

УДК 616.711-002-07

ЦИТОКОММУНИКАТИВНЫЕ ИНДУКЦИИ И ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ГЕПАТОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОДНОКРАТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

Антонова Е.И., Костина О.М., Волкова Е.С., Бармина С.А.

ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова», Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии, Ульяновск, e-mail: wolkova.katja97@mail.ru

Повреждения печени вызывают каскад активации основных и вспомогательных путей фазы инициации/прайминга для обеспечения адекватного вступления в фазу пролиферации. В основе регенерации печени лежит взаимодействие стромально-паренхимных клеточных типов, за счет вырабатываемых ими биологически активных веществ. Проведен анализ цитокоммуникаций в пределах печеночного ацинуса, клеточной пролиферации и гибели гепатоцитов по различным путям программируемой клеточной гибели, возникающих в ответ на этаноловую интоксикацию. Отмечено увеличение количества гепатоцитов в стадии активных фазов цикла пролиферации (S+G2+M) и полиплоидизации, увеличивается количество клеток секретирующих IL-1 β и IL-6, тогда как секретирующих TNF- α снижается. В остром опыте, на 1-е, 3-и и 15-е сутки наблюдается увеличение количества гепатоцитов с признаками кариорексиса (PI+ гепатоциты), количество гепатоцитов на этапе сигналинга – аннексин V-позитивные – V+ снижается и увеличивается количество гепатоцитов погибших по пути некроза (аннексин V- PI+ гепатоциты). Исключение составляют 7-е сутки эксперимента, когда наблюдается обратная тенденция в реализации стадий апоптоза и количестве гепатоцитов с реализацией программы гибели – программируемый некроз.

Ключевые слова: гепатоциты, печень, пути программируемой клеточной гибели, интерлейкины, этанол

CYTOCOMMUNICATOR INDUCTION AND INDICATORS OF CELL CYCLE OF HEPATOCYTES OF A SINGLE ETHANOL INTOXICATION

Antonova E.I., Kostina O.M., Volkova E.S., Barmina S.A.

*Ulyanovsk state pedagogical university named after I.N. Ulyanov, Ulyanovsk,
e-mail: wolkova.katja97@mail.ru*

Liver damage causes a cascade of activation of the main and auxiliary pathways of the initiation / priming phase to ensure adequate entry into the proliferation phase. The basis of the regeneration of the liver is the interaction of stromal-parenchymal cell types, due to the biologically active substances produced by them. An analysis of cytocommunications within hepatic acini, cell proliferation and death of hepatocytes was carried out along various paths of programmed cell death arising in response to ethanol intoxication. An increase in the number of hepatocytes in the stage of active phases of the proliferation cycle (S + G2 + M) and polyploidization is noted, the number of cells secreting IL-1 β and IL-6 increases, while secreting TNF- α decreases. In the acute experiment, on the 1st, 3rd and 15th day, an increase in the number of hepatocytes with signs of karyorrhexis (PI + hepatocytes) is observed, the number of hepatocytes at the signaling stage is annexin V-positive – V + decreases and the number of hepatocytes killed along the necrosis path increases (annexin V-PI + hepatocytes). The exception is the 7th day of the experiment, when there is a reverse trend in the implementation of the stages of apoptosis and the number of hepatocytes with the implementation of the death program – programmable necrosis.

Keywords: hepatocytes, liver, PCD, interleukins, ethanol

Регенерация печени – это комплекс жестко регулируемых процессов пролиферации гепатоцитов, непаренхимных клеток и последующего восстановления нарушенной функции органа после его повреждения [1]. Одним из гепатотоксикантом является этанол, который не является чужеродным агентом для печени. Особую важность представляют комплексные исследования механизмов регенерации печени в условиях этаноловой интоксикации с учетом что исследования также несут важную биосоциальную значимость [2]. Цитокины, такие как интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6), опухоленекротизирующий фактор (TNF- α), а также простагландины, синтезируемые клетками Купфера, способны воздействовать

на гепатоциты в острую фазу ответа на повреждение и играют существенную роль в их пролиферации и дифференцировке [3].

