612.351-008:576.311.347 -616-022.7

Жураковский И. П., Архипов С.А., Пустоветова М. Г., Кунц Т. А.,Битхаева М.В., Маринкин И.О.

АКТИВАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПУТИ АПОПТОЗА ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ПЕРСИСТЕНЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Центральная научно-исследовательская лаборатория ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, г.Новосибирск

На 18 половозрелых крысах-самцах Вистар, у которых с помощью Золотистого стафилококка (штамм 209) создан очаг хронической инфекции в большеберцовой кости, изучена возможность активации митохондриального пути апоптоза в гепатоцитах крыс. Для изучения экспрессии в клетках печени белков, принимающих участие в регуляции апоптотоза (Bcl-2, Bax, Bad, p53), использовали двухэтапный иммуногистохимический метод. Результаты исследования, позволяют сделать заключение, что при персистенции бактериальной инфекции происходит активация митохондриального пути апоптоза гепатоцитов, обусловленная одновременным снижением экспрессии белка Bcl-2 и повышением экспрессии в гепатоцитах белков Bax и Bad, а так же увеличением пула гепатоцитов, экспрессирующих цитоплазматический p53.

Ключевые слова: *апоптоз, гепатоциты, бактериальная инфекция, Bcl-2, Bax, Bad, p53*

Zhurakovsky I. P., Arkhypov S. A., Pustovetova M. G., Kunts T. A., Bitkhaeva M.V., Marinkin I. O.

ACTIVATION OF MITOCHONDRIAL APOPTOSIS WAY IN HEPATOCYTE AT PERSISTING BACTERIAL INFECTION

Chronic shin-bone infection focus was created by Staphylococcus aureus (strain 209) in 18 mature mail Wistar rats. Possibility of activation of mitochondrial apoptosis way in rat hepatocyte. Two-phase immunohystochemical method was used to investigate the expression of proteins (Bcl-2, Bax, Bad, p53) in liver cells enabled in apoptosis regulation. Findings suggest that persisting bacterial infection contribute to mitochondrial way of hepatocyte apoptosis activation caused by simultaneous Bcl-2 expression decrease and Bax and Bad proteins expression increase and also growth of hepatocytes pool with cytoplasmatic p53 expression.

Key words: *apoptotic, hepatocytes, bacterial infection, Bcl-2, Bax, Bad, p53.*

Введение

По современным представлениям апоптоз играет жизненно важную роль как в процессе эмбрионального развития, так и в онтогенезе в целом [2;6]. Во взрослом организме этот процесс наблюдается в различных типах ткани, где выполняет роль гомеостатической регуляции. Реализация запрограммированной гибели клеток происходит и при различных патологических состояниях. Как известно это многоступенчатый процесс. На первом этапе происходит инициация и трансдукция проапоптотического сигнала [2;12]. За ними следует эффекторная фаза, в ходе которой происходит активация каспазной системы клетки. На заключительной стадии развития апоптотического процесса наступает фаза деградации клетки, характеризующаяся деструкцией клеточного материала [3;7;8].

Существует несколько путей развития эффекторной фазы апоптоза, принципиальное отличие которых заключается в механизме инициации и трансдукции проапоптотического сигнала. В настоящее время у млекопитающих описано три

основных генеральных пути инициации апоптоза: митохондриальный, липидный и опосредованный через "рецепторы смерти" или Fas зависимый [5;8;12].

Показано, что митохондриальный путь инициации апоптоза является зависимым от взаимодействия большого количества белков-регуляторов семейства Bcl-2. Большое количество белков этого семейства постоянно презентировано на внешней митохондриальной мембране. Этот протеин и его гомологи (Bcl-xL, Mcl-1 и др.) выполняют функцию защиты клеток от апоптоза. Фактор Bcl-2 поддерживает инактивированное состояние проапоптотического белкового комплекса, в состав которого входят прокаспаза-9 (Apaf-3), адаптер Apaf-1, флавопротеин AIF, цитохром с (Apaf-2), фактор Smac и ряд других менее изученных факторов [4;7].

