сағаттық өсіруден кейін цитоплазмада гликогеннің болмауы және митохондрия айналасында эндоплазмалық ретикулум сақиналарының пайда болуы; *Д* — 48 сағаттық өсіруден кейінгі бұзылудың әртүрлі сатысындағы мембраналық құрылымдарды қосуден аутолизосомның жоғары саны

3-сурет. Өсіру процесі кезіндегі гепатоциттердің ультрақұрылымдық ұйымдасуы

Алынған мәліметтерді талқылау

Аутофагия макромолекулалық ақуыз агрегаттарын, қосалқы қоректік заттардың жасушалық оргanelлаларын (гликоген мен липидтер) жоюға және тозуына бағытталған, жасушалық гомеостазды ұстап тұруға және стресс жағдайында белсендіретін, катаболикалық бағдарлама болып табылады. Аутофагия нәтижесінде лизосомаларда түзілетін метаболиттер макромолекулаларды синтездеу үшін энергия көздері немесе құрылыс блоктары ретінде қайта пайдаланылады [12].

Гепатоциттер энергетикалық ресурс — гликогеннің түзілуі мен сақталуында маңызды, шешуші рөл атқаратыны белгілі [13]. Әдебиет деректері аутофагия мен көмірсулар алмасуы арасындағы өзара әрекеттесуді және аутофагия мен жасушалық энергетикалық баланс арасындағы динамикалық кері байланыстың болуын көрсетеді [12]. Гликоген аутофагосомалармен танылуы және сіңірілуі мүмкін, содан кейін ыдырау үшін лизосомаға беріледі. Бұл процесс «гликофагия» деп аталады [14]. Біздің зерттеуде гепатоциттерді өсіру кезінде 24 сағаттан кейін гликогені бар аутофагосомалар басым болды, ал 48 сағаттан кейін митохондриясы бар аутофагосомалар пайда болды. Бұл кезеңде жасушалық циклдің S-фазасындағы жасушалардың саны ең аз болса, G0/G1 сатысындағы жасушалардың жоғары пайызының болуы анықталды. Аминқышқылдарының жетіспеушілігі жағдайында ақуыз синтезі мен митоз тоқтайтыны белгілі, ал аутофагиялық сигналдық жол тіршілікке маңызды ақуыздарды синтездеу үшін аминқышқыл пулының қолжетімділігін қамтамасыз ету мақсатында ақуыздарды ыдырату жолымен аминқышқылдарын босату үшін белсендіріледі [14].

Гепатоциттердің жасушалық культураларын медицинада пайдалануды шектейтін мәселелердің бірі өсіру кезінде жасушалардың митоздық белсенділігінің жоғалуы болып табылады [15]. Жасушалық циклді тоқтату біздің зерттеуде де көрсетілген. Сонымен қатар, өсірудің 48 сағатында гепатоциттердің базальды аутофагия деңгейі өсті және апоптоз жағдайындағы жасушалар саны ұлғайған жоқ. Бұл жағдайда аутофагия, гепатоциттердің дифференциялану деңгейін қолдап, жасушалық гомеостазды сақтаудың тиімді тәсілі болып табылды [16].

Қорытынды

Біздің алған мәліметтеріміз оқшауланған гепатоциттерді теңдестірілген қоректік ортада өсіру кезінде жасушалардың цитоплазмасында базальды аутофагияның өсуін көрсетеді. Тәжірибеден соң 24 сағаттан кейін гликофагия дамыды, өйткені аутофагосомаларда негізінен жасуша үшін энергия көзі болып табылатын материал — гликоген түйіршіктері болды. Гликофагияға қосымша, 48 сағаттан кейін жасушалардың амин қышқылдарына деген қажеттілігіне және ақуыз кешендерінің ыдырауына байланысты митофагия байқалды. Алынған мәліметтер гепатоциттердің бастапқы культурасының тіршілік етуіне аутофагияның қосқан үлесін көрсетеді және оларды өсіру жағдайларының жеткіліктілігінің көрсеткіші ретінде пайдалануға болады.

Сонымен, ағынды цитофлуориметрия, жарық және электрондық микроскопия әдістерімен стандартты қоректік ортада бастапқы гепатоциттердің өсіру динамикасы сипатталды. 24 сағаттан кейін жасушалық циклдің G0/G1 сатысында өсірілген гепатоциттердің тоқтауы және апоптоз сатысында сол жасушалардың пайызы көбеймей, олардың тіршілік ұзақтығы сақталғаны анықталды. Жасушалардың цитоплазмасында базальды аутофагияның артуы — гликофагия мен митофагияның басым болуы, гепатоциттерді өсіру процесінде жасушалық гомеостазды сақтау механизмі болып табылады.

