

УДК 616.36:577.21

Н.А. Рикало,

Л.О. Яровенко

Вінницький національний медичний
університет ім. М.І. Пирогова

ФРАГМЕНТАЦІЯ ЯДЕРНОЇ ДНК ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ ХРОНІЧНОМУ АЛКОГОЛЬНОМУ УШКОДЖЕННІ ПЕЧІНКИ. ПРИНЦИПИ АНТИАПОПТИЧНОЇ ТЕРАПІЇ

Ключові слова: фрагментація ядерної ДНК, гепатоцити, хронічне алкогольне ушкодження печінки, кверцетин, L-аргінін L-глутамат.

Резюме. У даній роботі представлено дані отриманіза допомогою методу цитофлуориметрії. Проведено дослідження фрагментації ядерної ДНК гепатоцитів у щурів-самок різних вікових груп за умов експериментального хронічного алкогольного ушкодження печінки та при проведенні фармакокорекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом. Доведено, що у щурів усіх вікових груп при ХАУП збільшується фрагментація ядерної ДНК клітин печінки та відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у G2M-фазі при зменшенні відсотка ядер клітин печінки, які перебувають у S-фазі. Встановлено, що "Кверцетин" та "Глутаргін" можуть використовуватись як антиапоптичні препарати при хронічних алкогольних патологіях печінки.

Вступ

Як відомо, завершальним етапом ушкодження тканин організму, є їх загибель. Однак механізми загибелі клітин і тканин в умовах норми та при патологічних процесах значно відрізняються [9]. Останнім часом інтерес до механізмів реалізації даних процесів значно підвищився та відноситься до однієї з актуальних проблем сучасної медицини.

На клітинному рівні постійно протікають протилежно направлені процеси мітотичного поділу та дозрівання клітин, які супроводжуються альтернативним процесом видалення старих, ушкоджених, мутованих та інших небажаних для організму клітин. Порушення контролю за цими процесами призводить до розладів гомеостазу та розвитку патологічних станів [4, 5]. Високорегульовану форму програмованої смерті клітин з характерними морфологічними та біохімічними ознаками визначають як апоптоз. Апоптозу належить важлива роль як у фізіологічних (забезпечує сталість гомеостазу), так і в патологічних процесах [4, 12], оскільки неадекватна активація апоптозу та зниження апоптичної загибелі клітин (спричинене мутацією гена, що кодує проапоптогенний білок p53, є одним із найважливіших факторів канцерогенезу), веде до руйнування тканини, розвитку патологічних змін органів та недостатності регенераторного потенціалу тканин [1, 2]. Крім того, останні дослідження Н.А. Рикало (2013 р.) вказують на важливу роль інтенсифікації апоптозу гепатоцитів у патогенезі хронічних токсичних гепатитів та хронічних вірусних гепатитів В і С [7, 9], що сприяє прогресуванню захворювання. Закономірності процесів апоптозу

та репаративної регенерації при хронічних алкогольних ушкодженнях печінки (ХАУП) на сьогодні залишаються невивченими та перспективними для дослідження враховуючи поширеність даних патологій. Патогенетичне лікування та фармакокорекція ХАУП обов'язково має бути направлена на зниження патогенно індукованого апоптозу та підвищення репаративної регенерації тканини печінки [11, 13]. Для реалізації завдань роботи застосовували високоінформативний метод цитофлуориметрії, який широко використовується в біологічних, медичних наукових дослідженнях та клінічній практиці. Отримані ДНК-гістограми дозволяють чітко ідентифікувати та підрахувати відсоток ядер клітин печінки, що знаходяться у різних періодах клітинного циклу. Також даний метод допоможе визначити найважливішу складову апоптозу, а саме фрагментацію ядерної ДНК.

Мета дослідження

Дослідити ефективність застосування кверцетину та L-аргініну L-глутамату для фармакокорекції патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів у щурів різних вікових періодів при ХАУП.

Матеріал і методи

Експериментальні дослідження на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (ст. 230 від 2006 р.), відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей"

(Страсбург, 1985), "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", схвалених Першим Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна).