Среди белков Bcl-2 семейства сущест-вует также группа апоптоз-опосредующих факторов (такие как Bad, Bax, Bak, Bik, Bid и др.) Для переключения клетки в режим апоптоза необходимо связывание Bcl-2, что нейтрализует ингибирующее действие последнего. Такое связывание может осуществляться большинством из проапоптотических белковых факторов Bcl-2-семейства [2;4].

При этом инициирующие апоптоз компоненты из ранее блокированного комплекса освобождаются и свободно выходят в цитоплазму через дезорганизованную мембрану митохондрии. В дальнейшем цистеиновые протеиназы расщепляют структурные белки, нарушают работу киназных, полимеразных и других ферментативных систем, инициируют фрагментацию ДНК путем активации ДНКаз, разрушают сигнальные системы клетки.

Длительное существование фокальной персистирующей инфекции вызывает определенные изменения в функционировании основных гомеостатических систем, и, как следствие, структурную перестройку органов и тканей. Описан синдром сочетанных дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе 1 , при формировании которого в печени наблюдаются признаки неспецифического реактивного гепатита. Принимая во внимание, что при этом происходят определенные изменения паренхиматозных клеток, представляет интерес изучение экспрессии про- и антиапоптотических белков-регуляторов в гепатоцитах в ответ на изменение условий функционирования макроорганизма.

Целью настоящего исследования являлось изучение возможности индукции митохондриального пути апоптоза в гепатоцитах крыс при персистенции бактериальной инфекции.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 24 половозрелых крысах-самцах Вистар с исходной массой 180-220 г, у 18 из которых с помощью Золотистого стафилококка (штамм 209) создан очаг хронической инфекции в большеберцовой кости. Исследование проводилось через 1, 2 и 3 месяца после воспроизведения очага хронического воспаления. В качестве контроля служил материал от 6 интактных животных. Эксперимент выполнялся с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей.

Материал фиксировали в 12% формалине. Из залитых в парафин объектов делали серийные срезы толщиной 7 мкм, которые для обзорной световой микроскопии окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Для изучения экспрессии в клетках печени различных белков, принимающих участие в механизмах инициации по оксидативному пути и пролонгировании апоптотического процесса в клетках (Bcl-2, Bax, Bad, p53), использовали двухэтапный иммуногистохимический метод. Демаскировку антигенов проводили при инкубировании депарафинированных срезов в растворе тритона X100. Препараты последовательно инкубировали с "первыми

антителами" к соответствующим маркерам, вторыми биотинилированными антителами, стрептавидин-пероксидазным комплексом и на конечном этапе окраски в растворе диаминобензидина (DAB), содержащим H2O2. Зоны клеточных мембран или цитоплазмы, содержащие выявляемые антигены, окрашивались в "специфический" темно-коричневый цвет. Интенсивность такой окраски прямо пропорциональна количеству экспрессируемого маркера.

Анализ интенсивности экспрессии анти- и проапоптотических белков-регуляторов и площади, на которой она выявлялась, проводилась с помощью светооптического микроскопа и морфометрического комплекса на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13c фирмы Baumer и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для каждой экспериментальной группы оценивалось по 48 изображений. Площадь препарата получаемого на одном изображении составляла 21455 мкм^2. Среднее серое значение яркости области экспрессии маркера выражалось в условных единицах от 0 до 255, причем черному цвету соответствовало значение 0, белому - 255.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы "SPSS 11.5 for Windows". При сравнении показателей исследуемых групп использовали методы непараметрической статистики, в связи с ненормальным распределением значений в вариационных рядах. Числовые данные приведены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-го; 75-го процентилей). Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического критерия для k независимых выборок (Крускалла-Уоллиса).

