

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ

Печень вовлечена во многие патологические процессы, и ее повреждения вызывают серьезные нарушения метаболизма, иммунного ответа, детоксикации и антимикробной защиты. Гепатотоксический ответ, вызываемый химическими агентами зависит от концентрации токсиканта и локализации гепатоцита в печеночной дольке. Химические вещества могут взаимодействовать непосредственно с макромолекулами или через реактивные метаболиты. Иммунные механизмы реализуются через клеточные кооперации и опосредуются цитокинами, оксидом азота и системой комплемента. Апоптоз гепатоцитов может быть вызван *in vivo* или *in vitro* многими гепатотоксикантами. Анализ генов, контролирующих экспрессию Fas/APO-1 белка и bcl-2 белка, может

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *печень, гепатоцит, некроз, апоптоз*

MOLECULAR MECHANISMS OF LIVER DAMAGE

A.A.CHIRKIN

Vitebsk Medical University, Belarus

The liver is implicated in many processes, and its failure induced severe consequences for metabolism, immune response, detoxication and antimicrobial defenses. The hepatotoxic response elicited by a chemical agent depends on the concentration of the toxicant delivered to the hepatocytes across the liver acinus via blood flow. Hepatotoxicants can interact directly with cell macromolecules or via reactive metabolite. Immune mechanisms involve cell cooperation, and mediated by cytokines, nitric oxide, and complement. Hepatocyte apoptosis can be triggered either *in vivo* or *in vitro* by many toxic agents. Analysis of the genes controlling the expression of Fas/APO-1 protein and bcl-2 protein could provide essential information on the mechanisms of liver apoptosis.

KEY WORDS: *liver, necrosis, apoptosis.*

Печень относится к органам, способным к регенерации после повреждений, благодаря клеточной кооперации, наличию молекулярных механизмов реакции острой фазы и синтезу ряда молекул протекторной природы. Наиболее часто повреждения печени реализуются через химические и иммунологические механизмы.

Метаболическая зонация гепатоцитов

Гепатоциты долек образуют балки вдоль синусоидов. Кровоток от ветвей портальной вены и печеночной артерии к центральной вене в пределах дольки формирует три микроциркуляторных зоны. Клетки зоны 1 (перипортальная зона) расположены непосредственно у афферентных сосудов и получают кровь, богатую кислородом и питательными веществами. Клетки зоны 2 (центролобулярная зона) лежат дистальнее, а клетки зоны 3 (перивенная зона) расположены у терминальной печеночной вены. Создающийся таким образом

градиент кислорода и питательных веществ определяет зонацию гепатоцитов по характеру метаболизма. Гепатоциты афферентной зоны 1 и гепатоциты эфферентной зоны 3 отличаются по содержанию ферментов и интенсивности метаболизма (например, в клетках зоны 1 содержится больше митохондрий, интенсивнее протекают окислительные процессы, глюконеогенез, синтез холестерина, мочевины, желчных кислот; а в клетках зоны 3 более выражены гликолиз, липогенез, цитохром P450-зависимое гидроксирование, глюкуронидация ксенобиотиков) [17, 24, 25]. Величина отношения активности ферментов в гепатоцитах перипортальной и перивенной зон равна для аланинаминотрансферазы – 2,14, лактатдегидрогеназы – 1,32, gg-глутаминилтрансферазы – 3,42, глутаматдегидрогеназы – 0,72 и пируваткиназы – 0,82 [23]. Зонация метаболизма гепатоцитов лежит в основе селективной чувствительности их к повреждающим агентам [17, 33]. Например, алкоголь-ин-

дуцированное поражение гепатоцитов центрлобулярной зоны включает процессы: 1) локальная гипоксия, набухание и некроз отдельных гепатоцитов; 2) повышенная продукция (посредством алкогольдегидрогеназы и CYP2E1) и сниженная утилизация (через альдегиддегидрогеназу) ацетальдегида, накопление которого ведет к усиленному коллагенообразованию; 3) опосредованное изоформой цитохрома P450 - CYP2E1 – пероксидация липидов; 4) ослабление механизмов антиоксидантной и глутатионовой защиты клеток печени; 5) избирательное эндотоксин/цитокины-опосредованное воздействие на метаболизм и функциональное состояние центрлобулярных клеток Купфера [24].

