

© Д.Л.Тёплый, Д.С.Суханов, Е.Д.Бажанова
УДК 576.36:616.36:599.323.4

Д.Л.Тёплый¹, Д.С.Суханов² и Е.Д.Бажанова³

МЕХАНИЗМ АПОПТОЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

¹ Кафедра физиологии и морфологии человека и животных (зав. — проф. Д.Л.Тёплый), Астраханский государственный университет; ² кафедра фтизиопульмонологии и торакальной хирургии (зав. — проф. А.В.Елькин), Северо-Западный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург; ³ лаборатория сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии (зав. — д-р мед. наук Г.А.Оганесян), Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Одной из причин лекарственной гепатопатии является апоптоз гепатоцитов, механизмы которого до сих пор неясны. В опытах на 24 крысах линии Вистар изучена роль гепатопротекторов в регуляции апоптоза гепатоцитов при экспериментальном поражении печени, вызванном введением противотуберкулезных препаратов (ПТП). Оценивали уровень апоптоза (TUNEL), экспрессию апоптоз-ассоциированных молекул (иммуногистохимия, Western blotting). Показано, что сигнальный каскад при введении ПТП включает активацию поверхностных клеточных рецепторов CD95 и каспазы-8, т.е. апоптоз идет по внешнерецепторному пути. Кроме того, индуцируется синтез онкосупрессора p53 с дальнейшей активацией эффекторной каспазы-3. Введение рунихола на фоне ПТП улучшает состояние печени, несмотря на некоторый апоптозстимулирующий эффект, осуществляемый посредством внутреннего пути. Выявлено, что одновременно рунихол блокирует FAS- и p53-зависимый путь. Экзогенный адеметионин при лекарственной интоксикации действует как гепатопротектор, блокируя внешнерецепторный и p53-зависимый пути.

Ключевые слова: гепатоциты, апоптоз, лекарственные поражения печени, туберкулёз, гепатопротекторы

В настоящее время показано, что морфологической основой для развития заболеваний многих органов, в том числе печени, служит апоптоз [4, 14]. Запрограммированная клеточная гибель (апоптоз) гепатоцитов играет важную роль в патогенезе гепатитов, в том числе вирусных [4], канцерогенезе [8, 10] алкогольного [9] или лекарственного повреждения печени [12, 15]. Лечение тяжелых хронических заболеваний, к которым относится и туберкулез, связано с длительными курсами сильнодействующих препаратов, что во многих случаях приводит к лекарственной гепатопатии [2, 3]. Однако до сих пор не выявлен сигнальный каскад апоптоза при действии противотуберкулезных препаратов (ПТП) 1-го ряда, а также механизм регуляции данного процесса гепатопротекторами.

Цель нашего исследования — изучить механизмы апоптоза гепатоцитов, индуцированного введением ПТП, а также возможное участие гепатопротекторов рунихол и адеметионин в регуляции клеточной гибели.

Материал и методы. Работа проведена на крысах-самцах линии Вистар. Поражение печени моделировали введением ПТП в течение 14 сут в следующих дозах: изониазид 50 мг/кг, подкожно+рифампицин 250 мг/кг, внутривенно (в/в)+пиразинамид 45 мг/кг, в/ж [8]. Гепатопротекторы (рунихол и адеметионин) вводили ежедневно в те же сроки за 1,5 ч до введения ПТП. Рунихол — новый метионин- и сукцинатсодержащий таблетированный препарат, являющийся комплексным субстратным антигипоксантом и гепатотропным средством метаболического действия. В состав препарата входят янтарная кислота, метионин, инозин, таурин. Метионин способен к превращению в организме в адеметионин под действием метионинаденосилтрансферазы (MAT), является эндогенным донором метильной группы. Адеметионин участвует в биологических реакциях трансметилирования, обеспечивающих текучесть и поляризацию мембран за счет увеличения содержания фосфолипидов, и транссульфатирования, восстанавливающих пул эндогенного глутатиона [11]. Изучены следующие группы, по 6 животных в каждой: 1-я группа — интактные крысы (контроль); 2-я группа — крысы, получавшие ПТП; 3-я группа — крысы, получавшие ПТП+рунихол в/ж 396 мг/кг; 4-я группа — крысы, получавшие ПТП+адеметионин в/ж 230 мг/кг (гепатопротектор, уже используемый в клинике). Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с директивами Совета Европейских сообществ от 24.11.1986 (86/609/ЕЕС).