Результаты исследования

При изучении срезов печени, окрашенных гематоксилином Эрлиха и эозином через 1 месяц после воспроизведения очага хронической инфекции, обращали на себя внимание имевшие место микроциркуляторные нарушения, сопровождающие застойные явления в системе печеночных вен. Наблюдались умеренные дистрофические изменения паренхиматозных клеток, выражавшиеся в появлении участков паренхимы, в которых цитоплазма гепатоцитов имела повышенное сродство к эозину; в части таких клеточных элементов отмечалось смещение гранул хроматина по направлению к ядерной оболочке, а еще реже образование конгломератов, которые выявлялись на одном из полюсов ядра. Отмечалась легкая воспалительная реакция, проявлявшаяся в концентрации лимфоидных элементов в местах скопления дистрофически измененных гепатоцитов.

Как представлено в таблице 1, через 1 месяц после создания очага хронической инфекции при оценке препаратов с иммуногистохимической окраской на антиапоптотический белок Bcl-2, отмечено уменьшение площади, занимаемой клеточными элементами печени с экспрессией этого белка, более чем в 2 раза. Вместе с тем наблюдалось увеличение интенсивности специфического окрашивания на Bcl-2 в гепатоцитах, о чем свидетельствовало достоверное уменьшение среднего серого значения яркости в областях, экспрессирующих Bcl-2.

Окраска на белок Bax была выявлена в большем количестве гепатоцитов по сравнению с контролем. Так, площадь клеточных элементов паренхимы печени с экспрессией этого проапоптотического белка увеличилась в 1,4 раза, составляя 23,3±0,36% тестируемой площади. Однако при этом было отмечено снижение уровня выраженности специфического окрашивания, что подтверждалось достоверным увеличением среднего серого значения яркости в областях, экспрессирующих Bax.

Изучение препаратов, на которых выявлялся проапоптотический белок Bad, не позволило выявить статистически значимых изменений площади, занимаемой

Таблица 1.

Площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими анти- (Bcl-2) и проапоптотические белки (Bax, Bad, p53 в %), и среднее серое значение яркости области, экспрессирующей маркеры апоптоза в условных единицах, (Me (25-й; 75-й)).

Показатель	инт	В 1 мес	В 2 мес	В 3 мес
Площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими Bcl-2	26,7 (21,5; 29,1)	12,7 (10,4; 14,7)*	26,0 (22,8; 29,8)	15,7 (14,1; 18,0)*
Площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими Bax	16,2 (12,6; 19,4)	23,5 (21,5; 25,0)*	8,3 (6,6; 17,5)*	11,3 (10,1; 12,7)*
Площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими Bad	20,1 (16,8; 22,2)	21,6 (18,2; 23,9)	32,1 (20,7; 40,7)*	23,5 (20,9; 26,2)*
Площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими p53	11,4 (8,8; 14,0)	14,7 (12,7; 16,5)*	15,0 (9,8; 21,3)*	19,7 (17,9; 21,2)*
Среднее серое значение яркости области, экспрессирующей Bcl-2	151,1 (147,9; 155,3)	128,4 (125,7; 131,7)*	146,7 (136,8; 155,6)*	142,0 (137,6; 148,0)*
Среднее серое значение яркости области, экспрессирующей Bax	125,1 (122,7; 128,5)	133,1 (129,0; 142,1)*	131,9 (114,2; 137,9)	137,9 (134,3; 141,0)*
Среднее серое значение яркости области, экспрессирующей Bad	149,0 (147,3; 150,5)	161,9 (140,2; 167,3)*	146,0 (140,9; 148,8)*	145,4 (140,7; 151,4)*
Среднее серое значение яркости области, экспрессирующей p53	144,9 (132,9; 147,1)	127,4 (122,6; 133,7)*	127,5 (125,3; 129,6)*	139,0 (134,3; 141,8)

Примечание: инт - интактные животные, В 1 мес - через 1 месяц после создания очага хронической инфекции, В 2 мес - через 2 месяца после создания очага хронической инфекции, В 3 мес - через 3 месяца после создания очага хронической инфекции.

