

DOI 10.29254/2077-4214-2025-1-176-452-460

UDC 611.36-018.1-06:615.357:577.175.6+615.322/.356-122.3

**Polvyiana O. A., Stetsuk Ye. V., Shepitko V. I., Boruta N. V.,
Vilkhova O. V., Pelypenko L. B., Lysachenko O. D.**

**DYNAMICS OF THE NUCLEAR INDEX AND MITOTIC NUMBER IN HEPATOCYTES UNDER
CENTRAL BLOCKADE OF LUTEINIZING HORMONE SYNTHESIS WITH QUERCETIN
SUPPLEMENTATION**

Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

Stetsuk78@gmail.com

Causes of mitotic disorders in hepatocytes include toxic substances, viral infections, genetic mutations, inflammatory stress, and nutritional deficiencies. Mitotic dysfunction can lead to severe pathologies such as hepatocellular carcinoma, fibrosis, cirrhosis, and liver failure. Genomic instability may impair the liver's regenerative capacity, further deteriorating its functional state. This study aimed to determine the distribution of the ploidy index, nuclear index, and mitotic number in hepatocyte subtypes under conditions of central blocking of luteinizing hormone synthesis with long-term exposure to tryptorelin and dietary quercetin supplementation in animals. The experiment was conducted on 60 sexually mature male white rats weighing 140–160 g. Liver tissue was used as the study material. The animals were divided into three groups. Group 1, the control group, received saline (10 animals). Group 2 was subcutaneously injected with diphereline (tryptorelin embonate) at a dose of 0.3 mg of active ingredient per kg of body weight for a duration of 365 days (25 animals). Group 3 was administered a solution of tryptorelin at the same dose, with quercetin added to the diet through a gastric tube, based on body weight, three times a week (25 animals). The animals were euthanized at 1, 3, 6, 9, and 12 months with an overdose of ether anesthesia.

Prolonged central blocking of the synthesis of luteinizing hormone by tryptorelin leads to oxidative damage to the liver parenchyma. The reaction of the liver parenchyma was manifested by an increase in the ploidy index, nuclear index and mitotic number in hepatocytes at later stages of the study. Quercetin positively affects the course of oxidative stress in the liver.

Key words: liver, hepatocyte, mitosis, testosterone, luteinizing hormone, oxidative stress, quercetin, antioxidant, triptorelin.

Connection of the publication with planned research works.

The study is a fragment of the research topic “Experimental and morphological study of the effect of dipherelin, cryopreserved placental transplants on the morphological and functional state of a number of internal organs”, state registration number 0124U003358.

Introduction.

Globally, there is a significant increase in the number of patients with liver disease, currently estimated at over 2 billion people [1]. In European countries, between 500,000 and 1,000,000 cases of various liver diseases are registered annually. The high prevalence of toxic hepatitis, the increasing incidence among younger populations, and the growing number of chronic disease forms that impact work capacity highlight the importance of studying this issue [2]. In the structure of chronic diffuse liver diseases, toxic (52.4%) and viral (47%) lesions predominate [3]. The liver is the primary organ responsible for the metabolism of exogenous and endogenous compounds, and hepatocytes – the key functionally active liver cells – are among the first to be affected by these factors. Their damage negatively impacts the condition of other organs and the entire organism [4]. It is known [5] that after birth, uninucleated diploid hepatocytes rapidly become polyploid, undergoing a two-, four-, or more-fold increase in genomic content. Consequently, in a mature organism, the hepatocyte population predominantly consists of uninucleated or binucleated polyploid cells [4]. In sexually mature mice and rats, the proportion of polyploid hepatocytes is approximately 90%, while uninucleated diploid hepatocytes constitute only 10%; in humans, these proportions are approximately

60% and 40%, respectively [5]. Mitosis is the primary mechanism of cell division, ensuring the preservation of genetic information and facilitating tissue regeneration. In liver hepatocytes, mitotic activity is usually low, since most cells maintain stable homeostasis. However, under certain pathological conditions, the mitotic cycle can be disrupted, leading to abnormal cell division and contributing to the development of various liver diseases [6]. Polyploidy refers to an increase in the chromosomal number within a cell. While polyploidy is a normal feature of the liver, excessive polyploidization may contribute to pathological changes [7].

Causes of mitotic disorders in hepatocytes include toxic substances (alcohol, drugs, heavy metals, pesticides), viral infections (hepatitis B and C), genetic mutations, co-infection stress, and nutritional deficiencies. Mitotic dysfunction may result in severe pathologies such as hepatocellular carcinoma, fibrosis, cirrhosis, and liver failure [5, 7]. Genomic instability can reduce the liver's regenerative capacity, thereby impairing its functional state. Hepatocyte polyploidy, a characteristic feature of the liver, refers to the presence of more than two sets of chromosomes in liver cells. This phenomenon plays a crucial role in liver regeneration and overall function, particularly under conditions of damage or stress [8, 9, 10]. Studies indicate that chronic toxic hepatitis increases the prevalence of polyploid nuclei (4n, 8n, 16n) in hepatocytes [6]. This may serve a protective role for liver tissue, as diploid hepatocytes are the most vulnerable to harmful factors. Tryptorelin is a synthetic analog of the neurohormone gonadotropin-releasing hormone (GnRH) [11, 12, 13, 14], which suppresses the expression of its receptor in the pituitary gland, re-

sulting in oxidative stress in rat testicular tissues [15]. Quercetin is a widely distributed flavonoid found in fruits, vegetables, and seeds. It exhibits antioxidant properties, counteracting free radical damage, and has been shown to lower the risk of cardiovascular disease [16], cancer [17], and neurodegenerative disorders [18]. Pharmacological agents, particularly quercetin, are being investigated for their potential in mitigating pathological liver changes. Quercetin is regarded as a promising therapeutic agent for liver pathology, which is the focus of our study.

The aim of the study.

To determine the distribution and dynamics of variability in the ploidy index, nuclear index, and mitotic number in hepatocyte subtypes under conditions of central blockade of luteinizing hormone synthesis during long-term exposure to triptorelin with the addition of quercetin to the animals' diet.

Object and research methods.

The experiment was conducted on 60 sexually mature male white rats weighing 140-160 g. Liver tissue served as the primary material for analysis. The animals were divided into three groups. Group 1 (control) received saline injections (10 animals). Group 2 received subcutaneous injections of dipherelin (triptorelin embonate) [19] at a dose of 0.3 mg/kg of body weight, with drug activity lasting 365 days (25 animals). Group 3 received triptorelin (0.3 mg/kg of body weight) along with quercetin supplementation, administered via a gastric tube three times a week (25 animals). Animals were euthanized at 1, 3, 6, 9, and 12 months using an overdose of ether anesthesia. All animals were housed under standard conditions in the vivarium of Poltava State Medical University.

All studies and euthanasia of experimental animals were conducted following the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and the General Ethical Principles for Animal Experiments adopted by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, 2001).

