

© Криницька І.Я.

УДК: 534.121.2+57+546.21:611-018.1+546.21

Криницька І.Я.

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України" (майдан Волі, 1, м. Тернопіль, Україна, 46001)

ВСТАНОВЛЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ РІВНЕМ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ, ТРАНСМЕМБРАННИМ МІТОХОНДРІАЛЬНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ ТА АПОПТОЗОМ У КРОВІ ТА БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМУ ЗМИВІ ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНИМ СИНДРОМОМ

Резюме. Метою дослідження було провести порівняльний аналіз кореляційних зв'язків між рівнем апоптозу та показниками трансмембранного потенціалу мітохондрій й активних форм кисню у крові та бронхоальвеолярному змиві у щурів для виявлення додаткових патогенетичних механізмів формування гепатопульмонального синдрому. Встановлено позитивний значимий кореляційний зв'язок між рівнем раннього апоптозу, активними формами кисню та трансмембранним потенціалом мононуклеарних фагоцитів у крові і бронхоальвеолярному змиві. Це свідчить про важливу роль мітохондріально-опосередкованого шляху клітинної загибелі у патогенезі гепатопульмонального синдрому.

Ключові слова: кореляційні зв'язки, апоптоз, трансмембранний мітохондріальний потенціал, активні форми кисню, гепатопульмональний синдром.

Вступ

Наявність поєднаної патології печінки та легень вперше описав М. Fluckiger (Австрія) ще у 1884 році, коли він спостерігав у молодій жінки з цирозом печінки внаслідок сифілісу наявність ціанозу і пальців у вигляді "барабанних паличок" [Fluckiger, 1884]. В 1935 році Snell опублікував статтю, де стверджував, що хронічні захворювання печінки впливають на фізичні та хімічні параметри крові, тому що автор спостерігав зниження насиченості капілярної крові киснем у трьох пацієнтів з цирозом печінки [Snell, 1935]. Перші автори, хто використав термін "Гепатопульмональний синдром" (ГПС), були Knudson і Kennedy (Швеція) [Kennedy, 1977]. В 1977 році вони описали чіткий взаємозв'язок між гострою гіпоксією внаслідок внутрішньолегеневого артеріовенозного шунту і дисфункцією печінки.

Під гепатопульмональним синдромом розуміють дефект артеріальної оксигенації, спричинений розширенням внутрішньолегеневих судин, що асоційоване із захворюванням печінки. Поєднання неспецифічних клінічних критеріїв, асоційованих з недостатністю стандартизації в діагностичних критеріях для визначення ГПС, може зумовити діагностичні помилки. Це також пояснює широкі межі поширеності ГПС. Так, за даними різних авторів [Абрагамович, 2010; Івашкин, 2009; Shafiq, 2008; Macedo, 2009], ГПС може бути діагностований у 4 - 47 % хворих на цироз печінки та у 15 - 20 % кандидатів на трансплантацію печінки. Існують задокументовані дослідження, що ГПС найчастіше асоціюється з алкогольним або первинним біліарним цирозом печінки [Krowka, 1994]. Прогноз при ГПС - несприятливий і ризик смерті у найближчий рік складає 41 %. Крім того, оскільки на сучасному етапі, патогенез ГПС залишається до кінця не в'яснений, то ортотопічна трансплантація печінки є єдиним успішним методом лікування пацієнтів з даною проблемою [Cheng-Tang Chiu,

2009]. У США щорічно виконується біля 5 500 трансплантацій печінки в рік, в Європі - біля 5 000 [Огурцов, 2008].

Беручи до уваги, що в патогенезі ГПС важливу роль відіграють мононуклеарні фагоцити, які при активації продукують велику кількість біологічно активних речовин, в тому числі і високоактивні нестабільні продукти відновлення кисню: супероксид-аніон, гідроксильний радикал, синглетний кисень, перекис водню, що володіють потужною антимікробною та цитотоксичною дією [Самсонов, 2011] та беруть участь в механізмах реалізації програмованої клітинної смерті, ми вважали доцільним глибше дослідити механізми апоптозу, оскільки це дозволить краще зрозуміти патогенетичні механізми досліджуваної патології та сприятиме пошуку нових ефективних лікувальних засобів.

Мета дослідження - провести порівняльний аналіз кореляційних зв'язків між рівнем активних форм кисню, величиною трансмембранного потенціалу мітохондрій та рівнем апоптозу в крові та бронхоальвеолярному змиві у щурів для виявлення додаткових патогенетичних механізмів формування гепатопульмонального синдрому.