Химическое повреждение

Известно достаточно большое количество веществ – детергентов, разбщителей окислительного фосфорилирования и свободного дыхания, канцерогенов, лекарств и др., способных индуцировать разрыв двухцепочечной молекулы ДНК в гепатоцитах и тем самым вести к гибели клеток: сульфат кадмия, диметил сульфат, N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин, 2-аминобифенил, диэтилстильбестрол, менадион, ацетаминофен, додецилсульфат натрия, фенформин HCl, D-ментол, фталевый ангидрид, тетрациклин солянокислый, 2,4-дихлорофенол, p-нитрофенол, литохолевая кислота, фенилтиокарбамид, гидразин сульфат [19]. Химическое повреждение печени могут вызывать природные вещества и ксенобиотики, включая фармацевтические препараты. На последние приходится до 25% всех случаев острого повреждения печени. Известно, что печень является мишенью для проявления токсичности ряда лекарственных препаратов, поскольку именно в этом органе происходит метаболизм ксенобиотиков. Гепатоциты функционируют в условиях высоких концентраций реактивных и токсических форм лекарственных препаратов. Последние могут быть токсичными в нативной форме или таковыми становятся в процессе их метаболизма. В процессе обезвреживания ксенобиотиков описывают две фазы: 1) метаболизм, то есть введение полярных групп с помощью цитохром P450-гидроксилазной системы; 2) конъюгация молекул с водорастворимыми лигандами [13]. Оба процесса служат для элиминации чужеродных компонентов из внутренней среды организма. Цитохром P450-гидроксилазная система включает флавопротеины и семейство гемопротеинов, локализованных на цитоплазматической стороне мембран эндоплазматического ретикулума. В метаболизме различных ксенобиотиков участвуют разные изоформы цитохрома P450. Выделяют два фонда цитохрома P450: первый вовлечен в метаболизм эндогенных веществ, а второй индуцируется экзогенными веществами. Процессы

конъюгации катализируют чаще всего УДФ-глюкуро-нилтрансфераза, сульфотрансфераза, глутатион-S-трансфераза. Глюкуронидация является основным видом конъюгации при детоксикации веществ. Сульфатация, как правило, обеспечивает снижение токсичности и ускорение клиренса ксенобиотиков. Глутатион-S-трансферазная реакция важна для нейтрализации нестабильных электрофильных молекул. Микросомальная глутатион-S-трансфераза тесно связана с цитохром P450-системой, что служит для быстрой инактивации активных метаболитов, образуемых при метаболизме ксенобиотиков. Глутатион содержится в высокой концентрации в печени (до 5 ммоль): 90% глутатиона содержится в цитозоле и остаток – в митохондриях. В митохондриях глутатион является антиоксидантом, восстанавливает перекись водорода и предупреждает пероксидацию липидов гидроксильным радикалом. При низкой концентрации глутатиона в клетке повышается ее чувствительность к свободно-радикальному повреждению. Цистеин для глутатиона в печени получается в процессе превращений метионина и серина, а в других тканях – преимущественно в процессе распада глутатиона. Ацетаминофеновая интоксикация индуцирует истощение резервов митохондриального глутатиона. Для предотвращения этого эффекта целесообразно назначение экзогенного цистеина в виде N-ацетилцистеина [26].

Метаболизм лекарств локализован не только в гепатоцитах, но также в синусоидальных эндотелиальных клетках, способных к превращениям ксенобиотиков. Ряд лекарств проявляет селективную токсичность по отношению к этим клеткам по сравнению с гепатоцитами. Эта селективность связана с более слабыми защитными механизмами синусоидальных эндотелиальных клеток к действию ксенобиотиков [35, 37].

Выделяют понятие прямой цитотоксичности химических веществ, согласно которому гепатотоксические метаболиты, связываясь с “критическими молекулами”, могут повреждать клетки печени. К ним относят электрофильные метаболиты (ковалентно связываются с белками) и свободные радикалы (включают перекисное окисление липидов или окисляют сульфгидрильные группы белков).