Liver fragments were fixed according to the conventional method and placed in paraffin blocks, from which 4 μm thick sections were made and stained with hematoxylin and eosin [20]. A light microscope BIOREX-3#5605 was used to study histological specimens comprehensively. Hepatocytes in the field of view were counted by visual assessment using digital microfilters and software adapted for this study. Photographs were taken using a DCM 900 digital microphotographic attachment with appropriate software.

The study results were processed using Microsoft Office Excel software and the Real Statistics 2019 extension. The nonparametric Mann-Whitney test was used to determine the statistical significance of group differences. The difference was considered statistically significant at p<0.05.

Research results and their discussion.

After our histological examination of the liver under triptorelin blockade of the hypothalamus, we found that the number of cells with pathology due to mitotic disorders in the cells tended to increase. Thus, during the first month of observation, we found that the number of hepatocytes with two nucleoli (binucleolate hepatocytes)

Table – Number of binucleolate and binucleated hepatocytes in experimental modeling of luteinizing hormone blockade by triptorelin with the addition of quercetin

	Triptorelin		Triptorelin + Quercetin	
	binucleolate	binucleated	binucleolate	binucleated
control	1,7±0,37	0,3±0,065	1,7±0,37	0,3±0,065
1 month	2,4±0,523	1,7±0,37*	2,2±0,48	1,54±0,336*
3 month	4,78±0,142*	3,1±0,6763**	3,66±0,498*	2,52±0,549*
6 month	4,76±0,145*	3,8±0,829**	4,08±0,289*	3,9±0,85**
9 month	5,4±0,178**	7±0,527**	4,88±0,064*	5,3±0,156**
12 month	5,7±0,243**	7,14±0,557**	5,3±0,156**	6,6±0,44**

Notes: * – p<0.05; ** – p<0.01 compared to the control group.

increased and amounted to 2.4±0.523 (first group) and 2.2±0.48 (second group), respectively, but the indicator was not statistically significantly different compared to the control group. The binucleolate index was, respectively, 0.0461 (first group) and 0.0313 (second group) (table).

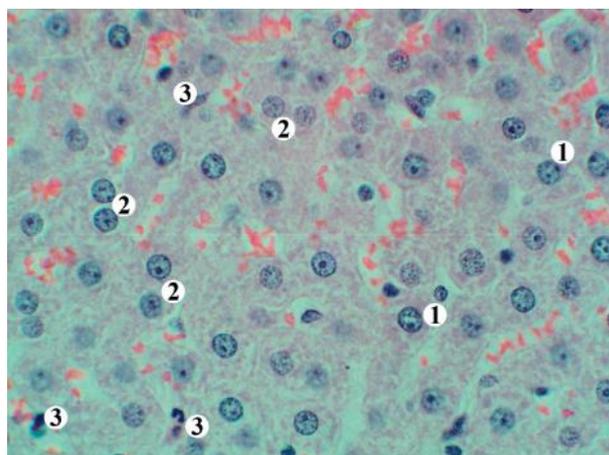


Figure 1 – Morphogenesis of hepatocytes with two nucleoli and two nuclei in the group of animals with the administration of triptorelin with the addition of quercetin (T+Q) on the 3rd month of observation. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: obh ×40, okh ×10. Designations: 1 – binucleolate hepatocytes, 2 – binucleated hepatocytes, 3 – liver macrophage.

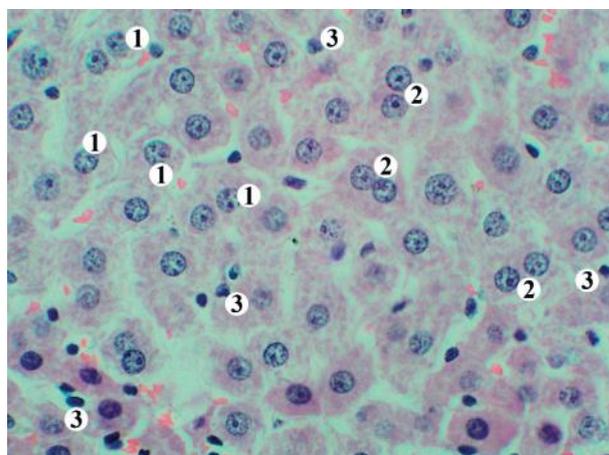


Figure 2 – Morphogenesis of hepatocytes with two nucleoli and two nuclei in the group of animals with triptorelin (T) administration on the 6th month of observation. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: obh ×40, okh ×10. Designations: 1 – binucleolate hepatocytes, 2 – binucleated hepatocytes, 3 – liver macrophage.

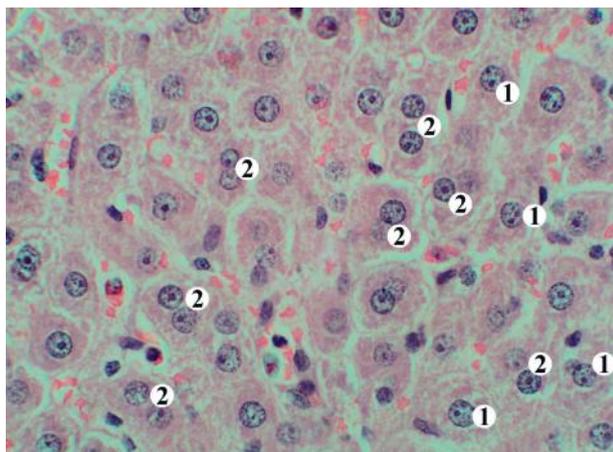


Figure 3 – Morphogenesis of hepatocytes with two nucleoli and two nuclei in the group of animals with triptorelin (T) administration at the 12th month of observation. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: obh $\times 40$, okh $\times 10$. Designations: 1 – binucleolate hepatocytes, 2 – binucleated hepatocytes, 3 – liver macrophage.

The third month of observation was characterized by an increase in the index in the two experimental groups, respectively, but in the group with the addition of quercetin, this index was lower and amounted to 3.66 ± 0.498 compared to the first group – 4.78 ± 0.142 . The number of cells with two nuclei increased compared to the con-

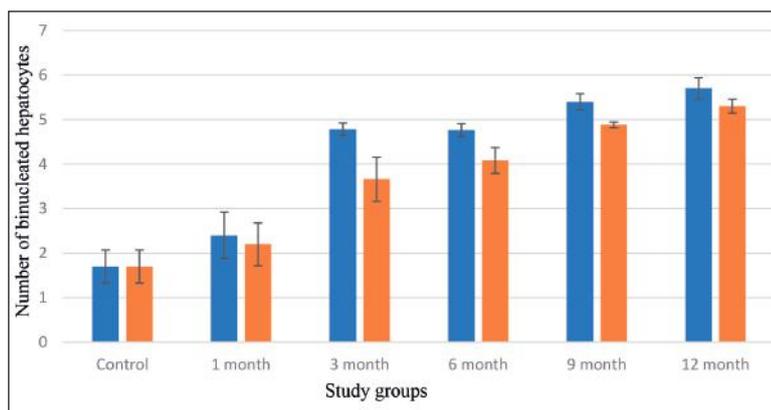


Figure 4 – Number of binucleated hepatocytes in the field of view in the group of animals with triptorelin administration (T) and the group of animals that were injected with quercetin (T+Q) at different periods of the study.