У експерименті використано 72 білих лабораторних щурів трьох вікових періодів: I група - статевонезрілі (вагою 60-75 г., n=24); II група - молоді статевозрілі (вагою 185-195 г., n=24); 3 група - старі щури (вагою 300-320 г., n=24). Дані вікові групи в свою чергу були поділені на наступні підгрупи по 6 тварин у кожній: 1 - інтактні тварини; 2 - тварини з ХАУП, яке проводилось за методикою Г.А. Ковальова та А.Ю. Петренка (2004) [3]; 3 - тварини з ХАУП при корекції кверцетином (100мг/кг); 4 - тварини з ХАУП при корекції L-аргініном L-глутаматом (35 мг/кг). Дані препарати щоденно інтрагастрально вводились піддослідним тваринам на протязі одинадцяти тижнів. Перерахунок середньотерапевтичної лікувальної дози рекомендованої для людини на 1 кг. маси тіла на масу щура проводився за константою біологічної активності [10].

Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Печінку щурів негайно вилучили. Суспензії ядер з клітин печінки одержували за допомогою набору "CyStainDNA" фірми "Partec" (Німеччина) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Цитофлуориметричний аналіз проводився на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "PartecPAS" фірми Partec (Німеччина) у НДЦ ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Фрагментація ДНК виконано програмними засобами FloMax (фірма Partec, Німеччина) методом виділення Sub-G1 ділянки на ДНК-гістограмах, яка представлена на гістограмі інтервалом RN1 [7].

Обговорення результатів дослідження

Відомо, що клітинний цикл (КЦ) - період життя гепатоцита від одного поділу до іншого або від поділу до смерті. Інтерфаза має послідовні періоди: пресинтетичний (G1), синтетичний (S), постсинтетичний (G2). У G1-періоді клітина інтенсивно росте, в ній збільшується кількість цитоплазми і органел, відбувається підготовка до подвоєння ДНК. В S-періоді відбувається реплікація ДНК. G2-період триває до початку мітозу. У цей період синтезуються РНК і загальні білки клітини, а також інтенсивно утворюються структури, що беруть участь у мітозі. Регуляція клітинного циклу здійснюється гормонами, факторами росту та іншими механізмами, які здатні впливати на синтез (білки-цикліни і циклінзалежні протеїнази) [12]. Клітини, що тимчасово припинили ділитися, входять у фазу спокою, у так звану G0-фазу. Відомо, що клітини печінки входять у G0-фазу майже назавжди. Вони можуть почати поділ тільки при дії патологічних факторів. При порушенні клітинного циклу, пошкодженні ДНК або старінні клітин відбувається загибель гепатоцитів шляхом апоптозу. Відомо, що активація процесів апоптозу гепатоцитів включає високо регульовану послідовність біохімічних реакцій, кінцевою стадією яких є фрагментація ДНК [6].

Оцінивши показники фрагментації ядерної ДНК залежно від віку можна відмітити, що серед інтактних щурів найвищим показником характеризується група старих щурів (Рис. 1) у порівнянні з групами молодих статевонезрілих та статевозрілих щурів (Рис. 2).

На ДНК-гістограмі гепатоцитів (Рис. 1) представлено збільшення фрагментації ядерної ДНК гепатоцитів у щурів усіх вікових груп за