Әдебиеттер тізімі

- 1 Ogoke O. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine / O. Ogoke, J. Oluwole, N. Parashurama // J. Biol. Eng. — 2017. — Vol. 11. — P. 46. — <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0081-4>.
- 2 Leevy C.B. Abnormalities of liver regeneration: a review/ C.B. Leevy // Dig. Diseases. — 1998. — Vol. 16(2). — P. 88–98. <https://doi.org/10.1159/000016852>.
- 3 Пашков А.Н. Культивирование гепатоцитов на твердом носителе / А.Н. Пашков, П.И. Кошелев, К.А. Сапин // Материалы Междунар. конф. хирургов-гепатологов. — М., 2003. — С. 65.
- 4 Michalopoulos G.K. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance / G.K. Michalopoulos // Hepatology. — 2017. — № 65(4). — P. 1384–1392. — <https://doi.org/10.1002/hep.28988>
- 5 Robust A.S. Long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling / A.S. Robust, G.G. Sevinç, N. Ersoy, O. Basak, K. Kaplan, K. Sevinç, E. Ozel, B. Sengun, E. Enustun, B. Ozcimen, A. Bagriyanik, N. Arslan, T.T. Önder, E. Erdal // Stem Cell Reports. — 2019. — Vol. 13, No.4. — P. 627–641. — <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.007>.

- 6 Nicolas C.T. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts / C.T. Nicolas, R.D. Hickey, H.S. Chen, S.A. Mao, M. Lopera Higuaita, Y. Wang, S.L. Nyberg // *Stem Cells*. — 2017. — Vol. 35, No. 1. — P. 42–50. — <https://doi.org/10.1002/stem.2500>.
- 7 Sica V. Organelle-specific initiation of autophagy / V. Sica, L. Galluzzi, J.M. Bravo-San Pedro, V. Izzo, M.C. Maiuri, G. Kroemer // *Mol. Cell*. — 2015. — Vol. 59, No. 4. — P. 522–39. — <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.021>.
- 8 Kroemer G. Lysosomes and autophagy in cell death control / M. Jäättelä // *Nat. Rev. Cancer*. — 2005. — Vol. 5, No. 11. — P. 886–897. — <https://doi.org/doi:10.1038/nrc1738>.
- 9 Klionsky D.J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) / D.J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, M.J. Abedin, H. Abeliovich, Acevedo Arozana // *Autophagy*. — 2016. — Vol. 12, No. 1. — P. 1–222. — <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>.
- 10 Edinger A.L. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy / A.L. Edinger, C.B. Thompson // *Curr Opin Cell Biol*. — 2004. — Vol. 16, No. 6. — P. 663–669. — <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>.
- 11 Malik B.R. Autophagic and endo-lysosomal dysfunction in neurodegenerative disease / B.R. Malik, D.C. Maddison, G.A. Smith, O.M. Peters // *Mol. Brain*. — 2019. — Vol. 12, No. 1. — P. 100. — <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0504-x>.
- 12 Ha J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism / J. Ma, K.L. Guan, J. Kim // *Mol. Aspects Med*. — 2015. — Vol. 46. — P. 46–62. — <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.08.002>.
- 13 Cao L. Effects of hypoxia on the growth and development of the fetal ovine hepatocytes in primary culture / L. Cao, J. Wang, L. Bo, D.W. Li, N. Yin, A.W. Zhou, C.P. Mao // *Biomed. Environ. Sci*. — 2019. — Vol. 32, No. 8. — P. 592–601. — <https://doi.org/10.3967/bes2019.077>.
- 14 He L. Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress / L. He, J. Zhang, J. Zhao, N. Ma, S.W. Kim, S. Qiao, X. Ma // *Adv. Nutr*. — 2018. — Vol. 9, No. 4. — P. 493–504. — <https://doi.org/10.1093/advances/nmy011>.
- 15 Krause P. Cultured hepatocytes adopt progenitor characteristics and display bipotent capacity to repopulate the liver / P. Krause, K. Unthan-Fechner, I. Probst, S. Koenig // *Cell Transplant*. — 2014. — Vol. 23, No. 7. — P. 805–817. <https://doi.org/10.3727/096368913X664856>.
- 16 Olsavsky Goyak K.M. Hepatocyte differentiation / K.M. Olsavsky Goyak, E.M. Laurenzana, C.J. Omiecinski // *Methods Mol. Biol*. — 2010. — Vol. 640. — P. 115–138. — https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_6.

Р.С. Досымбекова, Н.П. Бгатова, З.Б. Тунгушбаева, К.О. Шарипов,
К.К. Омирзакова, М.М. Исмаилова, Д.Ш. Жетписбай

Роль аутофагии в сохранении клеточного гомеостаза изолированных гепатоцитов

В статье исследована ультраструктурная организация изолированных гепатоцитов и определен характер их внутриклеточных изменений в динамике их культивирования. Разработка методологии культивирования гепатоцитов с сохранившимися нативными свойствами позволяет изучить гепатотоксические эффекты различных внешних факторов, химических соединений и новых лекарственных препаратов, что необходимо для клеточной трансплантации при лечении наследственных или терминальных заболеваний печени. Модели первичной культуры гепатоцитов используются для изучения метаболизма, секреции и регенерации печени. Первичная культура гепатоцитов была исследована в динамике культивирования в стандартной питательной среде с помощью метода проточной цитофлуориметрии, световых и электронных микроскопов. Аутофагия изолированных гепатоцитов при стандартных условиях культивирования способствует поддержанию клеточного гомеостаза.