В настоящее время известны 5 основных механизмов, ведущих к гибели клеток: 1) повреждения плазматической мембраны и нарушения цитоскелета (blebbing); 2) дисфункция митохондрий; 3) утрата внутриклеточного ионного гомеостаза; 4) активация ферментов деградации веществ; 5) окислительный стресс в результате несоответствия прооксидантных и антиоксидантных ресурсов клетки.

1. Повреждения плазматической мембраны

Ксенобиотики могут оказывать прямое и опосредованное действие на цитоскелет гепатоцитов. Это сопровождается нарушениями структуры с образованием разрывов мембраны (blebs) и может непосредственно вести к гибели клетки. Плазматическая мембрана доступна для непосредственного повреждения экстрацеллюлярными детергентами или порообразующими белками (система комплемента, перфорин цитотоксичных лимфоцитов, аа-токсин бактерий). Этот процесс сопровождается выходом ферментов цитозоля (аспартат-аминотрансфераза, лактатдегидрогеназа и др.) в кровь. Повреждения плазматической мембраны являются этапом некротического механизма гибели клеток [11]. К сожалению, тонкие механизмы этого эффекта остаются неизвестными. Интоксикация фаллоидином – это пример гепатотоксической субстанции, нарушающей цитоскелет через стабилизацию актина вне зависимости от концентрации ионов кальция в цитозоле [18]. В то же время описаны два кальций-зависимых механизма повреждения плазматической мембраны: 1) за счет диссоциации актиновых микрофиламентов; 2) посредством активации нелизосомальных протеиназ, расщепляющих актин-связывающие протеины [27]. Повреждения липидного бислоя мембран, сопряженные с изменениями ее жидкости, как правило, связаны с активацией перекисного окисления липидов и истощением запасов АТФ [26].

2. Нарушения функций митохондрий

Повреждения механизмов окислительного фосфорилирования в митохондриальной мембране ведут к уменьшению АТФ и затем к гибели клеток. Истощение резервов АТФ является причиной клеточной гибели при аноксии/гипоксии, окислительном стрессе и действии токсических ксенобиотиков [34]. Стимуляция АТФ-потребляющих метаболических путей также ведет к истощению резервов АТФ. Резкое повышение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для электролитов и низкомолекулярных молекул обычно сочетается с клеточным некрозом независимо от внутриклеточной концентрации АТФ (синдром ММРТ). Неспецифическое повреждение внутренней митохондриальной мембраны чаще всего вызывается активацией перекисного окисления липидов или действием фосфолипазы. Специфический синдром ММРТ может проявиться при открытии определенных каналов [31]. Доказано, что митохондриальный ацидоз подавляет открытие таких каналов. Этим можно объяснить цитопротективный эффект ацидоза. Клеточное повреждение усиливается при более быстром восстановлении рН, чем количества АТФ, до нормального уровня. Этот “рН парадокс” доказывает, что закисле-

ние внутриклеточной среды в процессе истощения запасов АТФ является адаптивным механизмом, препятствующим развитию некротических изменений клетки. Возможно, это связано с ингибированием ферментов деградации (фосфолипазы, кальпаины и др.), оптимум рН которых находится в нейтральной среде. Фиалуридин оказывает гепатотоксический эффект через связывание с митохондриальной ДНК гепатоцитов [26].

3. Внутриклеточный ионный гомеостаз

Утрата внутриклеточного ионного гомеостаза – это наиболее ранний признак цитотоксичности ксенобиотика. Повреждение клетки сопряжено с повышением концентрации ионов натрия и кальция и уменьшением концентрации ионов калия в цитозоле. Хорошо известно, что в норме существует 1000-кратный градиент между экстрацеллюлярным (1-2 ммоль/л) и внутриклеточным (0,1-1,0 мкмоль/л) содержанием ионов кальция. Повышение концентрации ионов кальция происходит из внутриклеточных депо в эндоплазматическом ретикулуме и за счет повышения проницаемости плазматической мембраны гепатоцита. Поступившие ионы кальция способны активировать кальций-зависимые протеиназы, фосфолипазы и эндонуклеазы. Потеря ионов калия рассматривается как ранний признак повреждения клеток [14, 36]. Высокоактивные молекулы могут повреждать кальций-зависимую АТФазу путем ковалентного связывания или окисления SH-групп белка или за счет перекисного окисления окружающих фермент липидов. Повышенная концентрация ионов кальция в цитозоле вызывает повреждение цитоскелета и индуцирует blebbing. При высокой концентрации ионов кальция нарушаются митохондриальные функции и это ведет к гибели клеток. Повышение концентрации ионов кальция внутри клеток лежит в основе гепатотоксичности ацетаминофена и тетрахлорметана [38].