Матеріали та методи

Досліди проводили на 48 безпородних щурах-самцях масою 180-220 г. Першу експериментальну модель гепатопульмонального синдрому ми створювали шляхом накладання подвійної лігатури на загальну жовчовивідну протоку і подальшого її пересічення скальпелем [Fallon, 1997]. Тварин анестезували внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Виконавши розріз під мечовидним відростком, загальну жовчовивідну протоку відділяли від розташованих поруч тканин, накладали подвійну

Таблиця 1. Вірогідність кореляційних зв'язків між показниками апоптозу, трансмембранного потенціалу мітохондрій та рівнем АФК моноцитів у крові щурів при гепатопульмональному синдромі.

Кореляційні зв'язки		Експериментальна модель	Коефіцієнт кореляції, r_{xy}	Вірогідність кореляційного зв'язку, p
Кількість моноцитів зі зниженим $\Delta\Psi$, %	Кількість апоптичних моноцитів, %	1	0,89	<0,01
		2	0,84	<0,01
Внутрішньоклітинний рівень АФК, %	Кількість апоптичних моноцитів, %	1	0,90	<0,01
		2	0,86	<0,01
Внутрішньоклітинний рівень АФК, %	Кількість моноцитів зі зниженим $\Delta\Psi$, %	1	0,89	<0,01
		2	0,84	<0,01

Таблиця 2. Вірогідність кореляційних зв'язків між показниками апоптозу, трансмембранного потенціалу мітохондрій та рівнем АФК альвеолярних макрофагів у бронхоальвеолярному змиві щурів при гепатопульмональному синдромі.

Кореляційні зв'язки		Експериментальна модель	Коефіцієнт кореляції, r_{xy}	Вірогідність кореляційного зв'язку, p
Кількість альвеолярних макрофагів зі зниженим $\Delta\Psi$, %	Кількість апоптичних альвеолярних макрофагів, %	1	0,83	<0,01
		2	0,92	<0,001
Внутрішньоклітинний рівень АФК, %	Кількість апоптичних альвеолярних макрофагів, %	1	0,67	<0,02
		2	0,67	<0,02
Внутрішньоклітинний рівень АФК, %	Кількість альвеолярних макрофагів зі зниженим $\Delta\Psi$, %	1	0,78	<0,01
		2	0,76	<0,01

лігатуру, вище і нижче місця планованого перетину. Потім загальну жовчовивідну протоку пересікали скальпелем. В контрольній групі № 1 тварин загальна жовчовивідна протока була відділена від тканин, але не пересікалася. Післяопераційна рана пошарово, наглухо зашивалася. На 31-у добу після операції тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом.

Друга експериментальна модель ГПС була створена шляхом 8-тижневого внутрішньошлункового введення олійного розчину ССІ4 (400 г на 1 л) в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини в перший день експерименту, 0,3 мл на 100 г на третій день експерименту і далі кожного третього дня до закінчення експерименту 0,3 мл на 100 г. Додатково в раціон щурів було введено суміш кукурудзяної муки, смальцю і холестеролу та розчин алкоголю. Контрольна група тварин №2 перебувала на стандартному раціоні віварію і отримувала внутрішньошлунково оливкову олію в еквівалентній кількості [Zhang, 2007].

Утримання тварин та експерименти проводилися у відповідності до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" [European convention].

Популяцію моноцитів крові отримували за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв. центрифугування при температурі 4°C і швидкості 1500 об/хв. утворювалися дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі плазма-верифікол щільністю 1,077) складалася із мононуклеарних клітин - 80% лімфоцитів, 15-18% моноцитів і незначного (2-3%) додатка гранулоцитів. Розді-

лення лімфоцитів і моноцитів здійснювали методом ізокінетичного центрифугування протягом 5 хв. при 400 об/хв. в градієнті фіколу-верографіну щільністю 1,060 [Нейко, 2010]. Популяцію альвеолярних макрофагів отримували шляхом центрифугування клітинної суспензії БА3 (2 x 10⁶ клітин/мл) при 1500 об/хв. протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Верхня інтерфаза (на межі БА3-верифікол щільністю 1,048) складалася із альвеолярних макрофагів [Чичахов, 2003].