Ключевые слова: изолированные гепатоциты, базальная аутофагия, клеточный цикл.

R.S. Dossymbekova, N.P. Bgatova, Z.B. Tungushbaeva, K.O. Sharipov,
K.K. Omirzakova, M.M. Ismailova, D.S. Szhetpisbay

The role of autophagy in maintaining cellular homeostasis of isolated hepatocytes

The article investigates the ultrastructural organization of isolated hepatocytes and determines the nature of their intracellular changes in the dynamics of their cultivation. The development of a methodology for the cultivation of hepatocytes with preserved native properties allows us to study the hepatotoxic effects of various external factors, chemical compounds and new drugs, which is necessary for cell transplantation in the treatment of hereditary or terminal liver diseases. Primary hepatocyte culture models are used to study liver metabolism, secretion, and regeneration. The primary culture of hepatocytes was studied in the dynamics of cultivation in a standard nutrient medium using flow cytometry, light and electron microscopes. Autophagy in isolated hepatocytes under standard culture conditions contributes to the maintenance of cellular homeostasis.

Keywords: isolated hepatocytes, basal autophagy, cell cycle.

References

- 1 Ogoke, O., Oluwole, J., & Parashurama, N. (2017). Bioengineering considerations in liver regenerative medicine. *J. Biol. Eng.*, *11*, 46. <http://doi.org/10.1186/s13036-017-0081-4>.
- 2 Leevy, C.B. (1998). Abnormalities of liver regeneration: a review. *Dig. Diseases*, *16*(2), 88–98.
- 3 Pashkov, A.N., Koshelev, P.I., & Sapin, K.A. (2003). Kultivirovanie hepatotsitov na tverdom nositele [Cultivation of hepatocytes on a solid carrier]. *Materialy mezhdunarodnoi konferentsii hirurhov-hepatologov — Proceedings of the international conference of surgeons of hepatologists*. Moscow [in Russian].
- 4 Michalopoulos, G.K. (2016). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*, *65*(4), 1384–92.
- 5 Robust, A.S., Akbari, S., Sevinç, G.G., Ersoy, N., Basak, O., Kaplan, K., Sevinç, K., Ozel, E., Sengun, B., Enustun, E., Ozcimen, B., Bagriyanik, A., Arslan, N., Önder, T.T. & Erdal, E. (2019). Long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling. *Stem Cell Reports*, *13*, 4, 627–641. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.007>.
- 6 Nicolas, C.T., Hickey, R.D., Chen, H.S., Mao, S.A., Lopera, Higuaita, M., Wang, Y., & Nyberg, S.L. (2017). Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts. *Stem Cells*, *35*, 1, 42–50. <http://doi.org/10.1002/stem.2500>.
- 7 Sica, V., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Izzo, V., Maiuri, M.C., & Kroemer, G. (2015) Organelle-specific initiation of autophagy. *Mol. Cell*. *59*, 4, 522–39. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.021.
- 8 Kroemer, G., & Jäättelä, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer*, *5*, 11, 886–897. doi: 10.1038/nrc1738.
- 9 Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., & Acevedo Arozena, A. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, *12*, 1–222.
- 10 Edinger, A.L., & Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *16*(6), 663–669.
- 11 Malik, B.R., Maddison, D.C., Smith, G.A., & Peters, O.M. (2019). Autophagic and endo-lysosomal dysfunction in neurodegenerative disease. *Mol. Brain.*, *12*(1), 100.
- 12 Ha, J., Guan, K.L., & Kim, J. (2015). AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol. Aspects Med.*, *46*, 46–62. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2015.08.002>.
- 13 Cao, L., Wang, J., Bo, L., Li, D.W., Yin, N., Zhou, A.W., & Mao, C.P. (2019). Effects of hypoxia on the growth and development of the fetal ovine hepatocytes in primary culture. *Biomed. Environ. Sci.*, *32*, 592–601. <http://doi.org/10.3967/bes2019.077>.
- 14 He, L., Zhang, J., Zhao, J., Ma, N., Kim, S.W., Qiao, S., & Ma, X. (2018). Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress. *Adv. Nutr.*, *9*, 4, 493–504. <http://doi.org/10.1093/advances/nmy011>.
- 15 Krause, P., Unthan-Fechner, K., Probst, I., & Koenig, S. (2014). Cultured hepatocytes adopt progenitor characteristics and display bipotent capacity to repopulate the liver. *Cell Transplant*, *23*, 7, 805–817. <http://doi.org/10.3727/096368913X664856>.
- 16 Olsavsky Goyak, K.M., Laurenzana, E.M., & Omiecinski, C.J. (2010). Hepatocyte differentiation. *Methods Mol. Biol.*, *640*, 115–138. — http://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_6.