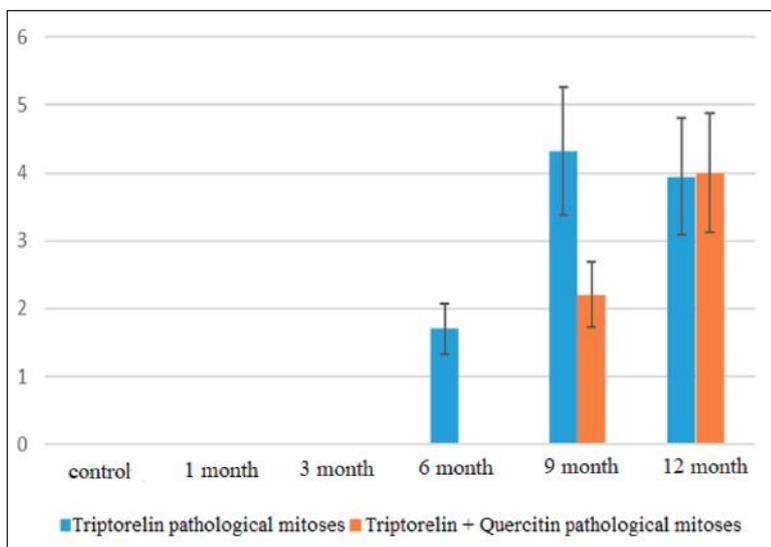


Figure 5 – Number of mitoses in hepatocytes in the field of view in the group of animals with triptorelin administration (T) and the group of animals that were injected with quercetin (T+Q) at different time points of the study.

trol group by 2.81 (in the first group) and 2.15 (in the second group) (table, fig. 1).

In the 6th month of observation, the number of cells with two nucleoli decreased compared to the previous examination period in the 1st experimental group, but the indicator is not statistically significant (table, fig. 2). The second group showed a tendency to increase. It amounted to 4.08 ± 0.289 cells in the field of view, at $p < 0.01$ compared to the control group. The binucleolate indices in the 6th month were 0.094 and 0.079, respectively, for the groups.

The ninth month of observation was characterized by high concentrations of binucleolate hepatocytes in the field of view. Their number was 5.4 ± 0.178 and 4.88 ± 0.064 at $p < 0.01$, respectively, compared to the control group. The indices also increased and amounted to 0.109 and 0.097, respectively.

At the 12th month of observation, we found that the binucleolate indices increased several times, so in the first group by 3.35 times – they amounted to 5.7 ± 0.243 in the field of view, and 5.3 ± 0.156 in the second group at $p < 0.01$ compared to the control group (table). The binucleation indices were 0.116 and 0.106, respectively, in the groups (fig. 3).

In the morphological study of binucleated hepatocytes, the indicator trended upward from the first month of observation in both experimental groups. Thus, the binucleation index in the first month was 0.031 (first group) and 0.023 (second group), and in the twelfth month, 0.144 (first group) and 0.136 (second group), respectively (fig. 4).

In our morphological study of the number of mitoses in the fields of view at different time points of the experimental models, we found that the activity was visualized and detected in the group without quercetin supplementation at the 6th month of observation, which was detected only at the 9th month with quercetin supplementation. The maximum indicator was at the 12th month in both experimental groups, without a statistical difference (fig. 5).

An increase in the number of hepatocytes is an important adaptive mechanism that ensures liver stability and regeneration in response to damage or stress. Polyploidization is a biological process in which cells contain more than two sets of homologous chromosomes. This phenomenon is widely observed in nature. In mammals, complete polyploidy is usually lethal; however, some tissues can acquire a certain level of polyploidy during their normal life cycle. The formation of polyploid cells occurs as a result of cell fusion or abnormalities in cell division processes, such as endoreplication, mitotic slippage, or cytokinesis deficiency. Polyploid cells often appear in response to various stressors, including mechanical and metabolic stress. However, their excessive proliferation can lead to genetic instability [21]. Studies show that polyploid cells play an

important role in shaping the complex genomic landscape of cancerous tumors [22]. To counteract this, the body has evolved mechanisms that limit their proliferation by activating programmed cell death or senescence pathways shortly after their formation and by triggering an immune response that facilitates their clearance [23].

Our previous studies found that under the influence of triptorelin, oxidative stress in liver tissue may be associated with a decrease in testosterone [24], which is confirmed in the work of Kasarinaite [25] and other scientists. It is known that oxidative stress has a pronounced cytotoxic effect through the transmembrane receptor Fas and its ligand (FasL), or the short Fas system, which leads to the activation of mitosis in hepatocytes. Fas ligand's detected de novo expression is due to the generation of reactive oxygen species [26]. Since the Fas receptor is also expressed on the surface of hepatocytes, this indicates that liver cells can be involved in apoptosis [27], or with its disruption and transition to mitotic division through para- or autocrine mechanisms [28].

To summarize, the liver is the only organ of the body that modulates its ploidy content after exposure to various stressors together. Our results show that changes

in the ploidy profile can now be considered a marker of liver metabolic disorders.

Conclusions.

Prolonged central blocking of the synthesis of luteinizing hormone by triptorelin leads to oxidative damage to the liver parenchyma. The reaction of the liver parenchyma was manifested by an increase in the ploidy index, nuclear index and mitotic number in hepatocytes at later stages of the study. Quercetin positively affects the course of oxidative stress in the liver.

Prospects for further research.

Mitotic disorders in hepatocytes are an important marker in the development of hepatic pathologies. The study of the mechanisms of these disorders allows developing new approaches to the treatment and prevention of liver diseases. In our opinion, it is promising to identify the ways in which bioflavonoids, namely quercetin, can have a corrective effect on the structure of hepatocytes in male rats with testosterone-induced hormonal changes.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-1-176-452-460

УДК 611.36-018.1-06:615.357:577.175.6+615.322/.356-122.3

Полив'яна О. А., Стецук Є. В., Шепітько В. І., Борута Н. В.,

Вілхова О. В., Пелипенко Л. Б., Лисаченко О. Д.

