Антонова Е.И.
Омский государственный педагогический университет

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ГЕПАТОЦИТОВ АМФИБИЙ ВИДА RANA TERRESTRIS ИНДУЦИРУЕМАЯ ТЕПЛОВЫМ СТРЕССОМ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА

После воздействия гипертермии на организм амфибий вида Rana terrestris количественные показатели ДНК гепатоцитов отражают первичные проявления компенсаторно-приспособительной реакции организма – увеличивается уровень компактизации ДНК, уменьшается площадь распределения хроматина и площадь ядер, развивается метаболическая депрессия за счет снижения количества гепатоцитов в S-и G2-M-стадии клеточного цикла, увеличивается доля погибших гепатоцитов и увеличивается активность каспазы 3. Соотношение путей гибели гепатоцитов составляет 0,8 с преобладанием пропидиумиодид-позитивных гепатоцитов над хехст-позитивными.

Экстремальная экзогенная гипертермия определяет проявление крайнего напряжения функциональных систем организма сопряженного с истощением функционального потенциала и механизмов сохранения гомеостаза печени, отражая степень толерантности организма к гипертермии согласно исходного индивидуального уровня устойчивости, обусловленного генотипом особи [27]. Динамический баланс между гибелью и пролиферацией клеток в организме составляет основу тканевого гомеостаза. Эволюционное давление сформировало несколько программ клеточной гибели, которые по мере усложнения и увеличения продолжительности жизни организмов обеспечивают контроль за клеточной популяцией в многоклеточном организме и разнообразие биологических событий, которые включают морфогенез, тканевый гомеостаз и устранение дефектных клеток [26, 10, 17, 33]. Анализ структуры интерфазного хроматина, на самых ранних этапах становления компенсаторно-приспособительных реакций, можно рассматривать как неспецифическое звено регуляции клеточной активности, которое через создание конформационных структур ДНК дает представление о функциональной активности ядра и клетки в целом, о скорости программируемой клеточной смерти и компенсаторно-пролиферативных процессах [13, 16]. Анализ количества содержания ДНК и размера генома с помощью цитофотометрии важен как в биологическом, так и клиническом аспекте [34, 21]. Вопрос о том, как увеличение размера генома (С-ценность) влияет на те или иные функции животных на клеточном, тканевом и организменном уровнях, в связи с адаптацией полиплоидных видов или популяций к окружающей среде, далек от разрешения. В связи, с чем целью нашего исследования явилось изучение динамики показателей клеточного цикла гепатоцитов Rana terrestris в соответствии с размером генома и соотношения уровней деструктивных и репаративных процессов после однократной тепловой нагрузки.

Материалы и методы Эксперимент поставлен на амфибиях вида Rana terrestris (остромордые лягушки половозрелые самцы 3-х летки). В каждой группе 15 животных составили контрольную группу и 15 животных подверглись гипертермии. Учитывая литературные данные о сезонной, суточной и физиологической ритмике, все эксперименты проведены в весенне-летний период на голодных животных с 9 до 12 часов дня. Острого перегревания достигали путем пребывания животных в течение 20-30 минут в принудительном статичном терморежиме (32°С) в условиях свободного плавания в термоградиентном лотке с дополнительной аэрацией [4]. До и после эксперимента у животных индивидуально определяли массу тела на электронных весах «WA33» и ректальную температуру электротермометром «ТЭП – 16». Температурное воздействие применяемые в эксперименте моделировало тепловой шок средней тяжести [32, 23, 9]. Материал для гистологических исследований всегда забирался из одних и тех же долей печени через час после воздействия. Мазки печени окрашивали по

Фельгену в модификации G. Olson, в реактиве Шиффа. На препаратах определяли состояние обоих фракций хроматина – интегральную плотность деконденсированного, конденсированного хроматина и общую интегральная плотность хроматина (у.е.); площадь распределения хроматина и площадь ядра (мкм^2); среднюю оптическую плотность и плотность обеих форм хроматина (у.е.). Измерения параметров ДНК проводились на сканирующем микроскопе-фотометре «Люмам ПМ-11». В каждой группе у каждого животного количество ДНК было измерено в 200 ядрах. Во всех случаях исследовали только одноядерные гепатоциты [3].

