Статті

Екологічні аспекти медицини

© О.А. Ножинова, О.А. Гейко, Н.А.Боброва, О.В. Бобович, В.В. Рябенко, Л.Э.Веснина, А.Л. Гаркович, И.П. Кайдашев

УДК 577.4:615.9

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ПЕЧЕНИ НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

О.А. Ножинова, О.А. Гейко, Н.А.Боброва, О.В. Бобович, В.В. Рябенко, Л.Э.Веснина, А.Л. Гаркович, И.П. Кайдашев

Украинская медицинская стоматологическая академия г.Полтава

В последнее десятилетие, благодаря развитию методов биологии и иммунологии, существенно возрос интерес биологов к механизмам и регуляции клеточной смерти. Оказалось, что все клетки многоклеточного организма и некоторые одноклеточные несут в себе генетически детерминированную программу самоубийства [10]. При активации такой программы наступает характерная клеточная смерть, получившая название апоптоз [13].

Апоптоз может быть включен множеством внутренних и внешних сигналов и направлен на освобождение от старых или наработанных в избытке клеток с нарушениями дифференцировки и повреждением генетического материала, в том числе и при вирусном заражении [2].

Морфологические признаки апоптоза, являющиеся следствием контролируемого самопереваривания, хорошо известны: сморщивание клетки, конденсация и фрагментация ядра, разрушение цитоскелета и буллезное выпячивание мембраны. Особенностью апоптоза является то, что умирающая клетка сохраняет целостность своей мембраны до полного завершения процесса, и только тогда разрушение ее оболочки является сигналом для расположенных вблизи фагоцитов к поглощению оставшихся фрагментов и завершению процесса клеточной деградации [14].

Основными маркерами, выявление которых позволяет судить о степени апоптотических процессов, являются Fas (CD 95), bcl-2, p 53, c-kit, наличие однонитиевой ДНК и фрагментов ДНК, Lewis G [9].

Одним из важных механизмов реализации программы клеточной смерти является свободнорадикальное окисление, которое принимает участие во всех стадиях апоптоза [12].

В этой связи актуальна выдвинутая перекиснокальциевая теория токсического поражения печени и гибели клеток в условиях действия высоко токсичных ксенобиотиков [4]. Наиболее подробно положения этой теории прослеживаются на модели токсического гепатита, вызванного тетрахлорметаном [5].

В литературе последних лет мы нашли сообщения о возможности эффективной экспериментальной терапии токсического поражения печени, с помощью комплекса природных полипептидов печени [1,6].

Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение влияния пептидного комплекса печени на процессы апоптоза в клетках печени, индуцированные тетрахлорметаном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования были проведены на 24 крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г. Животные были разделены на четыре группы: интактная, контрольная и две опытные. У животных контрольной и первой опытной групп вызывали токсический гепатит вследствие 4-х дневного внутримышечного введения 50% раствора тетрахлорметана (VEB Laborchemie, Apolda, GDR) в рафинированном подсолнечном масле (ГОСТ 8808-91) [8]. Крысам контрольной группы с 5 дня вводили по 0,2 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида внутримышечно, в течении 5 дней; первой опытной на фоне токсического гепатита вводили препарат пептидов печени (ППП) [7] в дозе 32,5 мг/кг внутримышечно в течении 5 дней. Второй опытной группе вводили ППП в течении 5 дней внутримышечно здоровым животным в дозе 32,5 мг/кг. После окончания срока введения препаратов животных забивали путем цервикальной дислокации. Готовили двадцати процентную взвесь клеток печени в растворе Хенкса.

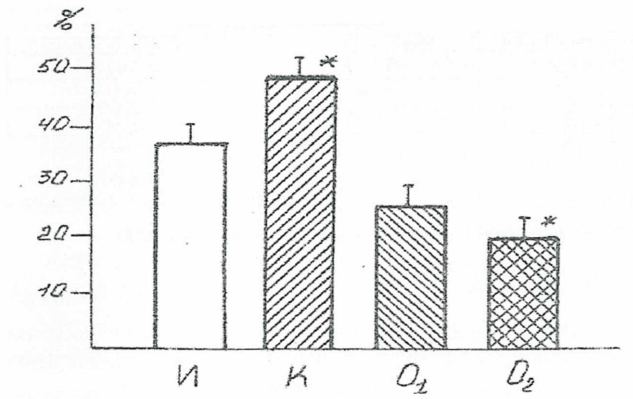

Рисунок 1. Влияние пептидного комплекса печени на показатели фрагментации ДНК у крыс при токсическом гепатите. По оси абсцисс показатели фрагментации ДНК интактной, контрольной, 1 и 2 опытных групп; по оси ординат процент фрагментации ДНК; * - <0,05.