ДИНАМІКА ІНДЕКСУ ЯДЕРНОСТІ ТА КІЛЬКОСТІ МІТОЗІВ В ГЕПАТОЦИТАХ ЗА УМОВ ЦЕНТРАЛЬНОЇ БЛОКАДИ СИНТЕЗУ ЛЮТЕЇНІЗУЮЧОГО ГОРМОНУ З ДОДАВАННЯМ КВЕРЦЕТИНУ

Полтавський державний медичний університет (м. Полтава, Україна)

Stetsuk78@gmail.com

Причини порушень мітозів у гепатоцитах: токсичні речовини, вірусні інфекції, генетичні мутації, коислювальний стрес, дефіцит поживних речовин. Порушення мітозів може призводити до серйозних патологій, таких як гепатоцелюлярна карцинома, фіброз, цироз, печінкова недостатність. Нестабільність геному може знижувати здатність печінки до регенерації, що погіршує її функціональний стан. Метою роботи було визначити розподіл в динаміці мінливості індексу плоідності, індексу ядерності та кількості мітозів в підтипах гепатоцитів за умов центральної блокади синтезу лютеїнізуючого гормону при довготривалій дії триптореліну з додавання в раціон харчування тварин кверцетину. Експеримент проведено на 60 статевозрілих білих щурах самцях масою 140-160 г. Матеріалом для дослідження слугували тканини печінки. Тварини були розділені на 3 групи. 1 групі – контрольній, вводився фізіологічний розчин (10 тварин). 2 групі підшкірно вводили диферелін (триптореліну ембонат) у дозі 0.3 мг діючої речовини на кг маси тіла з активністю препарату протягом 365 днів (25 тварин). 3 групі вводили розчин триптореліну із розрахунку 0.3 мг діючої речовини на кг маси тіла з додаванням кверцетину до харчування за допомогою гастрального зонду, у перерахунку на масу тіла тварин тричі на тиждень (25 тварин). Тварин виводили із експерименту через 1, 3, 6, 9 та 12 місяців шляхом передозування ефірного наркозу.

Тривале центральне блокування синтезу лютеїнізуючого гормону триптореліном, призводить до розвитку окисного пошкодження паренхіми печінки. Реакція паренхіми печінки проявлялася збільшенням індексу плоідності, індексу ядерності та кількості мітозів в гепатоцитах на більш пізніх термінах дослідження. Кверцетин позитивно впливає на перебіг оксидативного стресу в печінці.

Ключові слова: печінка, гепатоцит, мітоз, тестостерон, лютеїнізуючий гормон, оксидативний стрес, кверцетин, антиоксидант, трипторелін.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження є фрагментом науково-дослідної теми "Експериментально-морфологічне вивчення впливу дифереліну, кріоконсервованих трансплантатів плаценти на морфофункціональний стан ряду вну-

трішніх органів", державний реєстраційний номер 0124U003358.

Вступ.

У сучасному світі спостерігається значне зростання кількості пацієнтів із захворюваннями печінки, що нині перевищує 2 мільярди осіб [1]. В країнах Європи щороку реєструється від 500 тисяч до 1 мільйон-

на випадків різних хвороб печінки. Висока поширеність токсичних гепатитів, омолодження груп ризику, зростання хронічних форм хвороби, що впливають на працездатність, визначають актуальність дослідження цієї проблеми [2]. У структурі хронічних дифузних захворювань печінки переважають токсичні – 52,4% та вірусні – 47% ураження [3]. Печінка є основним органом метаболізму різних екзогенних і ендогенних хімічних сполук, при цьому основні функціонально активні клітини печінки (гепатоцити) одними з перших піддаються впливу цих факторів. Їх ураження негативно позначається на стані інших органів і всього організму загалом [4]. Відомо [5], що після народження організму одноядерні диплоїдні гепатоцити протягом короткого часу стають поліплоїдними, тобто у них у 2, 4 або більше разів збільшується кількість геномних наборів у клітині. Тому нормальна популяція гепатоцитів у зрілому організмі в основному містить одноядерні або двоядерні поліплоїдні клітини [4]. У статевозрілих мишей і щурів частка поліплоїдних гепатоцитів становить приблизно 90%, а одноядерних диплоїдних – лише 10%, у людини відповідно – близько 60% і 40% [5]. Мітоз є основним механізмом клітинного поділу, що забезпечує збереження генетичної інформації та регенерацію тканин. У гепатоцитах печінки мітотична активність зазвичай низька, оскільки більшість клітин перебуває у стані стабільного гомеостазу. Однак за певних патологічних умов мітотичний цикл може порушуватися, що призводить до аномалій поділу клітин, сприяючи розвитку різних захворювань печінки [6]. Поліплоїдія – збільшення числа хромосом у клітині. У нормальних умовах поліплоїдія властива печінці, але її надмірний рівень може призводити до патологічних змін [7].

Причини порушень мітозів у гепатоцитах: токсичні речовини (алкоголь, ліки, важкі метали, пестициди), вірусні інфекції (гепатити В і С), генетичні мутації, коислювальний стрес, дефіцит поживних речовин. Порушення мітозів може призводити до серйозних патологій, таких як гепатоцелюлярна карцинома, фіброз, цироз, печінкова недостатність [5, 7]. Нестабільність геному може знижувати здатність печінки до регенерації, що погіршує її функціональний стан. Поліплоїдія гепатоцитів – це стан, при якому клітини печінки містять більше двох наборів хромосом, що є нормальним явищем для цього органу [6]. Це явище відіграє важливу роль у регенерації та функціонуванні печінки, особливо за умов пошкодження або стресу [8, 9, 10]. Дослідження показують, що хронічний токсичний гепатит призводить до збільшення кількості поліплоїдних ядер (4с, 8с, 16с) у гепатоцитах [6]. Це може мати захисний характер для тканини печінки, оскільки диплоїдні гепатоцити є найбільш чутливими до дії пошкоджувальних факторів. Трипторелін – синтетичний аналог нейрогормону гонадолиберину [11, 12, 13, 14], який пригнічує експресію рецептора в гіпофізі, що призводить до розвитку окисного стресу в тканинах яєчок щурів [15]. Кверцетин – це поширений флавоноїд природного походження, що міститься у фруктах, овочах та насінні. Він має антиоксидантні властивості, допомагає організму боротися з агресією вільних радикалів, знижує ризик серцево-судинних захворювань [16], онкологічних процесів [17] та нейродегенеративних патологій [18]. Серед потенційних засобів корекції патологічних змін

печінки вивчаються фармакологічні агенти, зокрема кверцетин. Він розглядається як перспективний фармакологічний засіб для корекції патологічних змін у печінці, що і стало предметом нашого дослідження.

Мета дослідження.

Визначити розподіл в динаміці мінливості індексу плідності, індексу ядерності та кількості мітозів в підтипах гепатоцитів за умов центральної блокади синтезу лютеїнізуючого гормону при довготривалій дії триптореліну з додавання в раціон харчування тварин кверцетину.

Об'єкт і методи дослідження.

Експеримент проведено на 60 статевозрілих білих щурах самцях масою 140-160 г. Матеріалом для дослідження слугували тканини печінки. Тварини були розділені на 3 групи. 1 групі – контрольній, вводився фізіологічний розчин (10 тварин). 2 групі підшкірно вводили диферелін (триптореліну ембонат) [19] у дозі 0.3 мг діючої речовини на кг маси тіла з активністю препарату протягом 365 днів (25 тварин). 3 групі вводили розчин триптореліну із розрахунку 0.3 мг діючої речовини на кг маси тіла з додаванням кверцетину до харчування за допомогою гастрального зонду, у перерахунку на масу тіла тварин тричі на тиждень (25 тварин). Тварин виводили із експерименту через 1, 3, 6, 9 та 12 місяців шляхом передозування ефірного наркозу. Тварин утримували в стандартних умовах віварію Полтавського державного медичного університету.