Тест «живое и мертвое» (life and dead assay) [22] проводили путем прижизненного окрашивания гепатоцитов ядерными красителями Hoechst 33342 (Sigma, США; раствор в концентрации 20 мкг/мл на среде МЗ в течение 15 мин) [15] и йодистым пропидием (Sigma, США; раствор в концентрации 20 мкг/мл на среде МЗ в течение 25 мин) что позволяет разделить гепатоциты на группы, основываясь на таких критериях, как состояние плазматической мембраны и ядра. Для этого один грамм ткани гомогенизировали, клетки отмывали 5 мин при 1500 об/мин с помощью PBS с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) для устранения неспецифического связывания, в микропробирки с клетками добавляли краситель Hoechst 33342 и/или йодистый пропидий. Клетки центрифугировали, отбрасывали надосадочную жидкость и 2 раза отмывали раствором PBS с добавлением 1% BSA. Далее ресуспензировали в растворе глицерина с 4% параформальдегидом в соотношении 1:1 в общем объеме 8 мкл. Фиксированные таким образом клетки наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и запаивали жидким парафином. Гепатоциты, у которых ядра окрашены Hoechst 33342, считают жизнеспособными, если их ядра не фрагментированы, или апоптозными, если хроматин конденсирован и(или) ядра фрагментированы. Ядра, окрашенные йодистым пропидием указывают на нарушение целостности плазматических мембран гепатоцитов [29]. Для этого использовался флуоресцентный микроскоп Axioscope (Zeiss) с применением блока фильтров «Голубая» при длине волны ? 500-550 и 600-700. Проводился подсчет фрагментированных ядер в расчете на 300 клеток в 5 полях зрения. Биохимическое определение терминальной стадии апоптоза проводили, используя коммерческий набор «Caspase-3 Assay Kit» фирмы «Sigma» на спектрофотометре Platr Reader Star-30 KENSTAR в мкм/мг белка по инструкции производителя.

Статистическую обработку полученного материала осуществляли с помощью пакета прикладных программ ”STATISTICA-5” P?0,05 [6]. Различия между независимыми выборками определяли с помощью критерия Mann-Whitney тест, многофакторного дисперсного анализа MANOV, по критерию Стьюдента (t), Вилкоксона (U), ? ^{2} Пирсона.

Собственные данные Оптико-структурный анализ хроматина ядер гепатоцитов позволил выявить состояние хроматина у интактных и экспериментальных животных. Так в контроле диффузный хроматин Rana terrestris имеет большую интегральную оптическую плотность (69,4%), в отличие от конденсированного (30,6%) – 2,5±0,05 и 1,12±0,04 у.е. соответственно. Средняя оптическая плотность (уровень компактизации) выше у гетерохроматина – 0,08±0,001 и 0,16±0,0025 у.е. соответственно. Площадь распределения эухроматина в ядрах гепатоцитов значительно превышает площадь распределения гетерохроматина (33,0±0,76 и 8,19±0,35 мкм^2 соответственно). На основании частот интегральной оптической плотности ядер популяция гепатоцитов по стадиям клеточного цикла распределена следующим образом – 2,25% гепатоцитов являются гиподиплоидными, 87,8% находятся в G0-G1 стадии, 1,75% в G2-M и в S– стадии – 7,5% гепатоцитов интактной печени Rana terrestris (рис. 1, 2). Пространственно-топографически хроматин представлен мелкозернистыми фракциями с равномерным распределением по объему ядра. Встречаются крупные зоны конденсации хроматина, которые могут иметь различную локализацию (рис. 3).