4. Ферменты деградации веществ

Активация ферментов деградации веществ (протеиназы, нуклеазы, фосфолипазы и др.) ведет к повреждению мембран, освобождению арахидоновой кислоты или фрагментации ДНК. Имеется тесная корреляционная зависимость между клеточной гибелью и интенсивностью нелизосомального протеолиза как функции рН. При истощении резервов АТФ происходит активация нелизосомных протеиназ. В этих процессах возможно появление новых антигенов. Ускоренная деградация фосфолипидов обнаруживается при окислительных и аноксических повреждениях клеток. Большое значение в деградации фосфолипидов приписывают фосфолипазе А₂. Митохондриальная фосфолипазная активность играет ведущую роль в развитии некротических изме-

нений в клетке по сравнению фосфолипазами цитозоля и лизосом. По всей видимости, фосфолипазы участвуют в подавлении пероксидации липидов и в защите от окислительного стресса [4, 36].

5. Свободные радикалы

Образование свободных радикалов и реактивных метаболитов является важным механизмом повреждения клеток. Свободнорадикальные формы кислорода образуются при стимуляции клеток Купфера и секвестрации полиморфноядерных нейтрофилов. При истощении резервов АТФ или окислительном стрессе ксантиноксидаза цитозоля способна продуцировать супероксидный радикал. Кроме того циклооксигеназа и липоксигеназа также способны генерировать супероксидный радикал и синглетный кислород в процессе биосинтеза простаноидов и лейкотриенов. Супероксидный радикал может образовываться в митохондриях, микросомах и пероксисомах. До 2% потребленного кислорода в митохондриях посредством кофермента Q и НАДН-КоQ-редуктазного комплекса может превращаться в супероксидный радикал. Продукция этого радикала возрастает в митохондриях при нарушениях цепи переноса электронов. Супероксидный радикал образуется в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов при функционировании монооксигеназной системы. В водной среде эти радикалы малоактивны и способны к диффузии. С помощью супероксиддисмутазы они быстро превращаются в перекись водорода. В металл-катализируемых реакциях возможно образование высокотоксичного, но обладающего низкой диффузионной способностью гидроксильного радикала. Он способен повреждать нуклеотиды, аминокислоты и липиды. При атаке гидроксильным радикалом ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран возникает цепная реакция перекисного окисления липидов. Внутриклеточная концентрация ионов железа играет ключевую роль в инициации перекисного окисления липидов. Анализируя работы, посвященные окислительному стрессу, можно обозначить следующие реактивные молекулы, играющие роль в развитии некротического повреждения гепатоцитов: супероксидный радикал, перекись водорода, гидроксильный радикал, гипохлорит, хлорамины, синглетный кислород, пероксирадикалы. Гидроксильный радикал способен повреждать ультраструктуру ДНК, что при хроническом воспалении может вести к гепатоканцерогенезу [16, 36, 40].

Печень имеет защитные антиоксидантные системы, которые препятствуют эффектам окислительного стресса. Глютатион-пероксидаза и каталаза обеспечивают разрушение перекиси водорода, супероксиддисмутаза обеспечивает интоксикацию супероксидного радикала,

глютатион-пероксидаза и глютатион-трансфераза участвуют в элиминации других кислородных радикалов. Известно, что эти ферменты определяют устойчивость гепатоцитов к действию свободных радикалов в разных зонах печеночных долек. При действии свободных радикалов не обязательна гибель клеток, но реален эффект повышения чувствительности клеток к другим альтерирующим агентам. При развитии патологии печени в сыроворотке крови могут накапливаться вещества, обладающие антиоксидантными свойствами: мочевиная кислота, билирубин, альбумин и др. Ряд экзогенных веществ - β -каротин, витамины А, Е, С – обладают антиоксидантными свойствами [26, 36].