Усі дослідження та евтаназію піддослідних тварин проводили відповідно до положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, 1986), а також із “Загальними етичними принципами експериментів на тваринах”, прийнятими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Фрагменти печінки фіксували за загальноприйнятою методикою і поміщали в парафінові блоки, з яких виготовляли зрізи товщиною 4 мкм і забарвлювали їх гематоксиліном та еозином [20]. При комплексному дослідженні гістологічних препаратів використовували світловий мікроскоп BIOREX-3#5605. Шляхом візуальної оцінки, за допомогою цифрових мікрофільтрів та адаптованого для цього дослідження програмного забезпечення підраховували гепатоцити у полі зору. Фотографування проводили використовуючи цифрову мікрофотографічну насадку DCM 900 з відповідним програмним забезпеченням.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel та розширення Real Statistics 2019 до нього. Для визначення статистичної значущості відмінностей між групами використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні. Різницю вважали статистично значущою при $p < 0.05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Після проведеного нами гістологічного дослідження печінки при триптореліновій блокаді гіпоталамусу нами було встановлено, що кількість клітин з патологією в наслідок порушення мітозів в клітинах мала тенденцію до збільшення. Так при дослідженні нами на перший місяць спостереження встановлено, що кількість двоядерцевих гепатоцитів збільшилась і становила $2,4 \pm 0,523$ (перша група) і $2,2 \pm 0,48$ (друга

група) відповідно, але показник статистично достовірно не відрізнявся в порівнянні з групою контролю. Індекс двоядерцевості становив відповідно: 0,0461 (перша група) і 0,0313 (друга група) (табл.).

Третій місяць спостереження характеризувався збільшенням показника відповідно в двох експериментальних групах, але в групі з додаванням кверцетину цей показник був меншим і становив 3,66±0,498 в порівнянні з першою групою – 4,78±0,142, але кількість клітин з двома ядрами збільшилась в порівнянні з контрольною групою в 2,81 (в першій групі) та 2,15 (в другій групі) (табл., рис. 1).

На 6-й місяць спостереження кількість двоядерцевих клітин зменшилась в порівнянні з попереднім терміном обстеження в 1-й експериментальній групі, але показник статистично не достовірний (табл., рис. 2). Друга група показала тенденцію до збільшення і становила клітин в полі зору – 4,08±0,289 – при $p < 0.01$ в порівнянні з групою контролю. Індеси двоядерцевості на 6-й місяць становили 0,094 та 0,079 відповідно до груп.

Дев'ятий місяць спостереження характеризувався високими концентраціями двоядерцевих гепатоцитів в полі зору. Кількість їх становила 5,4±0,178 та 4,88±0,064 при $p < 0.01$ відповідно в порівнянні з групою контролю. Індеси також збільшенні і становили 0,109 та 0,097 відповідно.

На 12-й місяць спостереження нами було встановлено, що показники двоядерцевості збільшенні в рази, так в першій групі в 3,35 разів – становили 5,7±0,243 в полі зору, та 5,3±0,156 в другій групі при $p < 0.01$ в порівнянні з групою контролю (табл.). Індеси двоядерності становили 0,116 та 0,106 відповідно до груп (рис. 3).

При морфологічному дослідженні двоядерних гепатоцитів, тенденція показника показувала наростаюче збільшення починаючи від першого місяця спостереження в обох експериментальних групах. Так індекс двоядерності першого місяця склав 0,031 (перша група) та 0,023 (друга група) і дванадцятого місяця 0,144 (перша група) та 0,136 (друга група) відповідно (рис. 4).

Таблиця – Кількість двоядерцевих та двоядерних гепатоцитів при експериментальному моделюванні блокади лютеїнізуючого гормону триптореліном з додаванням кверцетину

	Трипторелін		Трипторелін +Кверцетин	
	двоядерцеві	двоядерні	двоядерцеві	двоядерні
контроль	1,7±0,37	0,3±0,065	1,7±0,37	0,3±0,065
1місяць	2,4±0,523	1,7±0,37*	2,2±0,48	1,54±0,336*
3 місяць	4,78±0,142*	3,1±0,6763**	3,66±0,498*	2,52±0,549*
6 місяць	4,76±0,145*	3,8±0,829**	4,08±0,289*	3,9±0,85**
9 місяць	5,4±0,178**	7±0,527**	4,88±0,064*	5,3±0,156**
12 місяць	5,7±0,243**	7,14±0,557**	5,3±0,156**	6,6±0,44**

Примітки: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в порівнянні з групою контролю.

При морфологічному дослідженні нами на кількість мітозів в полях зору на різних строках експериментальних моделей встановлено, що активність візуалізувалась і виявлялась в групі без додавання кверцетину на 6-й місяць спостереження, що при додаванні кверцетину виявлялась тільки на 9-й місяць. Максимум показника був на 12-й місяць в обох

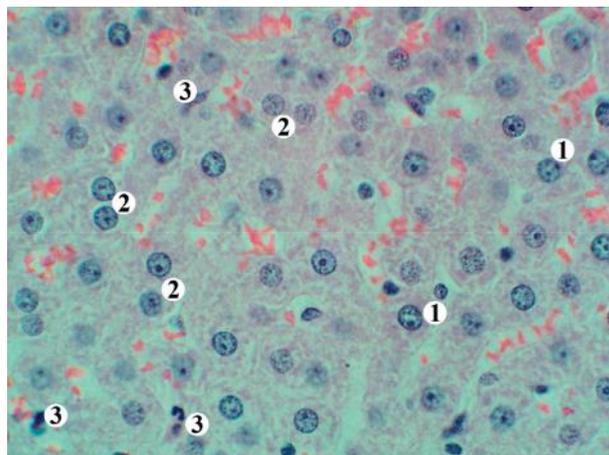


Рисунок 1 – Морфогенез гепатоцитів з двома ядрами та двома ядрами в групі тварин при введенні триптореліну з додаванням кверцетину (Т+К) на 3-й місяць спостереження. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Позначення: 1 – двоядерцеві гепатоцити, 2 – двоядерні гепатоцити, 3 – макрофаг печінки.

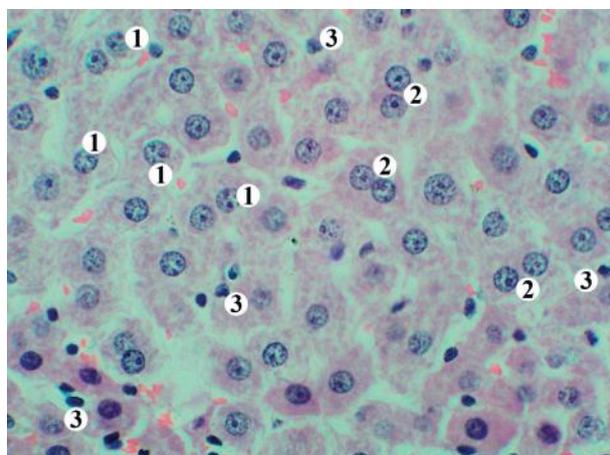


Рисунок 2 – Морфогенез гепатоцитів з двома ядрами та двома ядрами в групі тварин при введенні триптореліну (Т) на 6-й місяць спостереження. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Позначення: 1 – двоядерцеві гепатоцити, 2 – двоядерні гепатоцити, 3 – макрофаг печінки.