* - статистически значимые различия с интактными животными при 95% уровне значимости ($p<0,05$)

клеточными элементами с экспрессией этого маркера. Кроме того, в печени животных этой группы отмечалось снижение интенсивности специфического окрашивания гепатоцитов, что отражалось увеличением среднего серого значения яркости в областях, где выявлялся белок Bad.

Изучение индукции апоптоза на уровне регуляции пролиферативных процессов в клетках печени с помощью антител к белку p53 позволило выявить увеличение площади, занимаемой клеточными элементами с экспрессией этого маркера. Кроме того, отмечалось увеличение интенсивности специфического окрашивания гепатоцитов, что выражалось в уменьшении среднего серого значения яркости в областях, где выявлялся этот белок.

Через 2 месяца после воспроизведения очага хронической инфекции при изучении срезов печени, окрашенных гематоксилином Эрлиха и эозином обращали на себя внимание сохранявшаяся дилятация центральных и поддольковых вен; микроциркуляторные нарушения, проявлявшиеся в выраженном ра\ширении синусоидных сосудов и выяв\-лнии в них множественных эритроцитарных агрегатов. В ядрах отдельных клеточных элементов гранулы хроматина выявлялись нечетко, было нарушено его распределение. Встречались участки паренхимы с дистрофически измененными клеточными элементами. Цитоплазма таких гепатоцитов имела повышенное сродство к эозину, а ядра чаще были пикнотично изменены. Кроме того, выявлялись отдельные гепатоциты, ядра которых находились в состоянии рексиса или лизиса. В местах скопления дистрофически измененных гепатоцитов концентрировались лимфоидные элементы. В отдельных случаях при этом формировались временные лимфоидные образования.

При иммуногистохимическом выявлении в клетках белка Bcl-2 отмечено снижение до уровня контрольных цифр площади, занимаемой клеточными элементами печени с экспрессией этого белка. Кроме того, интенсивность специфического окрашивания в гепатоцитах уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком, но сохранялась выше, чем в контрольной группе. При этом среднее серое значение яркости в областях, экспрессирующих Bcl-2, было равно 145,1±1,73.

Изучение популяции гепатоцитов на препаратах с окраской на Bax позволило выявить настолько выраженное снижение их количества по сравнению с предыдущим сроком (1 месяц после индукции воспалительной реакции), что площадь клеточных элементов паренхимы печени с экспрессией этого проапоптотического белка была статистически значимо меньше аналогичного показателя у интактных животных, составляя 11,4±0,88% тестируемой площади. При этом было отмечено увеличение уровня выраженности специфического окрашивания, что подтверждалось уменьшением среднего серого значения яркости в областях, экспрессирующих Bax.

Изучение препаратов, на которых выявлялся проапоптотический белок Bad (в отличие от Bax) позволило выявить статистически значимое (в 1,6 раза) увеличение площади, занимаемой клеточными элементами с его экспрессией. Кроме того, в печени животных этой группы отмечалось увеличение интенсивности специфического окрашивания гепатоцитов, что выражалось в снижении среднего серого значения яркости в областях, где выявлялся белок Bad.

Изучение препаратов печени с иммуногистохимической окраской на белок p53 позволило выявить сохраняющееся увеличение площади, занимаемой клеточными элементами с экспрессией этого маркера. Также как и у животных на предыдущем сроке отмечалось увеличение интенсивности специфического окрашивания гепатоцитов, что отражалось уменьшением среднего серого значения яркости в областях, где выявлялся этот белок.

При изучении срезов печени, окрашенных гематоксилином Эрлиха и эозином через 3 месяца после воспроизведения очага хронической инфекции, отмечено сохранение застойных явлений в системе печеночных вен и микроциркуляторных нарушений. В дольках гепатоциты, принимающие участие в образовании печеночных балок имели полиморфное строение: они были несколько увеличены в размерах или напротив уменьшены. Подавляющее большинство гепатоцитов интенсивно воспринимало эозин и гранулярное строение цитоплазмы их не всегда было четко выражено. В ядрах гепатоцитов гранулы хроматина выявлялись нечетко, было несколько нарушено их распределение. В единичных клетках имело место нарушения кариолеммы. Отмечались явления кариорексиса и кариолизиса. Вместе с тем в различных участках печени нередко выявлялись полиплоидные и двуядерные клетки. Отмечалась инфильтрация балочных структур лимфоцитами в местах скопления дистрофически измененных гепатоцитов.