Сведения об авторах:

Тёплый Давид Львович, кафедра физиологии и морфологии человека и животных, Астраханский государственный университет, 414056, Астрахань, ул. Татищева, 20а

Суханов Дмитрий Сергеевич (e-mail: dmitriysukhanovl@mail.ru), кафедра фтизиопульмонологии и торакальной хирургии, Северо-Западный медицинский университет им. И.И.Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

Бажанова Елена Давыдовна (e-mail: bazhanovae@mail.ru), лаборатория сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

По окончании эксперимента животных декапитировали и извлекали печень для исследования. После фиксации в 4% формалине образцы печени замораживали для получения криостатных срезов толщиной 6 мкм.

Оценивали уровень апоптоза гепатоцитов (метод TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling, нерадиоактивное мечение биотином, выявление диаминобензидином) с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидил-трансферазы для выявления разрывов ДНК (Sileks, Россия). Иммуногистохимически выявляли рецептор CD95, принадлежащий к суперсемейству фактора некроза опухолей с использованием немеченых поликлональных антител к CD95 (Abcam, США). Анализ изображений после выполнения иммуногистохимической реакции и TUNEL выполнен с помощью микроскопа PFM (WPI, США) и видеокамеры DIC-E (WPI, США), Leica DFC 300 FX (Leica, Германия), разрешение 1392×1040 пикселей с последующей денситометрией (VideoTest Software, Россия). Определяли оптическую плотность иммунореактивного вещества в CD95⁺-клетках на 5–6 срезах печени у каждого животного и группы крыс. Количество апоптотических клеток (TUNEL-позитивных гепатоцитов) подсчитывали на 5–6 срезах печени у каждой крысы с последующим определением среднего количества в группе.

Для выявления экспрессии апоптоз-ассоциированных молекул в печени проводили Western blotting с немечеными поликлональными антителами к проапоптотическим ферментам каспазе-8 (Abcam, США) и каспазе-3 (Cell Signaling, США), а также с немечеными моноклональными антителами к p53 (Abcam, USA). В качестве контроля количества белка был сделан Western blotting с немечеными моноклональными антителами к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) (Abcam, США). GAPDH в большом количестве присутствует в клетке и играет важную роль в энергетических процессах, с другой стороны — выполняет много функций, не связанных с гликолизом (регуляция трансляции, ядерный экспорт РНК, репликация и репарация ДНК). Ее используют в качестве контроля содержания белка в пробе при методике Western blotting. Уровень экспрессии изученных белков определяли с помощью денситометрии (ImageJ, США).

Для оценки моделируемых патологических процессов и эффективности изученных гепатопротекторов проводили морфологическое описание изменений на срезах печени (окраска гематоксилином – эозином) (БИОЛАМ И, Россия).

В связи с однородностью содержания животных в исследуемых группах и невозможностью опровергнуть нулевую гипотезу о нормальности распределения из-за небольшого количества единиц наблюдения в статистической обработке использованы методы, применяемые для нормального распределения данных. Результаты подвергали статистической обработке путем расчета среднего арифметического (\bar{x}) и его стандартной ошибки ($\pm s_{\bar{x}}$). Обработку полученных результатов проводили с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для множественного сравнения выборочных средних. При опровержении нулевой гипотезы о равенстве средних исследуемых групп использовали попарное сравнение с помощью теста Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Введение ПТП вызывает дистрофические изменения с отдельными зонами некроза в печени и приводит

к увеличению количества гепатоцитов, подвергшихся запрограммированной клеточной смерти (рис. 1).