После перегревания отмечается сверхкомпактизация хроматина, что проявляется в уменьшении периметра, коэффициента округлости, площади распределения и интег-

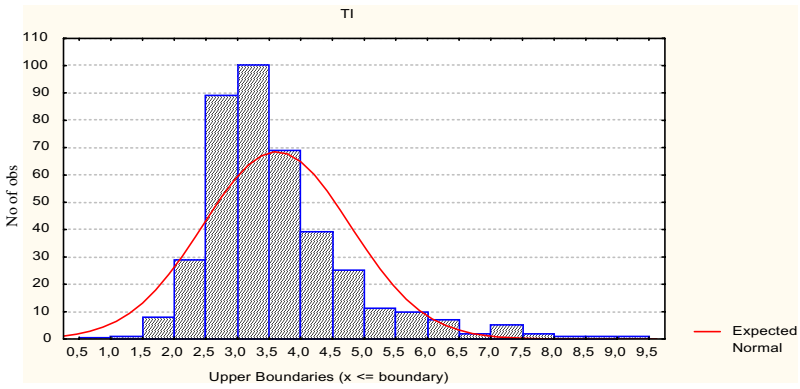

Рисунок 1. Амфибии Rana terrestris. Контроль. Гистограмма распределения популяции гепатоцитов по клеточному циклу. TI – интегральная оптическая плотность хроматина

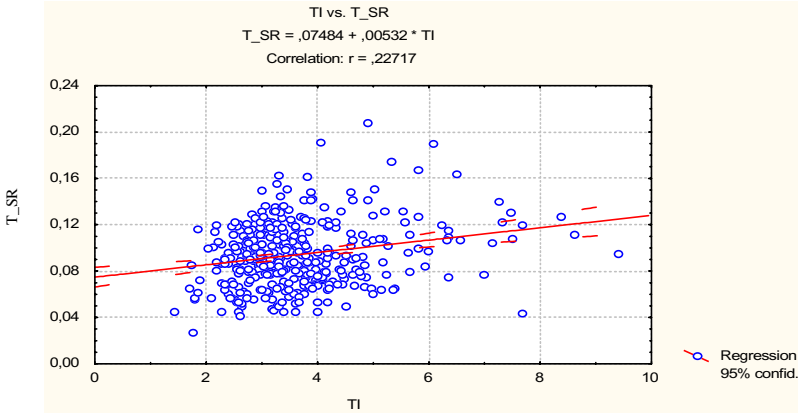

Рисунок 2. Амфибии Rana terrestris. Контроль. Двумерное распределение ядер гепатоцитов по TI – интегральной оптической плотности ДНК и T_RS – средней оптической плотности ДНК. Многофакторный дисперсный анализ MANOV.

ральной оптической плотности эухроматина. Так увеличение интегральной оптической плотности гетерохроматина в сравнении с контролем происходит на 19,7% (1,12±0,04 и 1,67±0,04* у.е. соответственно). На 20,0% увеличивается средняя оптическая плотность эухроматина (0,08±0,001 и 0,12±0,001* у.е. соответственно), в связи, с чем на 28,8% уменьшается площадь его распределения (33,0±0,76 и 18,2±0,33* мкм^2 соответственно). Дополнительная компактизация, которую проявляет эухроматин, определяет резкое уменьшение общей площади ядер гепатоцитов – на 22,2% (41,4±0,83 и 26,7±0,35* мкм^2 соответственно). А общая компактизация, по результатам средней оптической плотности, обеих фракций хроматина составила 14,2% (0,24±0,03 и 0,32±0,02* у.е. соответственно). После перегревания согласно интегральной оптической плотности и частотному анализу выявлено (рис. 4, 5) увеличение количества гиподиплоидных гепатоцитов – 2,75%, увеличивается количество гепатоцитов в G0-G1 стадии клеточного цикла, уменьшается количество в S стадии – 3,75%, угнетается митотическая активность гепатоцитов показатели которой составляют 1,25% (рис. 4, 5). Таким образом, индекс пролиферации снижается до 5 в сравнении с контролем, когда он составлял 9,3. Увеличение числа гиподиплоидных гепатоцитов сопровождается увеличением на 66,6% в сравнении с контролем активности каспазы 3 в цитозольной фракции гепатоцитов Rana terrestris (0,4±0,02 и 2,0±0,02* мкм/мг белка соответственно). Анализ теста «life and dead assay» выявил, что наряду с гепатоцитами в состоянии апоптоза – хехст-позитивные, присутствуют и пропидиумиодид-позитивные, которые проявляют некротический фенотип (рис. 7). Причем доля пропидиумиодид-позитивных гепатоцитов составляет 55%, а хехст-позитивных 45%, в соотношении 0,8, Общая доля погибших гепатоцитов после перегревания составила 30,8%, в расчете на 100 гепатоцитов. После тепловой нагрузки большая часть хроматина ядер амфибий морфологически представлена крупнозернистыми фрагментами гетерохроматина с различной локализацией в объеме ядра, а так же присутствуют ядра в состоянии пикноза (рис. 6).