При оценке на указанный срок препаратов с иммуногистохимической окраской на Bcl-2, отмечено уменьшение площади, занимаемой клеточными элементами печени с экспрессией этого белка в 1,7 раза. Вместе с тем наблюдалось увеличение интенсивности специфического окрашивания в гепатоцитах, о чем свидетельствовало уменьшение среднего серого значения яркости в областях, экспрессирующих Bcl-2, но не настолько выраженное как у животных через 1 месяц после создания очага хронической инфекции.

При изучении популяции гепатоцитов, экспрессирующих Bax, было выявлено сохраняющееся на прежнем уровне снижение их количества по сравнению с интактными животными. Площадь клеточных элементов паренхимы печени с экспрессией этого проапоптотического белка составляла 11,6±0,31% тестируемой площади. Кроме того, отмечалось снижение уровня выраженности специфического окрашивания, что подтверждалось увеличением среднего серого значения яркости в областях, экспрессирующих Bax.

В отличие от Bax, изучение препаратов, на которых выявлялся проапоптотический белок Bad, позволило выявить увеличение площади, занимаемой клеточными элементами с его экспрессией. Кроме того, в печени животных этой группы отмечалось увеличение интенсивности специфического окрашивания гепатоцитов, что отражалось снижением, по сравнению с контролем, среднего серого значения яркости в областях, где выявлялся белок Bad.

Изучение окраски препаратов печени на белок p53 позволило выявить увеличение площади, занимаемой клеточными элементами с экспрессией этого маркера, в 1,7 раза по сравнению с интактными животными. При этом среднее серое значение яркости в областях, где выявлялся этот белок, не было повышенным, что свидетельствует о том, что уровень экспрессии p53 не был снижен.

Обсуждение

В результате проведенного исследования нами было установлено, что персистенция бактериальной инфекции в большеберцовой кости сопровождается развитием признаков неспецифического реактивного гепатита, который сохранял свою активность на протяжении всего эксперимента. Проведенное на этом фоне изучение экспрессии белков-регуляторов апоптоза позволило выявить определенную динамику изменений, касающихся экспрессии белков семейства Bcl-2, от соотношения которых зависит вероятность индукции апоптоза. Так, 1 через месяц после создания очага хронической инфекции было отмечено уменьшение количества гепатоцитов, экспрессирующих Bcl-2, но в тех клеточных элементах, где он выявлялся, уровень этого белка стал выше. В тоже время проапоптогенный белок Bax стал выявляться в значительно большем количестве гепатоцитов, хотя его уровень был несколько ниже. Как известно, белки Bcl-2 и Bax, а также Bcl-2 и Bad, находятся в состоянии постоянного динамического равновесия, образуя гомо- и гетеродимеры, не обладающие проапоптогенной активнстью. При доминировании продукции проапоптотических белков Bad и Bax такое равновесие нарушется и смещается в сторону образования большого количества гомодимеров из проапоптотических белков, обладающих высокой проапоптогенной активностью [3]. Существует и другой механизм, приводящий к апоптозу через конкурентное ингибирование Bcl-2. Так, возможна регуляция через белок p53, замедляющий в нормальных клетках митотическую активность [13]. Известно, что некоторые стимулы, например гипоксия, активируют ген p53, переводя клетку на апоптотический путь. Белок p53 задерживает клетку в фазе G1/S клеточного цикла (через репрессию генов, регулирующих транскрипцию), чтобы дать время для работы репаративных систем. На уровне транскрипции фактор p53 регулирует экспрессию генов, участвующих в блокаде клеточного цикла, а также взаимодействует либо с комплексами, определяющими синтез и репарацию ДНК, либо с белками, модулирующими апоптоз. Если повреждение ликвидировать не удается, то p53 запускает апоптоз [5;9;11]. Происходит это через инактивирование Bcl-2 при связывании с белком Bax.