На срезах печени крыс данной группы обнаружено нарушение общей структуры долек, нечеткость радиальности печеночных пластинок. Центральные вены и внутريدольковые капилляры сужены. Форма центральных вен искажена, диаметр расширен в сравнении с выявленным в контроле. На отдельных препаратах периваскулярный выпот, лишенный клеточного содержимого. Желчные протоки расширены. В некоторых дольках зоны некроза. Гепатоциты — набухшие, цитоплазма в основном мелкозернистая, реже — гомогенная, слабо базофильная. Размеры округлых ядер увеличены, ядра нередко смещены к периферии гепатоцитов. Характер структурных изменений в печени крыс, получавших ПТП, свидетельствует о развитии дистрофических процессов, вероятно, токсической природы, с отдельными зонами некроза. Что касается топографии дистрофических изменений и зон некроза, то они в разной степени тяжести определяются в периферических частях долек. Однако распределение TUNEL- и CD95-иммунопозитивных клеток не показало какой-либо связи с топографией долек печени.

Выявлено, что в условиях токсической гепатопатии (введение ПТП) адеметионин оказывает апоптоз-ингибирующее действие (см. рис. 1, рис. 2). В группе крыс, получавших ПТП, наблюдалось повышение экспрессии CD95 (FAS/APO1)

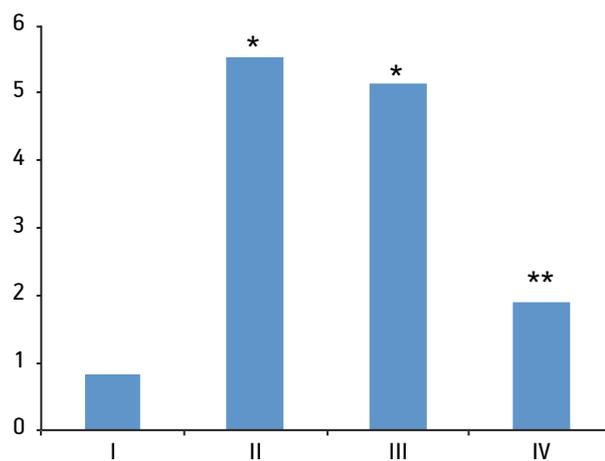


Рис. 1. Доля гепатоцитов с признаками апоптоза у крыс после введения противотуберкулезных препаратов (ПТП) 1-го ряда и гепатопротекторов.

По горизонтальной оси — группы животных: I — интактные крысы (контроль); II — ПТП; III — ПТП+рунихол; IV — ПТП+адеметионин; по оси ординат — исследуемый показатель (%); одна звездочка — различия значимы при $P < 0,05$ по сравнению с контролем; две звездочки — по сравнению с показателями в группе животных, получавших ПТП