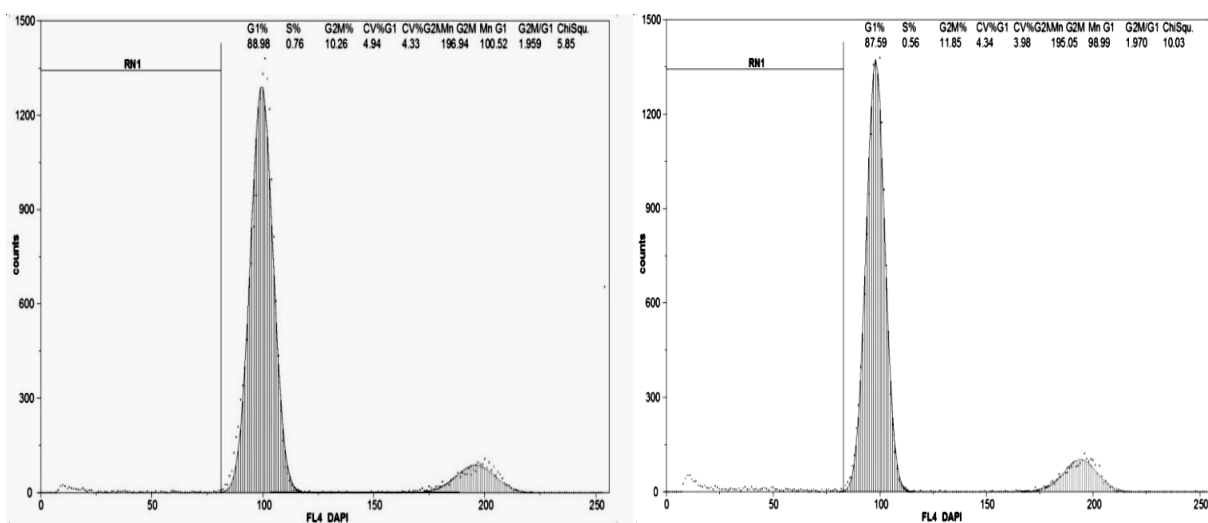


Рис. 1. ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин печінки старих тварин інтактні значення: RN1 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) становить 2,12 %, та на тлі ХАУП: RN1 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) становить 4,76 %.

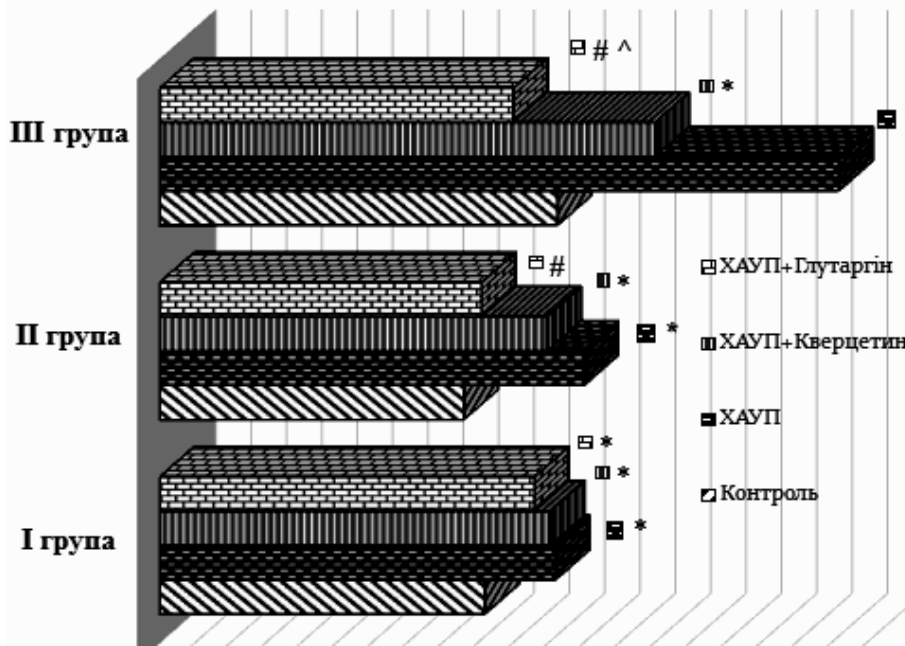


Рис. 2 Фрагментації ядерної ДНК клітин печінки у щурів-самок.

Примітка: I група - статевонезрілі тварини; II група - молоді статевозрілі тварини; III група - старі тварини; * - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою; # - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) у порівнянні з показниками щурів з ХАУП; ^ - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) показників тварин у порівнянні між кверцетином та L-аргініном L-глутаматом;

умов експериментального ХАУП: у 1 групі на 21,7 % ($p < 0,01$), у 2 групі на 39,5 % ($p < 0,01$) та у 3 групі на 70,7 % ($p < 0,05$). Доведено, що у щурів з ХАУП, які не отримували лікування рівень фрагментації ядерної ДНК печінкових клітин становить: у 1 групі - $2,24 \pm 0,09$ % ($p < 0,01$) проти $1,84 \pm 0,04$ % інтакту, у 2 групі - $2,40 \pm 0,09$ % ($p < 0,01$) проти $1,72 \pm 0,10$ % та у 3 групі - $3,84 \pm 0,57$ % ($p < 0,05$) проти $2,25 \pm 0,13$ %.