Рівень активних форм кисню (АФК) визначали за допомогою барвника із заблокованою флюоресценцією - дигідродихлорфлюоресцеїну діацетату (ДФХ-ДА) [Чечина, 2009]. Аналіз зразків клітин проводився на проточному цитометрі Epics XL ("Beckman Coulter", США) з допомогою гістограм та відповідних їм вікон статистики, що містили показники середньої геометричної інтенсивності світіння мічених клітин. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках.

Рівень мембранного потенціалу мітохондрій визначали з допомогою набору реактивів "MitoScreen" ("BD Pharmigen", США) [Чечина, 2009], ключовим реагентом якого є флюорохром 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3' тетраетилбензімідазолілкарбоціанін йодид (JC-1). Отримані зразки аналізували на проточному цитометрі Epics XL ("Beckman Coulter", США), визначаючи процентний вміст моноцитів або альвеолярних макрофагів нормальним значенням $\Delta\Psi$, що характеризуються як FL-2, так і FL-1-світінням і процент клітин із зниженим значенням $\Delta\Psi$, що володіють здатністю до FL-1-світіння. Результати виражали у відсотках (співвідношення числа моноцитів або альвеолярних макрофагів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом і загальної

кількості клітин).

Для оцінки реалізації апоптозу мононуклеарних фагоцитів БАЗ та крові використовували ФІТЦ-мічений анексин V, який має здатність зв'язуватися з фосфатидилсерином на зовнішній поверхні плазмолем, та пропідію йодид (PI), яким визначали некротизовані клітини, з набору реагентів "ANNEXIN V FITC" ("Beckman Coulter", США) [Zhao, 2010]. Аналіз проб проводили на проточному цитометрі EricsXL ("Beckman Coulter", США).

Статистичну обробку отриманих даних проведено стандартними методами варіаційної статистики з використанням пакету статистичних програм. Результати наведено як $(M \pm m)$, де M - середнє значення показника, m - стандартна похибка. Достовірність розбіжностей між досліджуваними показниками визначалася за допомогою двовибіркового критерію Стюдента.

Кореляційний аналіз проводили між усіма досліджуваними показниками. Вираховували коефіцієнт лінійної кореляції (r) та його достовірність (p), що відповідним чином позначалося в таблицях (кореляційних матрицях). Якщо показник $r=0$, зв'язок вважався відсутнім, у діапазоні 0 - 0,3 - свідчив про слабку кореляцію, проміжок показника 0,3 - 0,7 характеризував зв'язок середньої сили, а інтервал 0,7 - 1,0 вказував на сильну кореляційну взаємодію. Коефіцієнт кореляції оцінювали як достовірний при $p < 0,05$.

Результати. Обговорення

Проведений кореляційний аналіз показав тісний прямий взаємозв'язок між показниками апоптозу, $\Delta\Psi$ та рівнем АФК моноцитів у крові щурів як при накладанні подвійної лігатури на загальну жовчевивідну протоку, так і при тетрахлорметан - індукованому ГПС ($p < 0,01$) (табл. 1).

Головними продуцентами АФК в організмі виступають активовані фагоцити (моноцити і гранулоцити крові, макрофаги), які виділяють супероксид в реакції, що каталізується ферментним комплексом - НАДФ-оксидазою. Після розпізнавання, прикріплення і, особливо, захоплення об'єкта фагоцити захоплюють позаклітинний кисень і потім генерують супероксид аніон, перекис водню (H_2O_2), гідроксилу радикал (ОН), гіпохлорну (НОСІ) і гіпобромну кислоти (НОВr), що і складає суть "респіраторного вибуху" [Нейко, 2010]. Збільшення кількості клітин зі зниженим трансмембранним потенціалом мітохондрій може бути наслідком накопичення в них АФК.

Провівши порівняльний аналіз кореляційних зв'язків між досліджуваними показниками у бронхоальвеолярному змиві встановлено, що при ГПС, індукованому тетрахлорметаном і перев'язкою загальної жовчевивідної протоки наявний достовірний позитивний зв'язок

середньої сили між рівнем АФК і показником раннього апоптозу, та сильний кореляційний зв'язок при порівнянні $\Delta\Psi$ з внутрішньоклітинним вмістом АФК і відсотком апоптичних клітин (табл. 2).

Відомо, що мітохондрії є джерелом енергії, яка забезпечує гомеостаз організму, та джерелом проапоптогенних сигналів, які ініціюють клітинну загибель. При цьому окиснені субстрати мітохондрії використовують для формування мембранного потенціалу у вигляді протонного градієнта на їх внутрішній мембрані [Wang, 2001]. Наше дослідження показало тісний взаємозв'язок між даними процесами при двох експериментальних моделях ГПС, що характеризувався пропорційним зниженням $\Delta\Psi$ при зростанні внутрішньоклітинного рівня АФК як у крові, так і в БАЗ.