Обсуждение результатов. Размер генома и его морфометрические параметры, вовлечены в регулирование метаболизма клетки. Внутриядерные комплексы подвергаются постоянной сборке и демонтажу, обеспечивая адекватное реагирование генома на действие экологических факторов, приводя к формированию струк-

турных переходов, которые коррелируют с динамическими процессами ядерной активности [12]. Считается, что ядерные объемы генетически детерминированы, прежде всего, количеством ДНК, степенью упаковки ДНК или декомпактизацией. Регуляция компактизации ДНК в пределах хроматина осуществляется факторами транскрипции, а сам механизм эволюционно законсервирован [28, 11, 14]. Согласно гипотезе Шарского о стратегии экономного метаболизма, увеличение размера генома у амфибий, в том числе через процесс полиплоидизации, приводит к понижению скорости метаболизма на клеточном и организменном уровнях. Большие геномы поддерживают более разнообразные метаболические пути и морфологические структуры, нежели маленькие, что обеспечивает амфибиям одинаково успешное существование как в водной, так и в воздушной среде обитания. Следовательно, к увеличению размера генома приводит естественный отбор в богатых информацией окружающих средах, а прогрессивно накопленная информация закрепляется наследственно, обеспечивая адаптацию к водно-воздушной среде обитания. Выявленный более высокий уровень компактизации гетерохроматина у амфибий, который на 33,4% превышает уровень компактизации эухроматина, по всей видимости, обусловлен тем, что наличие «избыточности» ДНК эукариот, по крайней мере, частично, определяется потребностями в компактизации самой себя [35]. Известно, что существует зависимость между размером генома и устойчивостью ряда видов земноводных к гипертермии и гипоксии. Полиплоидия ассоциирована с оксидативным стрессом и энергетическим голодани-

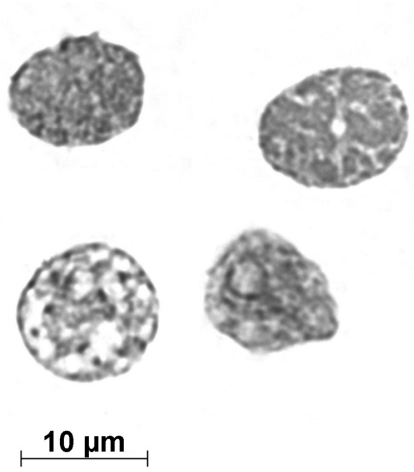

Рисунок 3. Амфибии Rana terrestris. Контроль. Окраска по Фельгену. Увеличение 10x90. Гетерогенность топографии хроматина гепатоцитов