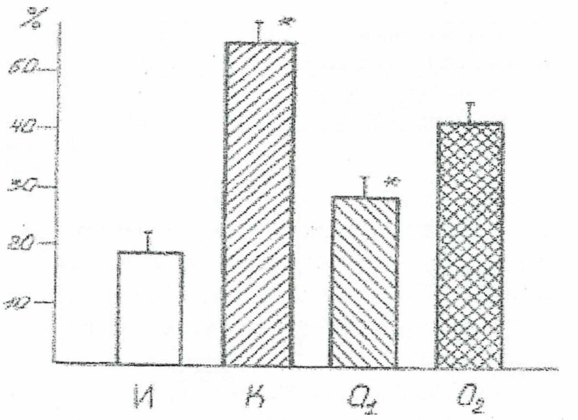

Рисунок 2. Экспрессия CD 95 на поверхности печени клеток при действии ППП в условиях токсического гепатита. По оси абсцисс показатели фрагментации ДНК интактной, контрольной, 1 и 2 опытных групп; по оси ординат процент клеток с флюоресценцией; * - < 0,05.

Из взвеси клеток печени делали мазки на обезжиренных стеклах, которые окрашивали по Маю-Грюневальду с докрашиванием по Романовскому. Методом световой микроскопии оценивали уменьшение клеток в размере, гиперхромность ядер, конденсацию и фрагментацию хроматина на 100 клеток.

ДНК из клеток печени выделяли фенол-хлороформным методом и анализировали методом электрофореза в 1,8 % агарозном геле [11] с визуализацией в УФ-свете после окраски этидиумом бромидом. Фрагментацию хроматина оценивали модифицированным методом [3].

Методом непрямой иммунофлюоресценции также определяли экспрессию CD95 на поверхности клеток печени с помощью моноклональных антител LT95 (ТОО "Сорбент", Россия) по общепринятой методике. Флюоресценцию оценивали на микроскопе ЛЮМАМ Р-8 (ЛОМО, Россия).

Данные исследований обработаны статистически с использованием коэффициента Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

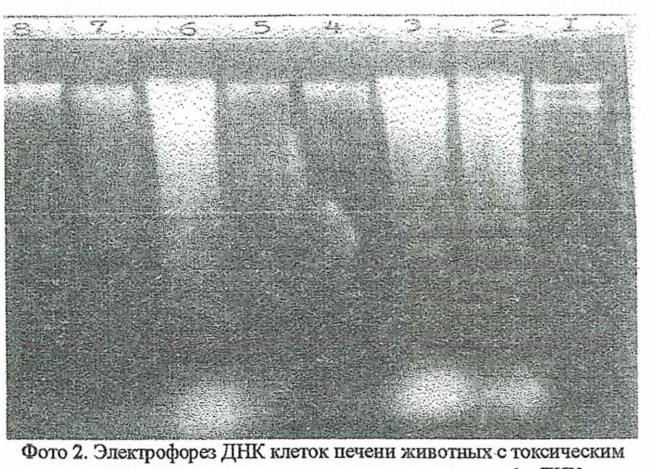

Фото 2. Электрофорез ДНК клеток печени животных с токсическим гепатитом и при введении препарата пептидов печени. 1 - ДНК лямбда фага, обработанная рестриктазой Pst 1; 2,3 - ДНК гепатоцитов животных с токсическим гепатитом; 4,5 - ДНК гепатоцитов интактных животных; 6,7 - ДНК гепатоцитов животных с гепатитом, которым вводили препарат пептидов печени; 8 - ДНК гепатоцитов здоровых животных, которым вводили препарат пептидов печени.

Как показали наши исследования, индукция у животных токсического гепатита привела к увеличению числа клеток печени с морфологическими проявлениями апоптоза. Увеличился процент клеток с уменьшенным размером ядра (фото 1), конденсацией хроматина, фрагментацией ядер (табл. 1). При электрофоретическом анализе образцов ДНК получена характерная картина фрагментации в виде "лестницы" (фото 2). Наличие фрагментации ДНК подтверждалось и при биохимическом анализе, процент фрагментированной ДНК вырос с 36 % до 47 % (рис. 1). Развитие токсического гепатита привело к усилению экспрессии CD 95 на мембранах гепатоцитов в 18 до 55 % (рис.2).

Введение таким животным препарата пептидов печени приводило к нормализации цитологических показателей гепатоцитов, уменьшался процент фрагментированной ДНК (фото 2, рис.1), снизилась экспрессия CD95.

Во второй опытной группе при введении ППП здоровым животным практически не изменялись цитологические показатели гепатоцитов и процент фрагментированной ДНК. Обращало на себя внимание усиление экспрессии CD95 в 2 раза по сравнению с интактными

Фото 1. Препарат клеточной суспензии печени животных с токсическим гепатитом. Окраска Май-Грюнвальда-Романовского. Увеличение * 300. Видны гиперхромные клетки, уменьшенные в размере.