У свою чергу, надмірна генерація АФК є ранньою ознакою апоптичних змін у клітині, які відбуваються в умовах норми і патології під дією певних внутрішньо- і позаклітинних чинників. При цьому основною мішенню АФК є фосфатидилсерин, який при окисненні перетворюється на гідропероксид фосфатидилсерину, що переміщується з внутрішнього боку мембранного бішару на зовнішній, у результаті чого він зв'язується з анексином та реєструється цитофлуориметрично [Zhang, 2003].

Наше дослідження показало, що при експериментальному ГПС у крові взаємозв'язок між рівнем АФК і відсотком апоптичних клітин був сильнішим, ніж у БАЗ, хоча можна говорити і про залежність цих двох процесів у легенях. Це свідчить про те, що в умовах ГПС у легенях реалізація клітинної загибелі здійснюється не тільки мітохондріальним, але й іншими шляхами. Враховуючи отримані попередньо дані, можна вважати, що при експериментальному ГПС апоптоз у легенях ініціюють АФК і система фактору некрозу пухлин- α .

Висновки та перспективи подальших розробок

1. При гепатопульмональному синдромі, індукованому тетрахлорметаном або перев'язкою загальної жовчевивідної протоки, встановлено позитивний значимий кореляційний зв'язок між рівнем раннього апоптозу, активними формами кисню та трансмембранним потенціалом мононуклеарних фагоцитів у крові і бронхоальвеолярному змиві. Це свідчить про важливу роль мітохондріально-опосередкованого шляху клітинної загибелі у патогенезі гепатопульмонального синдрому.

У подальших дослідженнях планується встановити роль системи фактору некрозу пухлин- α в ініціації клітинної загибелі за умови гепатопульмонального синдрому, використовуючи різні експериментальні моделі.

Список літератури

Абрагамович М.О. Гепатопульмональний синдром: особливості патогенезу, діагностики, клінічного перебігу

та лікування /М.О.Абрагамович // Український медичний альманах. - 2010. - Т.13, №5. - С. 10-13.

Ивашкин В.Т. Гепатопульмональный синдром /В.Т.Ивашкин, М.А.Морозова, М.В.Маевская //Трансплан-