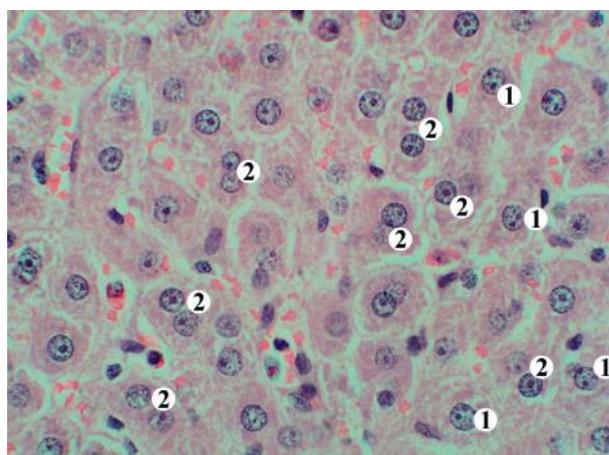


Рисунок 3 – Морфогенез гепатоцитів з двома ядрами та двома ядрами в групі тварин при введенні триптореліну (Т) на 12-й місяць спостереження. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Позначення: 1 – двоядерцеві гепатоцити, 2 – двоядерні гепатоцити, 3 – макрофаг печінки.

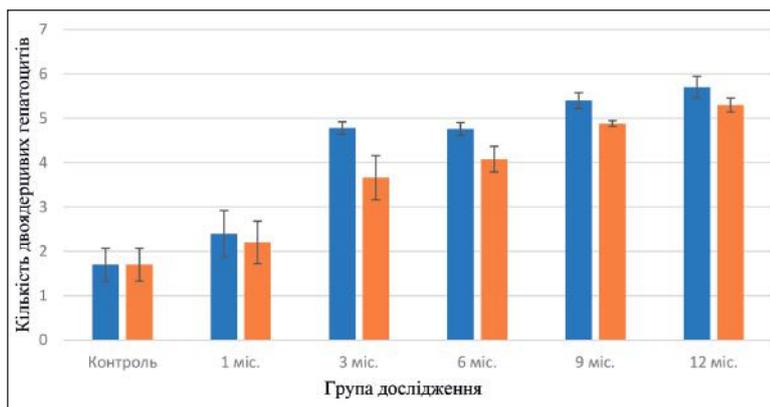


Рисунок 4 – Кількість двоядерцевих гепатоцитів в полі зору в групі тварин при введенні триптореліну (Т) та групі тварин, яким на тлі введення триптореліна вводили кверцетин (Т+К) на різних термінах дослідження.

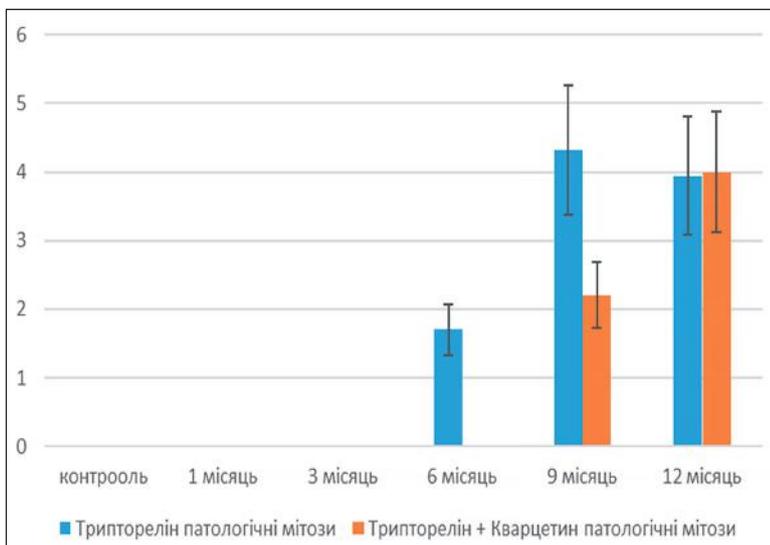


Рисунок 5 – Кількість мітозів в гепатоцитах в полі зору в групі тварин при введенні триптореліну (Т) та групі тварин, яким на тлі введення триптореліна вводили кверцетин (Т+К) на різних термінах дослідження.

експериментальних групах, без статистичної різниці (рис. 5).

Збільшення кількості гепатоцитів є важливим адаптивним механізмом, що забезпечує стійкість та регенерацію печінки за умов пошкодження або стресу. Як, відомо поліплоїдизація – це стан, при якому клітини містять більше двох наборів гомологічних хромосом. Це явище доволі поширене в природі. У ссавців повна поліплоїдія організму зазвичай є летальною, проте деякі тканини можуть набувати певного рівня поліплоїдії впродовж свого нормального життєвого циклу. Формування поліплоїдних клітин відбувається внаслідок злиття клітин або порушень у процесах клітинного поділу, таких як ендореplikація, мітотичне прослизання чи недостатність цитокінезу. Поліплоїдні клітини часто з'являються у відповідь на різні стресові фактори, зокрема механічний чи метаболічний стрес. Водночас їх надмірне розмноження може призводити до генетичної нестабільності [21].

References / Література

1. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol.* 2023;79(2):516-537. DOI: [10.1016/j.jhep.2023.03.017](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017).
2. Neshat SY, Quiroz VM, Wang Y, Tamayo S, Doloff JC. Liver Disease: Induction, Progression, Immunological Mechanisms, and Therapeutic Interventions. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6777. DOI: [10.3390/ijms22136777](https://doi.org/10.3390/ijms22136777).
3. Rikalo NA. The mechanisms of reparative regeneration of liver tissue in immature rats at chronic toxic hepatitis. *Journal of Education, Health and Sport.* 2015;5(9):587-598. DOI: [10.5281/zenodo.31627](https://doi.org/10.5281/zenodo.31627).

Дослідження демонструють, що поліплоїдні клітини відіграють важливу роль у формуванні складної геномної структури ракових пухлин [22]. У зв'язку з цим організм розвинув механізми, які обмежують їхню проліферацію: активацію запрограмованих шляхів клітинної загибелі або старіння невдовзі після їх утворення, а також ініціювання імунної відповіді, що сприяє їх елімінації [23].

В попередніх наших роботах нами було встановлено, що під впливом триптореліну розвивається окисний стрес в тканинах печінки може бути пов'язано зі зниженням тестостерону [24], що підтверджується в роботах Kasarinaite [25] та інших вчених. Як відомо, окислювальний стрес надає виражену цитотоксичну дію через трансмембранний рецептор Fas і його ліганд (FasL), або коротку Fas-систему, що призводить до активації мітозу в гепатоцитах. Виявлена експресія Fas ліганду *de novo* обумовлена генерацією активних форм кисню [26]. Так як на поверхні гепатоцитів експресований і Fas рецептор, це свідчить про те, що клітини печінки можуть бути залучені в апоптоз [27], або з порушенням його і перехід в мітотичний поділ через пара- або аутокринні механізми [28].