Таблица 1. Некоторые цитологические показатели клеток печени крыс при токсическом гепатите.

Группы показатели	интактная группа	контрольная группа	опытная группа	2 опытная группа
Уменьшение размеров ядер, %	6,0±0,4	10,3±0,5	8,1±0,3*	5,8±0,4
Конденсация хроматина, %	11,7±0,7	17,4±0,7	8,2±0,6*	6,9±0,4
Фрагментация ядер, %	3,8±0,1	5,6±0,3	2,1±0,2*	5,2±0,3

Примечание: * - $p < 0,05$

животными.

Таким образом, развитие у крыс токсического гепатита привело к усилению процессов апоптоза. Усиление фрагментации ДНК до 47 % в целом соответствовало данным литературы, касающихся других тканей [17].

В работе мы исследовали экспрессию CD95 на животных. CD95 (FAS или APO-1) является членом семьи рецепторов к тумор некротическому фактору и широко распространен среди клеток разных видов. Связывание рецептора FAS с FAS-лигандом индуцирует апоптоз. Через этот рецептор действуют основные проапоптические факторы, например глюкокортикоиды [13]. Не исключено, что FAS, относящийся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (фактор роста нервов) , может быть рецептором для пока еще неизвестного цитокина [9]. Как видно из полученных результатов, при токсическом гепатите усиливалась экспрессия FAS на мембранах гепатоцитов, что может отражать повышенную чувствительность клеток к действию проапоптических факторов.

Введение ПТП приводило к снижению степени фрагментации ДНК и морфологических признаков апоптоза в гепатоцитах больных животных. Уменьшалась экспрессия CD95 на мембранах гепатоцитов. Эти результаты совместно с данными литературы, касающиеся терапевтического действия ПТП при экспериментальном токсическом гепатите [1], могут свидетельствовать о способности ПТП влиять на каскад апоптотических реакций, связанных с FAS-семейством рецепторов.

Особого внимания на наш взгляд заслуживает усиление экспрессии CD95 на мембранах гепатоцитов здоровых животных под действием ПТП. При этом мы не обнаружили усиления фрагментации ДНК, ни каких-либо цитологических признаков апоптоза. По-видимому, это может быть связано с активацией рецепторных полей гепатоцитов под действием ПТП в физиологических условиях. Такое предположение может быть подтверждено точкой зрения, что апоптоз регулируется не просто усилением экспрессии того или иного рецептора, а взаимодействием различных сигнальных путей [16].

Таким образом, для расшифровки глубоких механизмов антиапоптотического действия препарата пептидов печени, необходимо изучить его влияние на сигнальные пути, сопряженные с каскадом реакций апоптоза (протеинкиназную, протеинфосфатазную активности и т.д.). Однако уже сейчас имеются основания предполагать, что в печени может существовать система пептидной регуляции реакций, препятствующих развитию токсин-индуцированного апоптоза.

Хотим выразить благодарность Harutoshi Kizaki MD & PhD (Tokyo Dental College) за любезно предоставленные информационные материалы по методическому подходу к изучению процессов апоптоза.

Литература

1.Витковский Ю.А. Влияние полипептидов печени на иммунитет, гомеостаз и неспецифическую резистентность организма в эксперименте // Дис. к.м.н..- Чита, 1989.- 196с.

2.Владимирская Е.Б., Масчан А.А.. Румянцев А.Г. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // Гематол. и трансфузиол..- 1997.- т.42.- N.5.- С. 4-9.

3.Дмитренко Н.П., Андрийчук Т.Р., Кишко Т.О., Юркина В.О., Цудзевич Б.А. Определение повреждений ДНК в непролиферирующих клетках животных // Укр. біохім. журн. . - 1997.т.69.- N 1.- С.69-71.

4.Губський Ю.І. Молекулярні основи хімічної екології: вільнорадикальні механізми токсичної загибелі клітини // Проб. екол. та мед..- 1997.- Т.1 N.1-2.- С.6-9.

5.Губський Ю.И. Коррекция химического поражения печени. -Киев: Здоров'я, 1989.- 168с.

6.Катрушов О.В. Використання нових органоспецифічних поліпептидних препаратів для експериментальної терапії, патології, викликаних пошкоджуючими факторами навколишнього середовища / Автореф. дис. ... д.м.н. Київ, 1995.40с.

7.Патент 10180А Україна. МКІ А61К37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та моделюючу дію / Кайдашев І.П., Катрушов О.В. // Промислова власність.- 1996 .-N.3.- С.3.1.76-3.1.77.

8.Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині / Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін. Під ред. Кайдашева І.П., Катрушова О.В., Соколенко В.М. - Полтава: Вид-во УМСА, 1996.- С.205-206.

9.Чередеев А.Н.. Ковальчук Л.В. Апоптоз как важнейший этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу // Клин. лаб. диагн. .- 1997.- N.7.- С. 31-35.