Интерес к процессу физиологической гибели клеток неуклонно растет, что связано с выявляемыми его нарушениями в ряде патологических состояний, в том числе при аутоиммунных и онкологических заболеваниях [4, 5]. В связи с этим целью нашего исследования являлось изучить динамику цитокинов с позиции цитокоммуникативных взаимодействий паренхимных и непаренхимных клеток печени, а также показатели клеточного цикла гепатоцитов и распределение клеток по этапам апоптоза в норме и после воздействия этанола в однократном режиме.

Эксперимент поставлен на беспородных нелинейных мышах *Mus Musculus*, животные получали этанол в виде единственного источника питания. Забор материала проводили в остром опыте, через 1, 3-е, 7-е и 15-е сутки. Цитокоммуникативные индукции в печени определяли по уровню содержания цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-6. Для этого готовили гомогенат печени на гомогенизаторе WiseStir HS-30D (Daihan Scientific, Южная Корея), далее гомогенат центрифугировали (Beckman Coulter, Германия) в течение 5 минут при T 48°C, при 700 об/мин., собирали супернатант, в котором и определяли уровень цитокинов методом проточной цитометрии согласно инструкции изготовителя.

Для анализа клеточного цикла гепатоцитов готовили гомогенат на гомогенизаторе WiseStir HS-30D (Daihan Scientific, Южная Корея) на фосфатно-солевом буфере (PBS, pH=7,4, Gibco, США), который центрифугировали на центрифуге (Beckman Coulter, Германия) в течение 5 минут при 1500 об/мин, далее супернатант отбрасывали и осадок ресуспендировали в PBS. Процедуру повторяли три раза. К осадку добавляли 5 мл 2% раствора параформальдегида в PBS, ресуспендировали. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр CellTrics (Partec, Германия) с диаметром пор 100 мкм. К полученному осадку гепатоцитов добавляли 1 мл раствора пропидиум йодида для окрашивания. Осадок гепатоцитов ресуспендировали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут. Окрашенную суспензию, объемом 1 мл, фильтровали через нейлоновый фильтр CellTrics (Partec, Германия) с диаметром пор 30 мкм. и полученный образец, объемом в 1 мл. анализировали на цитофлюориметре (Partec, Германия). Для оценки стадии апоптоза в ткани печени применялась детекция апоптоза методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling). В результате проведенных исследований было выявлено, что у особей в остром эксперименте гепатоцитов в активных фазах цикла пролиферации (S+G₂+M) и полиплоидизации гепатоцитов больше чем в контрольной группе почти в пять раз. На первые сутки этот показатель увеличивается в два раза. На третьи сутки в экспериментальной группе увеличение числа гепатоцитов в активных фазах цикла пролиферации (S+G₂+M) и полиплоидизации гепатоцитов происходит почти в три раза.

Количество диплоидных гепатоцитов (G₀/G₁) в остром эксперименте по сравнению с контрольной группой остается на прежнем уровне, на первые и третьи сутки в этаноловой группе снижается бо-

лее чем в два раза в сравнении с контролем.

На седьмые сутки эксперимента, сохраняется тенденция к снижению числа гепатоцитов в G₀/G₁ стадии клеточного цикла (в два раза) и увеличение числа гепатоцитов в три раза в стадии активных фаз цикла пролиферации (S+G₂+M) и полиплоидизации.

На пятнадцатые сутки показатели остаются на прежнем уровне, что и на седьмые сутки. Соотношение живых и погибших гепатоцитов по сравнению с контролем увеличивается почти в 15 раз.

По проведенному анализу выявлено: в контрольной группе процент клеток, которые не секретирующих ни один из анализируемых интерлейкинов составляет 91,6%. 5% клеток секретирует интерлейкин TNF- α , тогда как интерлейкин IL-1 β около 3%. Интерлейкин IL-6 секретируется 20% клетками.