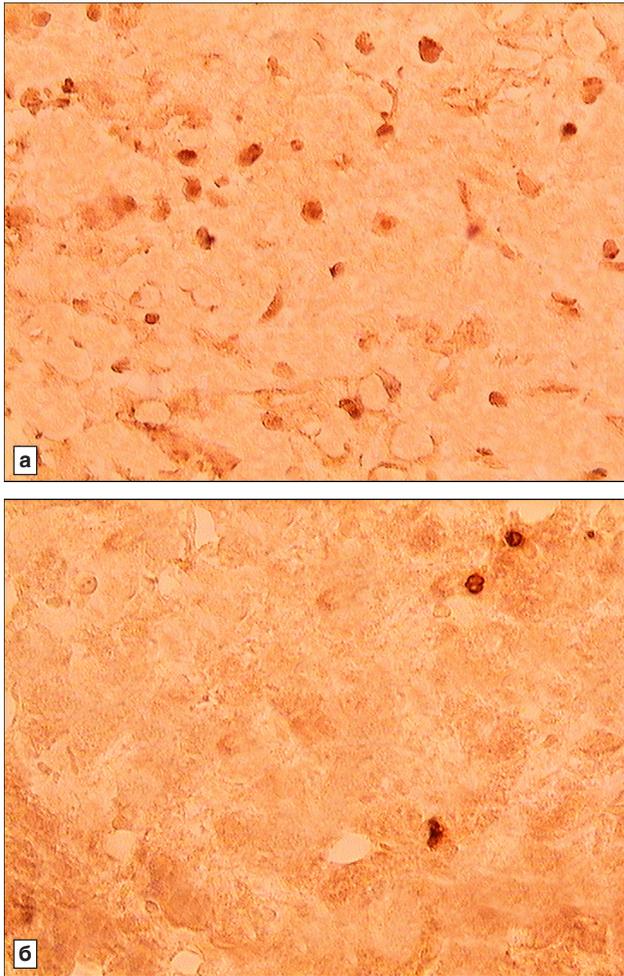


Рис. 2. Печень крысы, получавшей противотуберкулезные препараты (ПТП) 1-го ряда (а) и получавшей ПТП с одновременным введением рунихола (б).

а — большое количество апоптотических клеток; б — незначительное количество апоптотических клеток (темноокрашенные клетки). Метод TUNEL. Об.40, ок. 10

(рис. 3, 4) с одновременным увеличением синтеза каспазы-8 (см. рис. 3). Введение гепатопротекторов не привело к изменению синтеза CD95, однако действие рунихола стимулирует экспрессию каспазы-8 в отличие от адеметионина (см. рис. 3).

В данном эксперименте наблюдалось повышение экспрессии p53 в печени у крыс, получавших только ПТП (рис. 5). Ни рунихол, ни адеметионин не индуцируют синтез p53. Отмечена сверхэкспрессия каспазы-3 при возрастании уровня апоптоза гепатоцитов (введение ПТП, а также ПТП одновременно с рунихолом). При этом на срезах печени животных, получавших ПТП и рунихол, наблюдалось уменьшение выраженности патологических явлений. Невысокая экспрессия каспазы-3 при действии адеметионина соответствует низкому уровню апоптоза, так же как и в контрольной группе крыс.

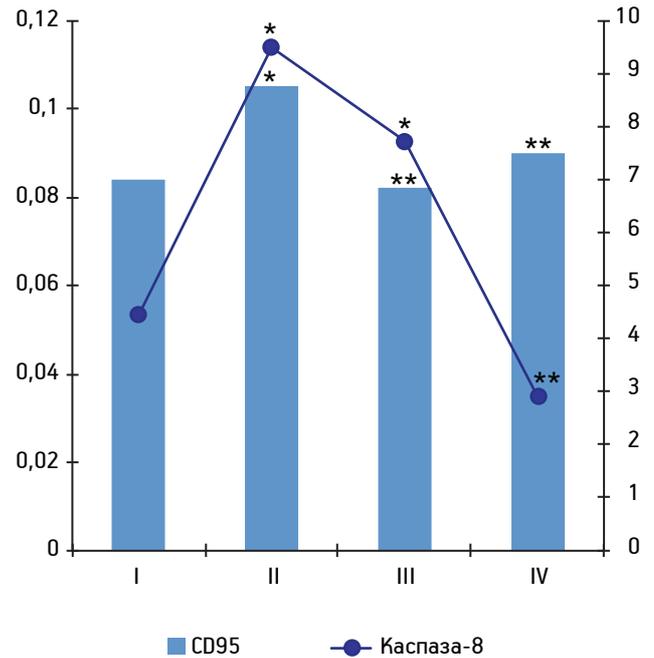


Рис. 3. Количество CD95⁺ (FAS)- и каспаза-8-иммунореактивного материала в гепатоцитах у крыс, получавших противотуберкулезные препараты 1-го ряда и гепатопротекторы.

По осям ординат: исследованные показатели — слева CD95⁺ (усл. ед.); справа — каспаза-8 (усл. ед.). Остальные обозначения те же, что на рис. 1

Обсуждение полученных данных. Для подбора этиопатогенетически верной терапии лекарственной гепатопатии крайне важно ясно представлять механизмы развития апоптоза гепатоцитов. Как известно, апоптотический сигнал может опосредоваться несколькими путями — поверхностно-рецепторным (внешний), митохондриальным (внутренний), p53-зависимым. В нашем эксперименте показано, что апоптоз является значимым механизмом токсической гепатопатии, вызванной введением ПТП, о чем свидетельствует увеличение доли гибнущих гепатоцитов в сочетании с морфологическими признаками дистрофии печени. Сигнальный каскад апоптоза при введении ПТП включает в себя активацию поверхностных клеточных рецепторов CD95 (FAS/APO1) (член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей — ФНО) и каспазу-8, т.е. апоптоз идет по внешнерепторному пути. Кроме того, ПТП стимулируют синтез одного из важнейших индукторов апоптоза — онкосупрессора p53 с дальнейшей активацией эффекторной каспазы-3.