В реакциях окислительного стресса и механизмах антиоксидантной защиты принимает участие оксид азота. NO образуется при превращении L-аргинина в L-цитруллин (фермент NO-синтаза). NO образуется в гепатоцитах, клетках Купфера и эндотелиальных клетках. Нитрозилирование SH-групп белков вредно для мембран клеток, но является способом резервирования NO вне клеток (S-нитрозоальбумин) и внутри клеток (S-нитрозоглютатион). Взаимодействие NO с транзитными металлами гемопротеинов (например, цитохром P450) нарушает их функционирование. Первично активные механизмы действия NO во многих клетках определяются его связыванием с растворимой гуанилатциклазой, что ведет к повышению концентрации цГМФ [26]. Кроме того NO стимулирует АДФ-рибозилирование белков. АДФ-рибозилирование глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы ведет к повреждению энергетики клетки. АДФ-рибозилирование актина ингибирует его полимеризацию и модифицирует функции цитоскелета [5].

NO действует как скавенджер кислородных радикалов, но может усиливать эффекты супероксидного радикала или ингибировать продукцию TNF- α , индуцированную эндотоксемией. NO и супероксидный радикал способны также формировать пероксинитриты (OONO-) с последующим освобождением гидроксильного радикала и липидной пероксидацией. Благодаря этому механизму NO и перекись водорода потенцируют свою цитотоксичность [3, 28].

Иммунные механизмы гепатотоксичности

Выделяют несколько основных механизмов повреждения печени посредством молекулярных механизмов, относящихся к иммунным реакциям: функционирование киллерных лимфоцитов и клеточных коопераций, образование неоантигенов и аутоантител, действие медиаторов (цитокины, оксид азота), активация системы комплемента.

1. Иммуноаллергическая гепатотоксичность

Электрофильные метаболиты могут ковалентно связываться с белками, образуя гаптены. Окислительное повреждение белков в результате образования или транслокации дисульфидных связей, а также окисления радикалов аминокислотных остатков ведет к формированию новых антигенных детерминант. Иммуный ответ возможен против гаптенных и неоантигенов. Аутоантитела выявляются при иммуноаллергических гепатитах, вызванных рядом лекарств. Например, токсичность анестетика галотана связана с иммуноопосредованным токсическим гепатитом: при метаболизме галотана образуется трифлюороацетилгалидин, который ковалентно модифицирует белки. Модифицированные белки оказывают 2 эффекта: 1) как антигены инициируют образование циркулирующих антител; 2) запускают лимфоцитопосредованную цитотоксичность. По крайней мере, против 7 микросомальных полипептидов были обнаружены аутоантитела в сыворотке крови больных галотановым гепатитом [20]. Нестероидный противовоспалительный препарат диклофенак иногда вызывает тяжелый гепатит, поскольку при его метаболизме и конъюгации с глюкуроновой кислотой образуется электрофильный метаболит, который провоцирует иммунный ответ и повреждение гепатоцитов [22]. Метаболит этанола – ацетальдегид образует аддукты с белками гепатоцитов, которые как неоантигены определяют гепатотоксичность спирта [24].

2. Цитотоксические лимфоциты

Цитотоксичность лимфоцитов занимает видное место в патогенезе различных заболеваний печени. Выделяют, по крайней мере, два основных механизма проявления цитотоксичности лимфоцитов. Во-первых, Т-лимфоциты способны находить антигены клеток-мишеней, и активироваться при взаимодействии с ними. При этом выделяются цитотоксические гранулы, которые вызывают цитолиз клеток-мишеней. Гранулы содержат порообразующий белок – перфорин и гидролитические ферменты, известные как гранзимы (сериновые протеиназы, эстеразы и др.). Мономеры перфорина в присутствии ионов кальция полимеризуются и образуют комплекс, который внедряется в мембрану клетки-мишени, обеспечивая потерю ее непрерывности. Поступление ионов кальция и гранзимов в цитозоль клетки-мишени ведет к ее гибели по механизму некроза [21, 32, 41]. Во-вторых, высказано предположение, что лимфоцит-опосредованная гибель клеток является процессом, не зависящим от присутствия ионов кальция. Полагают, что изменению проницаемости плазматической мембраны клеток-мишеней при межклеточном взаимодействии предшествует эндонуклеазный гидролиз ДНК (рецептор-опосредованный апоптоз посредством APO-1/Fas системы) [8, 12].