В остром опыте в экспериментальной группе процент клеток, не синтезирующих ни один интерлейкин составляет 73%, IL-1 β синтезирует 25% клеток, TNF- α синтезирует около 0,78%, тогда как IL 6 почти 11% клеток.

Количество клеток на первые сутки после однократной этаноловой интоксикации, которые не секретируют ни один из интерлейкинов составляет 92%, секретирующих только интерлейкин TNF- α 0,4%, интерлейкин IL-1 β секретируется 7,6% клеток. Интерлейкин IL 6 секретируется 11% гепатоцитов.

Изменения динамики секреции интерлейкинов на третьи сутки после однократной этаноловой интоксикации выявил, что количество клеток, которые не продуцируют ни один из исследуемых цитокоммуникаций составляет 93%. Количество клеток, секретирующих интерлейкин TNF- α на 2%, IL-1 β синтезируют 4% гепатоцитов, а интерлейкин IL-6 секретируют 16%.

Динамика показателей цитокоммуникаций гепатоцитов на седьмые сутки распределяется следующим образом. Незначительно снижается показатель количества клеток, не продуцирующих ни один интерлейкин, тогда как количество гепатоцитов, синтезирующих TNF α снижается почти в два раза. Но в то же время наблюдается увеличение синтеза TGF-1 β , а именно количество клеток, синтезирующих данных интерлейкин увеличивается в 2 раза. Снижается количество гепатоцитов, синтезирующих TGF 6 на 20%.

В алкоголизированной группе на пятнадцатые сутки на 2% увеличивается процент клеток, не синтезирующих ни один

из изучаемых интерлейкинов. Отмечается резкое снижение количества гепатоцитов, секретирующих TNF α в пять раз. Почти в два раза увеличивается количество клеток, которые синтезируют TGF-1 β , и снижается количество клеток печени, продуцирующих TGF 6 на 29%.

Таким образом количество клеток, которые не продуцируют ни один из исследуемых цитокинов снижается и в большей мере в остром опыте, тогда как к 1-м и 3-м суткам их количество проявляет тенденцию к увеличению выше контрольных показателей числа клеток, которые синтезируют анализируемые цитокины, за исключением TNF- α .

Аннексин V применяли для выявления гепатоцитов, вступивших в апоптоз (аннексин V⁺ клетки). Пропидий йодид (PI) употребляли в качестве маркера жизнеспособности гепатоцитов (аннексин V-PI- клетки) и клеточного некроза (аннексин V- PI⁺ клетки). Апоптоз анализировался методом проточной цитофотометрии с учетом этапов таких как сигналинг – он характеризуется переносом серина на E-поверхность плазматической мембраной, в этом случае применялся краситель PI. Краситель аннексин V отражает процесс разрушения мембраны ядра, что сопряжено с образованием его фрагментов и представляет собой стадию патологии ядра – карioreкис.

После проведенного анализа выявлено, что в остром эксперименте отмечается незначительное снижение процент живых гепатоцитов, при этом увеличивается количество гепатоцитов, погибших по пути апоптоза (PI⁺ гепатоциты), что составляет почти 10%. Снижается количество гепатоцитов на этапе сигналинга на 11% (аннексин V-позитивные – V⁺). Так же увеличивается количество гепатоцитов, погибших по пути некроза на 2% (аннексин V-PI⁺ гепатоциты).

Отмечено что на первые сутки эксперимента снижается количество аннексин V позитивных гепатоцитов на 13%. В 7 раз увеличивается количество гепатоцитов, находящихся в стадии позднего апоптоза. Также увеличивается количество гепатоцитов, погибших по пути некроза, на 15%. В экспериментальной группе снижается количество живых гепатоцитов на 8%.