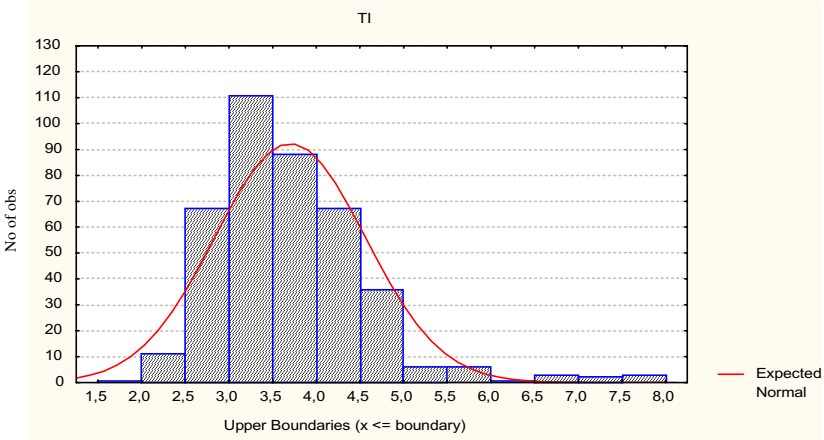

Рисунок 4. Амфибии Rana terrestris. Перегревание. Гистограмма распределения популяции гепатоцитов по клеточному циклу. TI – интегральная оптическая плотность хроматина

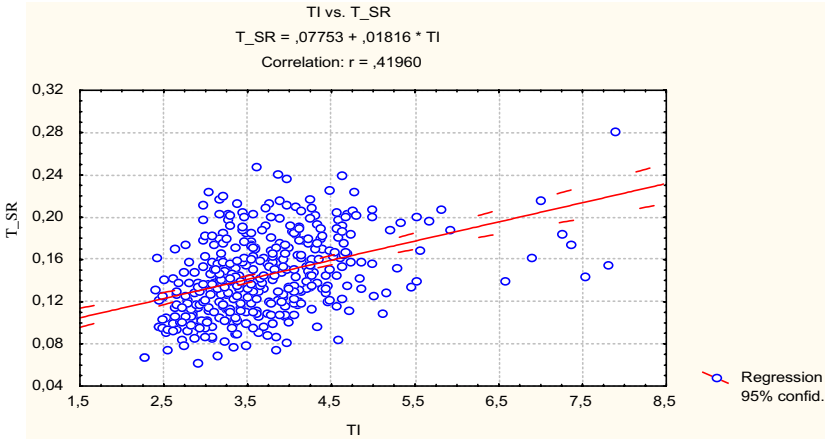

Рисунок 5. Амфибии Rana terrestris. Перегревание. Двумерное распределение ядер гепатоцитов по TI – интегральной оптической плотности ДНК и T_RS – средней оптической плотности ДНК. Многофакторный дисперсный анализ MANOV

ем и является эволюционно сформированным механизмом защиты клеток от повреждения. В связи, с чем выявленное нами снижение количества гепатоцитов в S-стадии клеточного цикла после воздействия гипертермии носит адаптивных характер и согласуется с системой терморегуляции амфибий и экологической специализацией. Т.к. температуры, ниже 50°С, являются пермессивными то ДНК-повреждающее действие опосредуется развивающейся тканевой гипоксией, увеличением продукции АФК, нуклеазами, ферментами лизосом, мембрана которых при повышенной температуре может стать проницаемой, а так же ксенобиотиками, которые вызывают сдвиг равновесия в системе прооксиданты/антиоксиданты, с дальнейшим развитием оксидативного стресса [1]. Выявленное нами увеличение активности каспазы 3, активность которой стала почти синонимом клеточной гибели, отражает процесс увеличения гибели гепатоцитов. Ее субстратами являются белки цитоскелета, ферменты репарации ДНК, регуляторы клеточного цикла ядра, протеинкиназы, специфический ингибитор CAD, который вызывает конденсацию и фрагментацию хроматина клетки [24, 19]. Блеббинг не происходит в клетках, в которых не увеличивается активность каспазы 3. Прокаспаза-3 обнаруживается как в межмембранном объеме митохондрий, так и в цитоплазме. Ее выход из набухших митохондрий в результате опосредован повреждением мембран, увеличением проницаемости внутренней мембраны митохондрий вследствие активации ПОЛ, истощением восстановленного глутатиона, образованием активных форм кислорода, разобщением окислительного фосфорилирования, увеличением содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме [5]. Тепловой шок стабилизирует присоединение к матриксу 5'-конца MAR– последовательности ДНК в транскрипционно-активном участке генов, вследствие чего активная часть генома получает дополнительную компактизацию после гипертермии, приобретая черты коллапсированного хроматина. Подавление репликации и транскрипции, инициируются изменения ассоциации ДНК с ядерным матриксом в транскрипционноактивных генах, нарушаются термодинамические свойства ДНК под действием гипертермии, определяя развитие метаболической депрессии в условиях температурного стресса, которая носит защитный характер и обеспечивает выживаемость гепатоцитов в ранней период компенсации после воздействия гипертермии. Т.к. определяет снижение продукцию АФК и минимизирует повреждающее их действие на белки, ДНК [20]. В связи, с чем после воздействия