Підсумовуючи, печінка є єдиним органом організму, який модулює свій вміст плоїдності після впливу різних чинників які призводять до стресу разом, наші результати показують, що зміна профілю плоїдності може тепер розглядатися як маркер метаболічних розладів печінки.

Висновки.

Тривале центральне блокування синтезу лютеїнізуючого гормону триптореліном, призводить до розвитку окисного пошкодження паренхіми печінки. Реакція паренхіми печінки проявлялася збільшенням індексу плоїдності, індексу ядерності та кількості мітозів в гепатоцитах на більш пізніх термінах дослідження. Кверцетин позитивно впливає на перебіг окисидативного стресу в печінці.

Перспективи подальших досліджень.

Мітотичні порушення в гепатоцитах є важливим маркером у розвитку печінкових патологій. Дослідження механізмів цих порушень дозволяє розробляти нові підходи до терапії та профілактики захворювань печінки. Перспективним, на наш погляд, є виявлення шляхів впливу рібофлаваноїдів, а саме кверцетину, на можливість коригувального ефекту на структуру гепатоцитів щурів самців при тестостероніндукованих гормональних змінах.

4. Rikalo NA, Beregovko YM. Research of cell cycle phases and nuclear DNA ploidy in immature liver cells of rats with chronic toxic hepatitis and lisinopril correction. *Journal of Education, Health and Sport*. 2016;6(1):219-228. DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.45343>.
5. Vimalasvaran S, Samyn M, Dhawan A. Liver disease in adolescents. *Arch Dis Child*. 2023;108(6):427-432. DOI: [10.1136/archdis-child-2021-323647](https://doi.org/10.1136/archdis-child-2021-323647).
6. Donne R, Saroul-Aïnama M, Cordier P, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(7):391-405. DOI: [10.1038/s41575-020-0284-x](https://doi.org/10.1038/s41575-020-0284-x).
7. Hsu SH, Duncan AW. Pathological polyploidy in liver disease. *Hepatology*. 2015;62(3):968-70. DOI: [10.1002/hep.27908](https://doi.org/10.1002/hep.27908).
8. Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, et al. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives. *Cells*. 2022;11(3):552. DOI: [10.3390/cells11030552](https://doi.org/10.3390/cells11030552).
9. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front Physiol*. 2020;11:694. DOI: [10.3389/fphys.2020.00694](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694).
10. Sies H. Oxidative stress: concept and some practical aspects. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(9):852. DOI: [10.3390/antiox9090852](https://doi.org/10.3390/antiox9090852).
11. Abdelzaher WY, Abdel-Hafez SMN, Rofaeil RR, Ali AHSA, Hegazy A, Bahaa HA. The protective effect of fenofibrate, triptorelin, and their combination against premature ovarian failure in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2021;394(1):137-149. DOI: [10.1007/s00210-020-01975-2](https://doi.org/10.1007/s00210-020-01975-2).
12. Gur S, Alzweri L, Yilmaz-Oral D, Kaya-Sezginer E, AbdelMageed AB, Dick B, et al. Testosterone positively regulates functional responses and nitric oxide expression in the isolated human corpus cavernosum. *Andrology*. 2020;8(6):1824-1833. DOI: [10.1111/andr.12866](https://doi.org/10.1111/andr.12866).
13. Komura K, Sweeney CJ, Inamoto T, Ibuki N, Azuma H, Kantoff PW. Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *Int J Urol*. 2018;25(3):220-231. DOI: [10.1111/iju.13512](https://doi.org/10.1111/iju.13512).
14. Zhang Y, Zhang C, Li Z, Zeng C, Xue Z, Li E, et al. New 8-prenylated quercetin glycosides from the flowers of *Epimedium acuminatum* and their testosterone production-promoting activities. *Front Chem*. 2022;10:1014110. DOI: [10.3389/fchem.2022.1014110](https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1014110).
15. Stetsuk YeV, Akimov OYe, Shepitko KV, Goltsev AN. Role of nitric oxide in development of fibrotic changes in rats' testes after 270 day central deprivation of testosterone synthesis. *World of Medicine and Biology*. 2020;73(3): 211-215. DOI: [10.26724/2079-8334-2020-3-73-211-215](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2020-3-73-211-215).
16. Chekalina NI, Shut SV, Trybrat TA, Burmak YH, Petrov YY, Manusha YI, et al. Effect of quercetin on parameters of central hemodynamics and myocardial ischemia in patients with stable coronary heart disease. *Wiad Lek*. 2017;70(4):707-11.
17. Kostenko V, Akimov O, Gutnik O, Nazarenko S, Taran O. Modulation of redox-sensitive transcription factors with polyphenols as pathogenetically grounded approach in therapy of systemic inflammatory response *Heliyon*, 2023;9(5):e15551 DOI: [10.1016/j.heliyon.2023.e15551](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15551).
18. Amevor FK, Cui Z, Ning Z, Shu G, Du X, Jin N, et al. Dietary quercetin and vitamin E supplementation modulates the reproductive performance and antioxidant capacity of aged male breeder chickens. *Poult Sci*. 2022;101(6):101851. DOI: [10.1016/j.psj.2022.101851](https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101851).
19. Botté MC, Lerrant Y, Lozach A, Bérault A, Counis R, Kottler ML. LH down-regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor, but not GnRH, mRNA levels in the rat testis. *J Endocrinol*. 1999;162(3):409-415. DOI: [10.1677/joe.0.1620409](https://doi.org/10.1677/joe.0.1620409).
20. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. *Metodyky morfolohichnykh doslidzhen*. Vynnytsya: Nova knyha; 2016. 328 s. [in Ukrainian].
21. Gentric G, Desdouets C. Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hide? *Oncotarget*. 2015;6(11):8430-1. DOI: [10.18632/oncotarget.3809](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3809).
22. Klauinig JE. Oxidative stress and cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771-8. DOI: [10.2174/1381612825666190215121712](https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712).
23. Donne R, Sangouard F, Celton-Morizur S, Desdouets C. Hepatocyte Polyploidy: Driver or Gatekeeper of Chronic Liver Diseases. *Cancers (Basel)*. 2021;13(20):5151. DOI: [10.3390/cancers13205151](https://doi.org/10.3390/cancers13205151).
24. Polyvyana OA, Shepitko KV, Stetsuk YeV, Akimov OYe, Dubinin DS. Influence of prolonged triptorelin-induced central deprivation of testosterone synthesis on morphological structure of rat's liver. *World of Medicine and Biology*. 2021;1(75):205-209. DOI: [10.26724/2079-8334-2021-1-75-205-209](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2021-1-75-205-209).
25. Kasarinaite A, Sinton M, Saunders PTK, Hay DC. The Influence of Sex Hormones in Liver Function and Disease. *Cells*. 2023;12(12):1604. DOI: [10.3390/cells12121604](https://doi.org/10.3390/cells12121604).
26. Matsumoto T. Implications of Polyploidy and Ploidy Alterations in Hepatocytes in Liver Injuries and Cancers. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9409. DOI: [10.3390/ijms23169409](https://doi.org/10.3390/ijms23169409).
27. Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol*. 2000;10(3):161-71. DOI: [10.1006/scbi.2000.0317](https://doi.org/10.1006/scbi.2000.0317).
28. Zhang S, Lin YH, Tarlow B, Zhu H. The origins and functions of hepatic polyploidy. *Cell Cycle*. 2019;18(12):1302-1315. DOI: [10.1080/15384101.2019.1618123](https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1618123).