- тология. - 2009. - №2. - С. 5-8.
- Кисеньзалежні функції фагоцитів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень /Є.М.Нейко, П.П.Герич, М.М.Островський, Л.М.Томашук //Здобутки клінічної і експериментальної медицини. - 2010. - №1. - С. 100-104.
- Огурцов П.П. Курс клинической гепатологии /П.П.Огурцов, Н.В.Мазурчик. - Москва, 2008. - 178 с.
- Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза /О.Е.Чечина, А.К.Биктасова, Е.В.Сафонова [и др.] //Бюллетень сибирской медицины. - 2009. - №2. - С. 67-72.
- Самсонов А.В. Функциональное состояние легочных макрофагов у экспериментальных животных после применения общей гипертермии /А.В.Самсонов, Н.В.Долотина //Бюллетень СО РАМН. - 2011. - №1(31). - С. 5-8.
- Чичахов Д.А. Выделение альвеолярных макрофагов из бронхоальвеолярной лаважной жидкости у новорожденных на градиенте перколлы /Чичахов Д.А., Пулин А.М. //Материалы IX Конгресса педиатров России. - М. - 2003. - С. 313-314.
- Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome /M.B.Fallon, G.A.Abrams, J.W.McGrath [et al.] //Am. J. Physiol. - 1997. - Vol.272. - P. 779-784.
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. - Council of Europe. Strasbourg. - 1986. - №123. - 52 p.
- Fluckiger M. Vorkommen von trommelschagel - formigen Fingerringphalangen ohne chronische Veränderungen an der Lungenorder am Herzen /M.Fluckiger //Vien Med wochenschr. - 1884. - Vol.34. - P. 1457-1461.
- Frequency of hepatopulmonary syndrome in cirrhotic patients /M.Shafiq, A.A.Khan, A.Alam [et al.] //J. Coll. Physician. Surg. Pak. - 2008. - Vol.18, №5. - P. 278-281.
- Kennedy T.C. Exercise-aggravated hypoxemia and orthodoxy in cirrhosis /T.C.Kennedy, R.J.Knudson //Chest. - 1977. - Vol.72. - P. 305-309.
- Krowka M.J. Hepatopulmonary syndrome: Current concepts in diagnostic and therapeutic considerations /M.J.Krowka, D.A.Cortese //Chest. - 1994. - Vol.105. - P. 1528.
- Macedo L.G. Hepatopulmonary syndrome: an update /L.G.Macedo, E.P.Lopes //Sao Paulo Med. J. - 2009. - Vol.127(4). - P. 223-230.
- Multiple pathogenic factor-induced complications of cirrhosis in rats: A new model of hepatopulmonary syndrome with intestinal endotoxemia /Hui-Ying Zhang, De-Wu Han, Zhong-Fu Zhao [et al.] //World J. Gastroenterology. - 2007. - Vol.13(25). - P. 3500-3507.
- Oxidant-induced cell death in retinal pigment epithelium cells mediated through the release apoptosis-inducing factor /C.Zhang, J.Baffi, S.Cousins, K.G.Csaky //J. of Cell Science. - 2003. - №116. - P. 1915-1923.
- Prospective Evaluation of Liver Transplantation in Patients with Hepatopulmonary Syndrome - A Taiwan Experience /Cheng-Tang Chiu, Sung Cheng Lee, Wei-Chen Lee, Fen-Chiung K. Lin //Gastroenterology. - 2009. - Vol.136, Issue 5, Suppl. 1. - P. A-815.
- Snell A.M. The effects of chronic disease of the liver on the composition and physicochemical properties of blood: changes in the serum proteins; reduction in the oxygen saturation of the arterial blood /A.M.Snell //Ann. Intern. Med. - 1935. - Vol.9. - P. 690-711.
- The CD14+/lowCD16+ monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14+ CD16-subset /C.Zhao, Y.C.Tan, W.C.Wong [et al.] //Cell Death and Disease. - 2010. - Vol.1 - P. 1-11.
- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis /X.Wang //Genes Dev. 2001. - Vol.15. - P. 2922-2933.

Криницька І.Я.

УСТАНОВЛЕННЯ КОРРЕЛЯЦІЙНИХ СВ'ЯЗЕЙ МІЖДИ УРОВНЕМ АКТИВНИХ ФОРМ КИСЛОРОДА, ТРАНСМЕМБРАННИМ МИТОХОНДРІАЛЬНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ І АПОПТОЗОМ В КРОВІ І БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМУ СМЬВЕ КРИС С МОДЕЛІВАННИМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНИМ СИНДРОМОМ

Резюме. Целью исследования было провести сравнительный анализ корреляционных связей между уровнем апоптоза и показателями трансмембранного потенциала митохондрий и активных форм кислорода в крови и бронхоальвеолярном смыве у крыс для выявления дополнительных патогенетических механизмов формирования гепатопульмонального синдрома. Установлено положительную значимую корреляционную связь между уровнем раннего апоптоза, активными формами кислорода и трансмембранным потенциалом мононуклеарных фагоцитоз в крови и бронхоальвеолярном смыве. Это свидетельствует о важной роли митохондриально-опосредованного пути клеточной гибели в патогенезе гепатопульмонального синдрома.

Ключевые слова: корреляционные связи, апоптоз, трансмембранный митохондриальный потенциал, активные формы кислорода, гепатопульмональный синдром.

Krynytska I.Y.

CORRELATIONS BETWEEN REACTIVE OXYGEN SPECIES, TRANSMEMBRANE MITOCHONDRIAL POTENTIAL AND APOPTOSIS IN BLOOD AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE IN RATS WITH MODULATED HEPATOPULMONARY SYNDROME

Summary. The aim of the research was to carry out a comparative analysis of correlations between the level of apoptosis, mitochondrial transmembrane potential indices and reactive oxygen species in blood and bronchoalveolar lavage of rats to identify additional pathogenic mechanisms of hepatopulmonary syndrome development. The significant positive correlation between the level of apoptosis, reactive oxygen species and mitochondrial transmembrane potential of mononuclear phagocytes in blood and bronchoalveolar lavage was found. This indicates the significant role of mitochondrial-mediated pathway of cell death in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome.

Key words: correlation, apoptosis, mitochondrial transmembrane potential, reactive oxygen species, hepatopulmonary syndrome.

Стаття надійшла до редакції 31.10.2012 р.