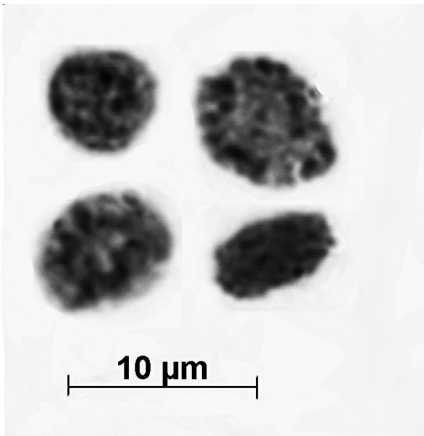

Рисунок 6. Амфибии Rana terrestris. Перегревание. Окраска по Фельгену. Увеличение 10х90. Пикноз. Развитие компактизации хроматина

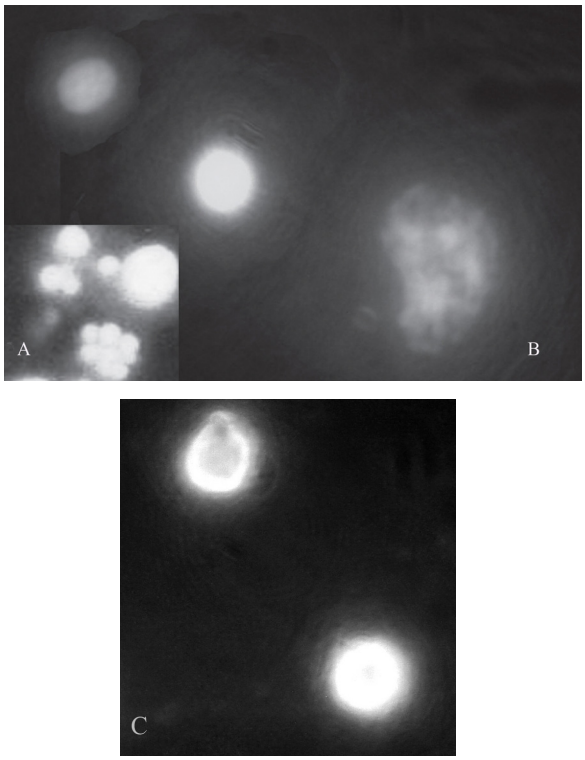

Рисунок 7. Амфибии Rana terrestris. Перегревание. Окраска (А, В) Хёхст 33342 (апоптический фенотип), пикноз и фрагментация ядра при апоптозе, апоптозные тела. (С) пропидиум йодид (некротический фенотип). Увеличение ок10хоб40

гипертермии выявлен рисунок хроматина, который отражает уменьшение мелкозернистости структуры хроматина и увеличение количества крупных фрагментов хроматина. Дополнительная гетерохроматизации определяет снижении в гепатоцитах Rana terrestris пролиферативных и метаболических процессов, и увеличение доли гиподиплоидных гепатоцитов. Увеличение, которых в свою очередь является пусковым механизмом для активации межтканевых стромально-паренхиматозных индукций в печени, которые инициируют процесс регенерации паренхимы [2, 31].