ДИНАМІКА ІНДЕКСУ ЯДЕРНОСТІ ТА КІЛЬКОСТІ МІТОЗІВ В ГЕПАТОЦИТАХ ЗА УМОВ ЦЕНТРАЛЬНОЇ БЛОКАДИ СИНТЕЗУ ЛЮТЕЇНІЗУЮЧОГО ГОРМОНУ З ДОДАВАННЯМ КВЕРЦЕТИНУ

Полив'яна О. А., Стецук Є. В., Шепітько В. І., Боруґа Н. В., Вілхова О. В., Пелипенко Л. Б., Лисаченко О. Д.

Резюме. Порушення мітотичної активності гепатоцитів можуть бути зумовлені впливом токсичних речовин, вірусних інфекцій, генетичних мутацій, оксидативного стресу та дефіцитом поживних елементів. Дисфункція мітозів спричиняє розвиток тяжких патологічних станів, таких як гепатоцелюлярна карцинома, фіброз, цироз і печінкова недостатність. Геномна нестабільність здатна знижувати регенеративний потенціал печінки, що негативно впливає на її функціональну активність.

Метою дослідження було визначення змін у динаміці плоїдного індексу, ядерного індексу та частоти мітозів у різних підтипах гепатоцитів за умов центрального блокування синтезу лютеїнізуючого гормону при тривалій дії триптореліну з додаванням кверцетину до раціону тварин.

Дослідження проведено на 60 статевозрілих білих щурах-самцях масою 140-160 г. Об'єктом аналізу були тканини печінки. Тварин розподілили на три групи. Контрольна група (1 група) отримувала фізіологічний розчин (10 тварин). Другій групі підшкірно вводили диферелін (триптореліну ембонат) у дозі 0,3 мг діючої речовини на 1 кг маси тіла, причому препарат мав активність протягом 365 днів (25 тварин). Третій групі було введено трипторелін у тій самій дозі (0,3 мг/кг маси тіла) у поєднанні з кверцетином, який додавали до раціону через гастральний зонд тричі на тиждень (25 тварин). Збір матеріалу здійснювали через 1, 3, 6, 9 та 12 місяців, а тварин виводили з експерименту шляхом передозування ефірного наркозу.

Було встановлено, що тривале центральне пригнічення синтезу лютеїнізуючого гормону за допомогою триптореліну викликає окисне пошкодження паренхіми печінки. Відповідь печінкової паренхіми характеризувалася підвищенням плоїдного індексу, ядерного індексу та кількості мітозів у гепатоцитах на пізніх етапах дослідження.

Кверцетин сприяє зниженню інтенсивності оксидативного стресу в печінці, позитивно впливаючи на його перебіг.

Ключові слова: печінка, гепатоцит, мітоз, тестостерон, лютеїнізуючий гормон, оксидативний стрес, кверцетин, антиоксидант, трипторелін.

DYNAMICS OF THE NUCLEAR INDEX AND MITOTIC NUMBER IN HEPATOCYTES UNDER CENTRAL BLOCKADE OF LUTEINIZING HORMONE SYNTHESIS WITH QUERCETIN SUPPLEMENTATION

Polyviana O. A., Stetsuk Ye. V., Shepitko V. I., Boruta N. V., Vilkhova O. V., Pelypenko L. B., Lysachenko O. D.

Abstract. Impaired mitotic activity of hepatocytes may result from exposure to toxic substances, viral infections, genetic mutations, oxidative stress, and nutrient deficiencies. Mitotic dysfunction contributes to the development of severe pathological conditions, including hepatocellular carcinoma, fibrosis, cirrhosis, and liver failure. Genomic instability can reduce the liver's regenerative potential, adversely affecting its functional capacity.

This study aimed to investigate the dynamics of the ploidy index, nuclear index, and mitotic frequency in different hepatocyte subtypes under conditions of central blockade of luteinizing hormone synthesis during prolonged exposure to triptorelin, with the addition of quercetin to the animal diet.

The study was conducted on 60 sexually mature male white rats weighing 140-160 g. Liver tissue was used as the object of analysis. The animals were divided into three groups. The control group (Group 1) received a saline solution (10 animals). The second group was subcutaneously injected with Diphereline (triptorelin embonate) at a dose of 0.3 mg of active ingredient per kilogram of body weight, with the drug remaining active for 365 days (25 animals). The third group received triptorelin at the same dose (0.3 mg/kg body weight) in combination with quercetin, which was administered via a gastric probe three times per week (25 animals). Tissue samples were collected at 1, 3, 6, 9, and 12 months, and the animals were euthanized by an overdose of ether anaesthesia.

Prolonged central inhibition of luteinizing hormone synthesis with triptorelin was found to cause oxidative damage to the liver parenchyma. The hepatic parenchymal response was characterized by an increase in the ploidy index, nuclear index, and mitotic number in hepatocytes at the later stages of the study.

Quercetin contributed to reducing the intensity of oxidative stress in the liver, exerting a beneficial effect on its progression.

Key words: liver, hepatocyte, mitosis, testosterone, luteinizing hormone, oxidative stress, quercetin, antioxidant, triptorelin.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Polyviana O. A.: <https://orcid.org/0000-0002-4497-1269>^B

Stetsuk Ye. V.: <https://orcid.org/0000-0002-4239-2618>^{AD}

Shepitko V. I.: <https://orcid.org/0000-0001-5570-795X>^F

Boruta N. V.: <https://orcid.org/0000-0002-9262-8967>^A

Vilkhova O. V.: <https://orcid.org/0000-0002-3371-9930>^C

Pelypenko L. B.: <https://orcid.org/0000-0002-7708-2337>^E

Lysachenko O. D.: <https://orcid.org/0000-0001-8274-3008>^E

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Stetsuk Yevhen Valeriovich / Стецук Євген Валерійович

Poltava State Medical University / Полтавський державний медичний університет

Ukraine, 36024, Poltava, 23 Shevchenko 23 str. / Адреса: Україна, 36024, м. Полтава, вул. Шевченко 23

Tel.: 0677576793 / Тел.: 0677576793

E-mail: Stetsuk78@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 14.10.2024 / Стаття надійшла 14.10.2024 року
Accepted 27.02.2025 / Стаття прийнята до друку 27.02.2025 року