Результаты исследования, полученные нами через 2 и 3 месяца после создания очага хронической бактериальной инфекции, позволяют сделать заключение, что к одному из вероятных механизмов запуска апоптоза гепатоцитов при персистенции бактериальной инфекции можно отнести процесс гетеродимеризации Bcl-2, обусловленный одновременным снижением экспрессии белка Bcl-2 и повышением экспрессии в гепатоцитах белков Bax и Bad. Указанный процесс гетеродимеризации Bcl-2 может быть сопряжен с изменением степени фосфорилирования/дефосфорилирования белка-индуктора Bad. Как известно в этих условиях Bad дефосфорилируется, образуются гетеродимеры Bcl-2/Bad и запускается процесс апоптоза за счет высвобождения митохондриальных факторов, при этом в конечном итоге происходит активация каспазы-9 [3;10]. Иными словами, вероят-

ность индукции митохондриального пути апоптоза в гепатоцитах крыс при персистенции бактериальной инфекции резко возрастает. В заключение следует добавить, что в результате нашего исследования установлено, что персистенция бактериальной инфекции, приводящая к микроциркуляторным нарушениям и тканевой гипоксии печени, способствует увеличению пула гепатоцитов, экспрессирующих цитоплазматический p53. Это, в свою очередь, может указывать на то, что при отмеченном на раннем сроке повышенном уровне экспрессии проапоптотического белка Bax, существует вероятность связывания его в последующем с белком Bcl-2, и, соответственно, существует высокая вероятность активации митохондриального пути индукции апоптоза гепатоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Команденко Н.И. Остеохондроз позвоночника: Монография. / Команденко Н.И., Рыжов А.И., Жураковский И.П. - Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2006. - 246с.
2. Apoptosis in lung injury and fibrosis / Drakopanagiotakis F. et al. // Eur Respir J. - 2008. - Vol. 32. - P.1631-1638
3. Bcl-2 upregulation and neuroprotection in guinea pig brain following chronic simvastatin treatment / Frankea L. et al. // Neurobiology of Disease. - 2007. -Vol. 25, Iss. 2. - P. 438-445
4. BH3-only proapoptotic Bcl-2 family members Noxa and Puma mediate neural precursor cell death / Akhtar R.S. et al. // J Neurosci. - 2006. - Vol. 26. - P. 7257-7264
5. Harris S.L. The p53 pathway: positive and negative feedback loops / Harris S.L., Levine A.J. // Oncogene. - 2005. - Vol. 24. - P. 2899-2908
6. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis // Nature. - 2000. - Vol. 407. - P.770-776
7. Kim R. Role of mitochondria as the gardens of cell death / Kim R., Emi M., Tanabe K. // Cancer Chemother. Pharmacol. - 2005. - Vol. 21. - P.1-9
8. Lee, H. Mitochondrial role in life and death of the cell / Lee H., Wei Y.,. // J. Biomed. Sci. - 2000. - Vol. 7. - P.2-15
9. Neural precursor cells possess multiple p53-dependent apoptotic pathways / Akhtar R.S. et al. // Cell Death Differ. - 2006. - Vol. 13. - P.1727-1739
10. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c / Korsmeyer S.J. et al. // Cell Death Differ. - 2000. - №7. - P. 1166-1173
11. Schuler M. Transcription, apoptosis and p53: Catch- 22 / Schuler M., Green D.R. // Trends Genet. - 2005. - Vol. 21. - P. 182-187
12. Simon H-U. Targeting apoptosis in the control of inflammation // Eur Respir J. - 2003. - Vol. 22. - P.20-21
13. Yu J. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control / Yu J., Zhang L. // Biochem Biophys Res Commun. - 2005. -Vol. 331. - P. 851-858