Отримані нами дані свідчать про розвиток незворотного алкогольного ушкодження гепатоцитів щурів з ХАУП у всіх групах, тобто загибель клітин відбувається шляхом патогенно індукованого апоптозу, з найважчим ураженням паренхіми печінки у старих щурів 3 групи. На нашу думку, такий розподіл показників фрагментації ДНК ядер гепатоцитів у різних вікових групах, доводить, що найвища стійкість до токсичного впливу алкоголю у молодих статевозрілих тварин, а з віком у старостих тварин стійкість організму знижується та підвищується чутливість до токсинів, оскільки у фізіологічних системах старіючого організму відбуваються зміни, які супроводжуються процесами загибелі старіючих клітин шляхом апоптозу.

Встановлено, що при введенні лабораторним щурам з метою корекції L-аргініну L-глутамату фрагментація ДНК зменшується у всіх вікових групах: у 1 групі на 5,5 % та становить: $2,12 \pm 0,08$ % ($p > 0,05$), у 2 групі - на 24,2 % та становить

$1,82 \pm 0,11$ % ($p < 0,05$) та у 3 групі - на 48,0 % та становить $2,0 \pm 0,11$ % ($p < 0,01$). Тоді як при введенні кверцетину фрагментація ядерної ДНК у щурів усіх груп залишається достатньо на високому рівні, незначно зменшується у 1 групі на 1,3 % та становить $2,21 \pm 0,10$ %, у 2 групі - на 8,75 % та становить $2,12 \pm 0,15$ % та у 3 групі - на 27,1 % та становить $2,80 \pm 0,26$ %, при цьому статистично достовірної різниці у порівнянні зі значеннями при ХАУП не виявлено (див. Рис. 2). Отже, можна зробити висновок, що L-аргінін L-глутамат проявляє більш позитивний ефект ніж кверцетин, оскільки нормалізує фрагментацію ядерної ДНК гепатоцитів у всіх вікових групах.

Основним параметром для оцінки регенераторного статусу печінки [8] загальноприйнято дослідження зміни фаз синтезу ДНК та мітозу гепатоцитів. Доведено, що у щурів усіх груп достовірно зменшується відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у S-фазі в 0,5 рази та збільшується відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у G2M-фазі у порівнянні з аналогічними показниками інтактних тварин відповідного віку: у 1 групі на 26,7 % ($16,77 \pm 0,53$ проти $13,24 \pm 0,38$, $p < 0,05$), у 2 групі на 53,1 % ($20,77 \pm 0,99$ проти $13,57 \pm 0,86$, $p < 0,05$) та у 3 групі (Рис. 1) на 46,7 % ($13,54 \pm 0,89$ проти $9,23 \pm 0,50$, $p < 0,05$). Таким чином, доведено, що поряд з загибеллю клітин печінки шляхом апоптозу за умов ХАУП відбувається стимуляція та активація процесів мітотичного

поділу гепатоцитів. При корекції ХАУП кверцетин проявив більш позитивний ефект на проліферативні процеси та репаративну регенерацію тканини печінки, оскільки відбувається нормалізація відсотка ядер гепатоцитів, які перебувають у S-фазі та G₂M-фазі.

Також, між показниками фрагментації ядерної ДНК гепатоцитів та відсотком клітин печінки, які перебувають у S- та G₂M-фазах встановлено кореляційну залежність: у контрольних тварин 1 групи ($r = 0,47$ ($p > 0,05$) та $r = -0,91$ ($p < 0,031$), тобто встановлено обернений сильний зв'язок між фрагментацією ядерної ДНК та прямою середньою силою кореляцію з мітотичним поділом клітин печінки. Так як у всіх групах щурів з ХАУП спостерігається збільшення фрагментації ядерної ДНК гепатоцитів, можна вважати, до етанол-індуковане ушкодження печінки у щурів та загибель гепатоцитів відбувається шляхом апоптозу. З літературних даних, Colantoni A. та співавторами було доведено значне збільшення рівня TNF- α , які сприяють апоптозу печінки [14]. Також етанол у експериментальних тварин пригнічує і затримує процеси репаративної регенерації тканин печінки, оскільки гальмується клітинний цикл, а саме затримується синтез ядерної ДНК гепатоцитів (S-фаза) [15].