Таким образом, эффекты температуры могут рассматриваться как примеры тепловой фенотипической пластичности, контролируемые генотипом [7, 8, 18]. Особенности в количественном и пространственно-топографических показателях ДНК определяют формирование адаптивных модификаций метаболического функционирования гепатоцитов Rana terrestris, которые проявляются в развитии компенсаторно-приспособительной метаболической депрессии – уменьшение количества гепатоцитов в S-и G2-M-стадии клеточного цикла, как защитных механизмов от повреждающего действия развивающихся деструктивных биохимических процессов, индуцируемые гипертермией. Увеличение же доли погибших гепатоцитов характеризуется превышением доли гепатоцитов с некротическим фенотипом над количеством погибших, гепатоцитов которые, проявляют апоптическую морфологию, на фоне увеличения активности каспазы 3. Но увеличение числа погибших гепатоцитов следует рассматривать с позиции дальнейшего запуска каскада стромально-паренхиматозных коммуникаций в печени, которые обеспечивают механизмы выживания и репарации гепатоцитов Rana terrestris в условиях гипертермии [30, 2, 25].

Список использованной литературы:

1. Ганусова Г.В. Изучено влияние CoCl2 на активность NADP-зависимых дегидрогеназ и содержание микросомальных цитохромов P-450 и b5 в печени крыс разного возраста // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна Серія: біологія. 2005. 1-2. №709. 2005р.
2. Киясов А. П., Гумерова А. А. Клетки Ито в оногенезе и регенерации печени. Цитология. 2002. 44 (4): 342-349.
3. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А., Боев С.Ф., Сазонов В.В. Клетки крови. Современные технологии их анализа. М.: Триада-Фарм, 2002.-171с.
4. Константинов А.С., В.В. Зданович, В.Я. Пушкарь Энергобюджет карпа Cyprinus Carpio и золотой рыбки Carassius Auratus в оптимальных стационарных и переменных терморежимах // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. 2005. № 1. С. 39-44.
5. Проскуряков С.Я. Некроз – активная форма программируемой клеточной гибели // Биохимия. 2002. Т.67. Вып 4. С. 468-487.
6. Ребров О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера. 2002. 305с.
7. Angilletta M. J., Wilson R. S., Navas C. A., James R. S. Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms. Trends Ecol. Evol. 2003.18:234-240.
8. Calboli F. C., Gilchrist G. W., Partridge L. Different cell size and cell number contribution in two newly established and one ancient body size cline of Drosophila subobscura. Evolution. 2003. 57:566-573.
9. Chang Y.-M., Hou P.-C. L. Thermal Acclimation of Metabolic Rate May Be Seasonally Dependent in the Subtropical Anuran Latouche's Frog (Rana latouchii, Boulenger). Physiological and Biochemical Zoology. 2005. 78(6):947-955.
10. Danial N. N., Korsmeyer S.J. Cell death: critical control points. Cell. 2004. 116:205–219.
11. Dion M. F., Altschuler S. J., Wu L. F., Rando, O. J. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. 102, 5501-5506.
12. Dundr M., Misteli T. Functional architecture in the cell nucleus. Biochem. J. 2001. 356, 297-310.
13. Felsenfeld, G., Groudine, M. Controlling the double helix. Nature. 2003. 421: 448-453.
14. Frith M. C., Ponjavic J., Fredman D., Kai1 C., Kawai1 J., Carninci P., Hayshizaki Y., Sandelin A. Evolutionary turnover of mammalian transcription start sites Genome Research. 2006. 16:713-722.
15. Harada J. N., Bower K. E., Orth A. P., Callaway S., Nelson C. G., Laris C., Hogenesch J. B., Vogt P. K., Chanda S. K. Identification of novel mammalian growth regulatory factors by genome-scale quantitative image analysis. Genome Research. 2005. 15:1136-1144.
16. Hase J., Stein S., Vincent S., Molloy K.R., Kreth G., Cremer C., Bult C.J., O'Brien T.P. Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. JCB. 2006. V.174. N.1. 27-38.
17. James E. R., Green, D. R. Manipulation of apoptosis in the hostparasite interaction. Trends Parasitol. 2004. 20,280 -287.
18. Kingsolver J. G., Izem R., Ragland G. J. Plasticity of Size and Growth in Fluctuating Thermal Environments: Comparing Reaction Norms and Performance Curves. Integrative and Comparative Biology. 2004. 44(6):450-460.
19. Kivinen K, Kallajoki M, Taimen P. Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix Exp Cell Res. 2005. 15;311(1):62-73.
20. Koehler R. T., Peyret N. Thermodynamic properties of DNA sequences: characteristic values for the human genome Bioinformatics. 2005. 21(16):3333-3339.