Действие препарата рунихола осуществлялось посредством внутреннего пути, без активации рецепторов CD95, но с повышением экспрессии каспазы-8 и каспазы-3. Вероятно, таурин, входящий в состав рунихола, ингибирует цитокины,

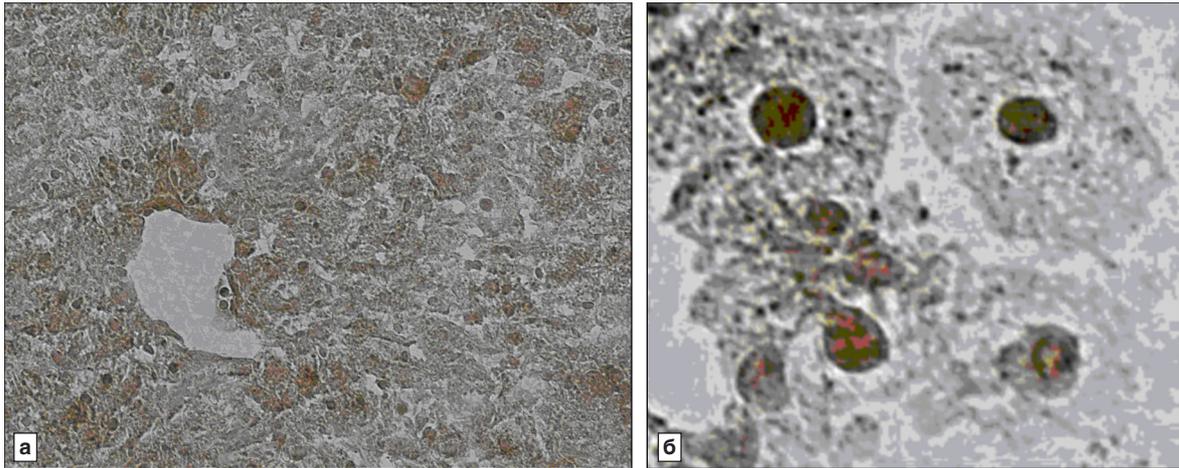


Рис. 4. Печень крысы, получавшей противотуберкулезные препараты 1-го ряда.

Большое количество CD95⁺-иммунореактивных клеток (с темноокрашенными ядрами). Иммуногистохимическая реакция.
Ув.: а — 400; б — 630

к которым относится и CD95 [1], а также блокирует p53-зависимый путь. Введение рунихола на фоне ПТП предупреждает развитие некроза, улучшая микроструктурное состояние печени, несмотря на то, что уровень апоптоза не снижается. Как известно, процесс апоптоза, в отличие от некроза, протекает без воспаления и, видимо, именно за счет отсутствия воспаления и «прицельной» гибели поврежденных гепатоцитов при введении рунихола наблюдается общее улучшение гистологической картины. Можно предположить, что важную роль играет антигипоксическое и антиоксидантное действие рунихола за счет входящих в его состав янтарной кислоты и инозина, что было показано ранее. Данные свойства янтарной кислоты и инозина имеют большое значение для стабилизации мембран клеток, особенно в условиях патологии [5]. В работах других авторов выявлен антиапоптотический эффект янтарной кислоты — показано снижение уровня апоптоза лимфоцитов и гранулоцитов крови, снижение содержания в крови ФНО- α [6]. Однако есть и противоположные данные — о стимуляции апоптотической гибели клеток препаратами, в состав которых входит янтарная кислота [7]. Возможно, имеет значение дозозависимый эффект, и предупреждают апоптоз только препараты, содержащие высокие дозы янтарной кислоты. Дозозависимый эффект, вероятно, проявляется также в отношении содержащегося в препарате «Рунихол» метионина, который еще должен превратиться в организме в адеметионин, причем количество его значительно меньше, чем в препарате «Адемeтионин». Видимо, метионин в низких дозах не дает апоптоз-ингибирующего эффекта.