За умов фармакокорекції L-аргініном L-глутаматом доведено, що у старих щурів 3 групи фрагментація ядерної ДНК клітин печінки слабко корелює з відсотком ядер гепатоцитів, які перебувають у S-фазі ($r = -0,13$, $p > 0,05$) та встановлено пряму сильну кореляцію з відсотком ядер клітин печінки, які перебувають у G₂M-фазі ($r = 0,98$, $p < 0,002$). Таким чином, при застосуванні L-аргініну L-глутамату достовірно знижується рівень патогенно індукованого алкоголем апоптозу гепатоцитів та активуються процеси мітотичного поділу, тобто стимулюється репаративна регенерація тканини печінки.

Встановлено, що за умов медикаментозної корекції кверцетином у 1 групі статевонезрілих тварин фрагментація ядерної ДНК клітин печінки слабко корелює з відсотком ядер гепатоцитів, які перебувають у S-фазі ($r = 0,56$, $p > 0,05$) та встановлено обернену сильну кореляцію з відсотком ядер гепатоцитів, які перебувають у G₂M-фазі ($r = 0,80$, $p > 0,05$). У інших групах не встановлено достовірної кореляції між загибеллю клітин шляхом апоптозу та мітотичним поділом гепатоцитів.

Висновки

1. Встановлено, що у щурів усіх вікових груп при ХАУП збільшується фрагментація ядерної ДНК клітин печінки, що вказує на патогенно

індукований апоптоз гепатоцитів, найвищий даний показник спостерігається у щурів 3 групи (на 60,0 % більший у порівнянні зі статевонезрілими щурами та на 70,2 % більший у порівнянні з молодими статевозрілими щурами).

2. Доведено, що за умов ХАУП у трьох вікових групах відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у S-фазі зменшується, а відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у G₂M-фазі збільшується у порівнянні з інтактними значеннями відповідних вікових груп, тобто внаслідок ушкоджуючої дії етанолу знижується синтез ядерної ДНК та активуються процеси мітотичного поділу клітин печінки. Однак дані показники є найнижчими у щурів 3 групи, що підтверджує найвищий ступінь ураження паренхіми печінки при хронічній алкогольній інтоксикації.

3. Встановлено, що "Кверцетин" та "Глутаргін" можуть використовуватись, як антиапоптичні засоби, оскільки застосування L-аргініну L-глутамату вірогідно зменшує рівень патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів, а кверцетин підвищує репаративну регенерацію та проліферацію клітин печінки.

Перспективи подальших досліджень

Проведені експериментальні дослідження в подальшому дадуть можливість удосконалити патогенетичну терапію алкогольних ушкоджень печінки, а саме підібрати антиапоптичну терапію та медикаментозно стимулювати процеси репаративної регенерації патологічно зміненої печінки.

Література. 1. Аруин Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения // Клин. мед. - 2000. - Т. 78, № 1. - С. 5-10. 2. Белушкина Н.Н., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх. пат. - 2001. - № 1. - С. 51-60. 3. Ковалёв Г. А. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс / Г.А. Ковалёв, А.Ю. Петренко // Вісн. Харк. нац. унів. - 2004. - № 617. - С. 15 -18. 4. Кухарчук А. Л. Регенеративная медицина: направления, достижения, проблемы и перспективы развития. Часть 1 : принципы и методы / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Український медичний часопис. - 2004. - № 2 (40). - С. 70-77. 5. Процессы апоптоза и пролиферации при патологии желудочно-кишечного тракта и печени / В.Т. Ивашкин, Т.Л. Лапина, О.Ю. Бондаренко, А.О. Буевров [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2002. - № 6. - С. 38-43. 6. Рикало Н. А. Особливості клітинного циклу та фрагментації ДНК у щурів різних вікових груп на тлі хронічного токсичного гепатиту / Н.А. Рикало, С.Г. Полінкевич // Таврический медико-биологический вестник. - 2012. - Том 15, № 3. - № 1 (59). - С. 287-289. 7. Рикало Н.А. Патогенез хронічних вірусних гепатитів В і С у дітей: вікові особливості, патогенетична терапія (експериментально-клінічне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. мед. наук : спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія" / Н. А. Рикало. - Тернопіль, 2011. - 36 с. 8. Рикало Н. А. Сучасні погляди на механізми репаративної регенерації печінки та нирок / Н. А. Рикало, О. В. Андрощук // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. - 2012. - № 2. - С. 110-113. 9. Рикало Н. А. Фрагментація ядерної ДНК гепатоцитів при хронічному токсичному гепатиті у статевонезрілих щурів: патогенетична корекція / Н. А. Рикало // Теоретична та експериментальна