10.Arends M.J., Wyllie A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathologi // Int. Rev. Exp. Pathol. .- 1991.- N.32.P. 233- 254.

11.Asuma G., Onichi G., Sato G., Kizaki H. Effekts of protein Tyrosine Kinase inhibitors with. Different Modes of Action on Teroisomerase activity and Death of IL-2dependent CTLL-2 cells // J. Biochem..- 1995.- N.118.P.312-318.

12.Haecker G., Vaux D.L., Viral, worm and radical implications for apoptosis // TIB S.- 1994.- March.P.99-100.

13.Onishi G., Takimoto G., Kisaki H. Inflamation and apoptosis //Bull. Tokyo dent. Coll. .- 1997.- v. 38.- N. 2.- P. 65-76.

14.Kerr J.F.R., Searle F., Harmon B.W. Apoptosis. In Perspectives on Mammalian Cell Death (C.S. Potten ed.) // Oxford Sciens Pub., Oxford.- 1987.- P. 93-128.

15.Kerr J.F.R., Wylli A.H., Currie A.R. Apoptosis: A basic biological phenomen with-ranging implication in tissne kinetcs // British f. Patrol. .- 1972.- N.26.- P. 239-257.

16.Kizaki H., Tada-Kyma T. Tymocyte apoptosis // Microbial Imunol. .- 1993.- N. 37 .- P.917-925.
17.Nishimoto G., Onichi G., Sato G., Kizaki H. Protein syntehesis dependent and independent apoptosis of murine splenic T cells // Bull. Tokyo dent. Coll. .- 1997.- v. 38.- N.2.- P.133-138.

The influence of liver peptide complex on apoptotic process in hepatocytes by tetrachlorcarbon

O.A.Nozhinova, O.A.Geyko, N.A.Bobrova, O.B.Bobovich, V.V.Riabenko, L.E.Vesnina, A.L.Garcovich, I.P.Kaidashev

We studied the influence of liver peptide complex on apoptosis in hepatocytes by the toxic hepatitis induced by tetrachlorcarbon.

By the cytological analisis of hepatocytes, electrophoresis of DNA in agarose gel, DNA fragmentation and APO-1 expression it was shown apoptosis in hepatocytes under the action of tetrachlorcarbon.

We found out the normalization of cytological criteria of hepatocites, the decreasing of DNA fragmentation and APO-1 expression by the infection of liver peptide complex.

Administration of liver peptide complex to normal animals lead to the increasing of APO-1 expression om hepatocyte membranes without any increasing of DNA fragmentation or cytological criteria of apoptosis. We suggest that this phenomen was connected with activation of receptors' fields on hepatocyte membranes.

Our resuls support the point of view about the exsistence of peptide regulative system in liver wich inhibite the development of toxin-induced apoptosis.

314024, Shevchenko str. 23, Poltava, Ukraine
Ukrainian Medical Stomatological Academy
Ministry of the Health Public Service of Ukraine

Матеріал надійшов до редакції 10/III/98

© Гаркович О.Л., Цебржинський О.І., Куценко Л.О.
УДК 615.36:615.45

РЕГУЛЯТОРНА ДІЯ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ, ОДЕРЖАНОГО З ТКАНИН ПЕЧІНКИ, НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ В ЦЬОМУ ОРГАНІ ПРИ АЛКОГОЛЬНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ

Гаркович О.Л., Цебржинський О.І., Куценко Л.О.
Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Для живого організму характерним є стан високої впорядкованості, тобто суворе узгодження всіх процесів, що відбуваються в ньому. В усіх випадках діють контролюючі механізми, що забезпечують високий рівень пристосованості живих організмів до відповідної ситуації. Це відбувається при функціонуванні цілісного каскаду регуляторних систем. На сьогодні відомо багато таких регуляторних систем, але пріоритетним напрямком біології є вивчення пептидергічної регуляції, про наявність якої свідчать переконливі дані [4, 6, 9].

Нами було одержано пептидний комплекс з тканин печінки [16] і вже досліджено його вплив на регуляцію пігментного обміну в печінці [2].

Наступним нашим кроком стало вивчення ролі пептид ного комплексу, виділеного з тканин печінки, на перебіг ліпідного обміну.

Як відомо із літературних джерел, введення етилового спирту протягом 14 днів викликає значні порушення в багатоступінчатому каскаді біохімічних реакцій, що контролюють ліпідний обмін, або навіть може призвести до жирового переродження печінки [14]. Близько 96 % етилового спирту окислюється саме в цьому органі [7]. Головним шляхом окислення етанолу є цитоплазматичний алкогольдегідрогеназний шлях, за участю якого піддається метаболізму близько 80 % етанолу, остання частина перетворюється за участю цитохром Р-450-залежної мікросомальної системи та ката-