Выявлено, что в условиях токсической гепатопатии (введение ПТП) адеметионин оказывает

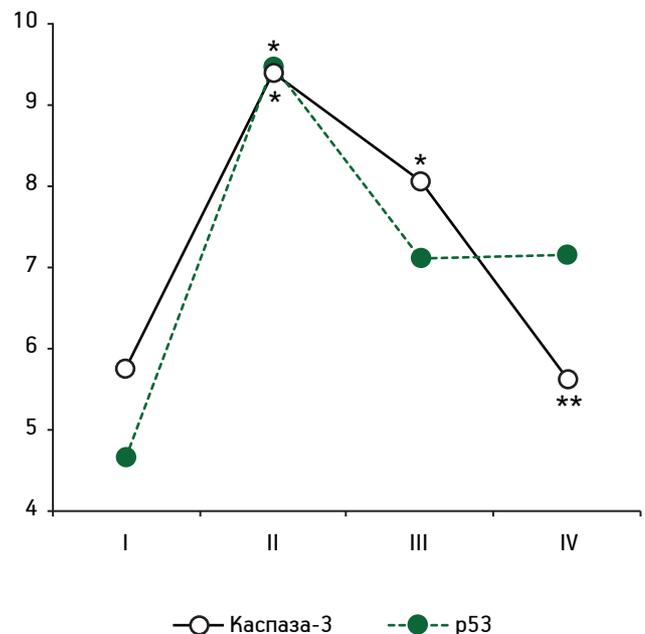


Рис. 5. Количество p53- и каспаза-3-иммунореактивного материала в гепатоцитах у крыс, получавших противотуберкулезные препараты 1-го ряда и гепатопротекторы.

По оси ординат — исследованный показатель (усл. ед.).
Остальные обозначения те же, что на рис. 1

апоптоз-ингибирующее действие, причем низкий уровень апоптоза гепатоцитов коррелирует с нормальной экспрессией белка p53 и каспазы-3. По данным литературы, снижение содержания адеметионина приводит к апоптозу клеток. Основным регулятором синтеза адеметионина является МАТ. Ген, кодирующий МАТ, содержит сайт AP-1, который является ключевым регулятором процессов пролиферации и апоптоза [13]. Можно предположить, что супрессия данного гена при какой-либо патологии приводит к снижению экспрессии МАТ, далее — синтеза эндогенного адеме-

тионина, и к повышению уровня апоптоза. Таким образом, результаты эксперимента показали, что экзогенный адеметионин при лекарственной интоксикации снижает повреждение структуры печени, блокируя внешнерцепторный (супрессия синтеза CD95 и каспазы-8) и p53-зависимый пути апоптоза.