21. Krishan A, Dandekar P, Nathan N, Hamelik R, Miller C, Shaw J. DNA index, genome size, and electronic nuclear volume of vertebrates from the Miami Metro Zoo Cytometry. 2005. 65(1):26-34.
22. Liu C.-C., Chien C.-H., Lin M.-T. Glucocorticoids reduce interleukin-1? concentration and result in neuroprotective effects in rat heatstroke, J. Physiol. 2000. 527. pp. 333–343.
23. McKechnie A.E., Wolf B.O. Partitioning of evaporative water loss in white-winged doves: plasticity in response to short-term thermal acclimation. Exp Biol. 2004. 207(Pt 2):203-10.
24. McLaughlin B. et al. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. 100, 715-720.
25. Milosevic N, Maier P. Lead stimulates intercellular signalling between hepatocytes and Kupffer cells. Eur J Pharmacol. 2000. 11;401(3):317-28.
26. Mizushima N. Methods to supervise autophagy Int J Biochem Alveole Biol. 2004; 36 (12):2491-502.
27. O'Brien, T. P., Bult C. J., Cremer C., Grunze M., Knowles B. B., Langowski J., McNally J., Pederson T., Politz J. C., Pombo A., Schmahl G., Spatz J. P., van Driel R. Genome function and nuclear architecture: from gene expression to nanoscience. Genome Res. 2003. 13:1029-1041.
28. Ono T., Fang Y., Spector D. L., Hirano T. Spatial and temporal regulation of condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. Mol. Biol. Cell. 2004. 15: 3296–3308.
29. Patel T., Gores G. Apoptosis and hepatobiliary disease. Hepatology. 1995. Vol. 21. P. 1725-1741.
30. Prosser C. C., Yen R. D., Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? World J Gastroenterol. 2006. 28;12(4):509-15.
31. Schlaf G., Schmitz M., Heine I., Demberg T., Schieferdecker H. L., Gotze O. Upregulation of fibronectin but not of entactin, collagen IV and smooth muscle actin by anaphylatoxin C5a in rat hepatic stellate cells. Histol Histopathol. 2004. 19 (4): 1165-1174.
32. Somero G.N. Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals. Optima, Limits, and Costs of Living Integrative and Comparative Biology. 2002. 42(4):780-789.
33. Tsujimoto Y, Shimizu S. Other mean{method} to die: autophagic has programmed mors of an alveole Mors of the Alveole Differs. 2005; 12 Suppl 2:1528-34.
34. Vinogradov A.E. Paradox of the dimension of a genome and a problem of superfluous DNA. A cytology 1999. 41: 5-13.
35. Vinogradov A.E., A spiral of DNA: importance of to be the rich collector of DUST. Nucleic acids Res. 2003. 31: 1838-1844.

Статья рекомендована к публикации 21.12.07