На третьи сутки происходит увеличение количества гепатоцитов, находящихся в карioreкисе в три раза. Также наблюдается тенденция к увеличению других показателей. А именно в эксперименте увеличивается количество гепатоцитов, погибших по пути апоптоза в пять раз. В два раза увеличивается количество гепатоцитов, погибших по пути некроза. В этом случае умень-

шается количество живых гепатоцитов в два раза, по сравнению с контрольной группой.

После проведенного анализа, на седьмые сутки были определены следующие показатели. Наблюдается выравнивание показателей, количество живых клеток снижается на 5%, при этом на 14% увеличивается количество клеток, которые находятся в ранней стадии апоптоза (аннексин V-позитивные – V⁺), почти в два раза увеличивается количество гепатоцитов, погибших по апоптотическому пути (PI⁺ гепатоциты). Незначительно по сравнению с контролем наблюдается снижение гепатоцитов, погибших по пути некроза, а именно на 2% (аннексин V-PI⁺ гепатоциты).

Пятнадцатые сутки эксперимента в однократном режиме характеризуются резким снижением количества клеток, находящихся в ранней стадии апоптоза – в два раза (аннексин V позитивные – V⁺). Наблюдается небольшое увеличение количества гепатоцитов, которые находятся в стадии карioreкиса (PI⁺ гепатоциты), примерно на 6%. В 14 раз увеличилось количество клеток, погибших по пути некроза (аннексин V-PI⁺ гепатоциты). При этом наблюдается увеличение количество живых гепатоцитов на 4%.

Туморнекротизирующий фактор (TNF- α) – проявляет резкое снижение в остром опыте и на первые сутки эксперимента с тенденцией на увеличение на 3–и сутки, но не достигая контрольных показателей. Это отражает резкое угнетение синтеза клетками Купфера данного цитокина. Выявленная динамика IL-6 отражает устойчивое снижение участия клеток Купфера в процессах пролиферации и дифференцировке гепатоцитов в ответ на повреждение этанолом в исследуемые периоды.

Динамика показателей IL-1 β синтезируемый клетками Ито, проявляет резкое увеличение в остром опыте и далее резкое снижение на 1-е и 3-е сутки эксперимента. Это отражает резкое угнетение реагирования специфического иммунного, а также выступающая в качестве одного из главных медиаторов, ответственных за развитие неспецифических форм защиты, отражает угнетение формирования местной воспалительной реакции и острофазного ответа, после этаноловой интоксикации, а также отражает угнетение процесса обновления и ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ) не только путем синтеза структурных матриксных белков клетками Ито, но и путем синтеза и секреции коллагеназ.

Выявленная дифференцированная динамика исследуемых цитокинов обеспечила стимулирование гепатоцитов к пролифера-

ции и как следствие снижение числа диплоидных гепатоцитов в G_0/G_1 стадии клеточного цикла.

Список литературы

1. Гайворонская В.В., Оковитый С.В., Колышев И.Ю., Шустов Е.Б. Влияние бемитила, этомерзола и яктонана на процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии // Биомедицина. – 2013. – № 1. – С. 16–21.

2. Ельчанинов А.В., Большаков Г.Б. Пролiferация и клеточная гибель гепатоцитов регенерирующей пе-

чени плодов крыс // Цитология. – 2012. – Т. 54; № 4. – С. 313–317.

3. Asanoma M. et al. Cytokine expression in spleen affects progression of liver cirrhosis through liver-spleen cross-talk // Hepatol Res. – 2014. – Vol. 44, № 12. – P. 1217–1223.

4. Гинкул Л.Б., Александрова С.А., Швембергер И.Н. Апоптоз и генетическая вариабельность клеток гепатомы МГ – 22а мыши: Всерос. симп. «Клеточная биология на пороге XXI века» // Цитология. – 2001. – Т.43, № 4. – С. 333–334.

5. Rokeach L.A., Jbel M., Dulude D. Another face of cell death // Cell Cycle. – 2014. – Vol.13; № 2. – P. 181–182.