ЛИТЕРАТУРА

- Аметов А.С., Кочергина И.И., Доскина Е.В. и др. Таурин в комплексной терапии метаболического синдрома и сахарного диабета. Тер. арх., 2011, т. 83, № 10, с. 31–36.
- Больф С.Б., Суханов Д.С. и Романцов М.Г. Медикаментозные поражения печени при полихимиотерапии туберкулеза. Вестн. Санкт-Петербургск. гос. мед. акад. им. И.И. Мечникова, 2009, № 1, с. 172–176.
- Борзакова С.Н., Аксенова Б.А. и Рейзис А.Р. Лекарственные поражения печени у детей, больных туберкулезом. Туберкулез и бол. лёгких, 2010, № 8, с. 3–12.
- Дмитриева Е.В., Москалева Е.Ю., Коган Е.А. и др. Роль системы fas/fasL в индукции апоптоза гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах. Арх. пат., 2003, т. 65, № 6, с. 13–17.
- Суханов Д.С. Антиоксидантные свойства ремаксола, реамберина и адеметионина при лекарственных поражениях печени у больных на фоне противотуберкулезной терапии. Тер. арх., 2012, т. 84, № 11, с. 26–29.
- Удут В.В., Венгеровский А.И. и Дыгай А.М. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на процессы апоптоза при экспериментальной патологии печени, вызванной изониазидом и парацетамолом. Бюл. эксп. биол., 2012, т. 154, № 11, с. 568–571.
- Hazalin N.A., Ramasamy K., Lim S.M. et al. Induction of apoptosis against cancer cell lines by four ascomycetes (endophytes) from Malaysian rainforest. Phytomedicine, 2012, v.19, № 7, p. 609–617.
- Miao H.L., Lei C.J., Wen J.Y. et al. Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of YAP. J. Cell Biochem., 2013, v. 114, № 3, p. 625–631.
- Natori S., Rust C., Stadheim L.M. et al. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. J. Hepatol., 2001, v. 34, p. 248–253.
- Sakulnarmrat K., Fenech M., Thomas P. and Konczak I. Cytoprotective and pro-apoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. Food Chem., 2013, v.136, № 1, p. 9–17.
- Santini D., Vincenzi B., Massaceisi C. et al. S-Adenosylmethionine supplementation for treatment of chemotherapy-induced liver injury. Anticancer Res., 2003, v. 23 (6D), p. 5173–5179.
- Sharma M., Gadang V. and Jaeschke A. Critical Role for Mixed-lineage Kinase 3 in Acetaminophen-induced Hepatotoxicity. Mol. Pharmacol., 2012, v. 82, № 5, p. 1001–1007.
- Tomasi M.L., Ryou M., Skay A. et al. Polyamine and methionine adenosyltransferase 2A crosstalk in human colon and liver cancer. Exp. Cell Res., 2013, v. 319, № 12, p. 1902–1911.
- Zhang Y., Zhang B., Zhang A. et al. Synergistic growth inhibition by sorafenib and vitamin K2 in human hepatocellular carcinoma cells. Clinics (Sao Paulo), 2012, v. 67, № 9, p. 1093–1099.
- Zhao X., Cong X., Zheng L. et al. Dioscin, a natural steroid saponin, shows remarkable protective effect against acetaminophen-induced liver damage in vitro and in vivo. Toxicol Lett, 2012, v. 214, № 1, p. 69–80.

Поступила в реакцию 04.07.2013

Получена после доработки 20.10.2013

MECHANISM OF HEPATOCYTE APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL TOXIC LIVER INJURY

D.L. Teplyi¹, D.S. Sukhanov² and Ye.D. Bazhanova³

One of the causes of drug hepatopathy is hepatocyte apoptosis, the mechanisms of which are still unclear. The experiments were performed in 24 Wistar rats to study the role of hepatoprotectors in the regulation of hepatocyte apoptosis in liver damage induced by administration of antituberculosis drugs (ATD). The level of apoptosis (TUNEL) was evaluated, and the expression of apoptosis-associated molecules was detected by immunohistochemistry and Western blotting. It was shown that a signaling cascade induced by ATD involved the activation of cell surface receptors (CD95) and caspase-8, i.e. apoptosis was mediated by extrinsic pathway. In addition, ATD induced p53 oncosuppressor synthesis with further activation of caspase-3 effector. Runihol administration during ATD treatment administration improved the condition of the liver, despite some apoptosis stimulating effect, mediated by an intrinsic pathway. It was found that runihol blocked both FAS- and p53-dependent pathways. Ademetionine during drug intoxication acts as a hepatoprotector, blocking extrinsic and p53-dependent pathways.

Key words: *hepatocytes, apoptotic, drug liver injury, tuberculosis, hepatoprotectors*

¹ Department of Human and Animal Physiology and Morphology, Astrakhan State University; ² Department of Phthiopulmonology and Thoracic Surgery, I.I. Mechnikov North-Western Medical University; Laboratory of Comparative Somnology and Neurology, ³ I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, Russia