медицина. - 2010. - №4 (49). - С. 15-18. 10. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. - 1979. - № 6. - С. 1513-1516. 11. Туманский В. А. Физиологическое обновление и репаративная регенерация специализированных клеток / В. А. Туманский // Патология. - 2006. - № 2. - С. 19-31. 12. Хухліна О.С. Інтенсивність процесів апоптозу та проліферації гепатоцитів при неалкогольному стеатозі печінки і стеатогепатиті у хворих на цукровий діабет 2 типу / О.С. Хухліна, І.С. Давиденко // Сучас. гастроентерологія. - 2005. - №3 (23). - С. 26-30. 13. Apoptosis in liver diseases - detection and therapeutic applications / S. Ghavami, M. Hashemi, K. Kadkhoda [et al.] // Med. Sci. Monit. - 2005. - V. 11, N. 11. - P. 337-345. 14. Hepatic apoptosis and proliferation in male and female rats fed alcohol: role of cytokines / A. Colantoni, R. Idilman, N. De Maria [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. - 2003. - N 27 (7). - P. 1184-1189. 15. Chronic ethanol feeding enhances miR-21 induction during liver regeneration while inhibiting proliferation in rats / R.P. Dippold, R. Vadigepalli, G.E. Gonye, J.B. Hoek // Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol. - 2012. - N 303 (6). - P. 733-743.

ФРАГМЕНТАЦИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ. ПРИНЦИПЫ АНТИАПОПТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Н.А. Рыкало, Л.А. Яровенко

Резюме. В данной работе представлены результаты полученные с помощью метода цитофлуориметрии. Проведено исследование фрагментации ядерной ДНК гепатоцитов у крыс-самок разных возрастных групп в условиях экспериментального хронического алкогольного повреждения печени и при фармакокоррекции кверцетином и L-аргинином L-глутаматом. Доказано, что у крыс всех возрастных групп при ХАУП увеличивается фрагментация

ядерной ДНК клеток печени и процент ядер гепатоцитов, находящихся в G2M фазе при уменьшении процента ядер клеток печени, которые находятся в S-фазе. Установлено, что "Кверцетин" и "Глутаргин" могут использоваться как антиапоптотические препараты при хронических алкогольных патологиях печени.

Ключевые слова: фрагментация ядерной ДНК, гепатоциты, хроническое алкогольное повреждение печени, кверцетин, L-аргинин L-глутамат.

FRAGMENTATION OF NUCLEAR DNA HEPATOCYTES IN CHRONIC ALCOHOLIC LIVER DISEASE. BASIS OF ANTIAPOPTOSIS THERAPY

N.A.Rykalo, L.A.Yarovenko

Abstract. In this work the presentation of results obtained by the method of flow cytometry. We investigated indicators fragmentation of nuclear DNA of hepatocytes of rats of different age groups with chronic alcoholic liver disease and therapy quercetin and L-arginine L-glutamate. It is proved in that in the rats all age groups with chronic alcoholic liver disease increased fragmentation nuclear DNA and the percentage nuclei of liver hepatocyte in G2M-phase at a percent reduction of liver cells that are in S-phase. Established that "Quercetin" and "Glutargin" can be used as drugs antiapoptosis in chronic alcoholic liver disease.

Key words: fragmentation of nuclear DNA, hepatocytes, chronic alcoholic liver damage, quercetin, L-arginine L-glutamate.

Vinnitsia National Medical University after M.I.Pirogov
Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №2 (52).-P.167-171.

Надійшла до редакції 10.04.2015

Рецензент – проф. О.І. Федів

© Н.А. Рыкало, Л.О. Яровенко, 2015