3. Цитокины

Образование цитокинов – это важный элемент поддержания гомеостаза организма. Однако, если имеется гиперпродукция цитокинов возможно повреждение печени. Большинство цитокинов образуется в печени при действии различных стимулов. Интерферон- γ продуцируется гепатоцитами в процессе вирусной инфекции. TNF- α синтезируется клетками Купфера при действии целой гаммы гепатотропных повреждающих агентов. Провоспалительные цитокины TNF- α , IL-1 и IL-6 секретируются клетками Купфера при гепатитах. Этот эффект сопряжен с синтезом белков острой фазы и повышением адгезии нейтрофилов в синусоидах. Эти же цитокины лежат в основе действия многих бактериальных эндотоксинов. Считают, что TNF- α и IL-1 определяют механизмы некроза и нарушения транспортных систем, IL-6 стимулирует синтез белков острой фазы, IL-8 служит потенциальным хемоаттрактантом для нейтрофилов. Интерферон- γ и липополисахариды через индукцию NO-синтазы усиливают продукцию оксида азота, токсичного для внутриклеточных патогенных факторов (микобактерии, лейшмании) и опухолевых клеток печени [6, 15, 29, 39, 42].

4. Система комплемента

Система комплемента состоит из каскада белков плазмы крови. Многие из них синтезируются в печени. Активация системы происходит при связывании C1-компонента с иммунным комплексом. Она сопровождается повышением фагоцитоза опсонизированных микробов (C3b), активацией клеток Купфера и нейтрофилов и др. Процесс служит для формирования атакующего мембрану комплекса на клеточной поверхности (C5b-C9). Этот механизм реализуется в печени при эндотоксемии, ишемии-реперфузии, действии свободных радикалов кислорода и иммунных реакциях [43].

5. Клеточные кооперации

Показано, что клетки Купфера играют важную роль в развитии повреждения печени. Септическое повреждение является одной из наилучших моделей изучения взаимодействия многих типов клеток. Можно описать следующую последовательность событий: повышение концентрации поступившего через портальную вену эндотоксина – активация клеток Купфера и освобождение ими хемоаттрактантов, включая интерлейкины, лейкотриен B₄, C5-компонент комплемента – поступление нейтрофилов из циркуляции – активированные нейтрофилы с рецепторами молекул адгезии прилипают к синусоидальным эндотелиальным клеткам, а молекулы адгезии ICAM-1 и ELAM-1 способствуют миграции лейкоцитов в паренхиму печени – активированные нейтрофилы продуцируют свободнорадикальные формы кис-

лорода, которые вызывают разные типы повреждения, например, активацию перекисного окисления мембран – макрофаги печени продуцируют токсические медиаторы и вызывают агрегацию тромбоцитов, что ведет к микротромбозам – узкие синусоиды тромбируются прилипшими нейтрофилами и тромбоцитами – развивается локальная гипоксия – появляются лобулярные некротические поражения [26].

Цитотоксичность ряда гуморальных факторов связана с особенностями синусоидальных эндотелиальных клеток. В отличие от других видов эндотелия, синусоидальный эндотелий фенестрирован и не имеет базальной мембраны. При печеночных вено-окклюзионных заболеваниях, после трансплантации костного мозга и некоторых других состояниях повреждение эндотелиальных клеток является начальным этапом Т-лимфоцит-опосредованной иммунной реакции. Сужение малых внутрипеченочных вен с откладыванием фибриногена и эритроцитов ведет к прекращению оттока крови, развивается ишемия печени со вторичным повреждением гепатоцитов. Некоторые лекарственные препараты (dacarbazine) и химические компоненты многих растений проявляют селективную токсичность по отношению к синусоидальным клеткам, инициируя развитие вено-окклюзионной патологии печени [7, 26].

Апоптоз

Апоптоз или “запрограммированная гибель клеток” является физиологическим процессом клеточного обновления. При апоптозе происходит сморщивание и конденсация хроматина и эндонуклеазная фрагментация ДНК без развития воспалительной реакции. Многие агенты способны индуцировать апоптоз. В неповрежденной печени апоптоз преимущественно наблюдается в ацинарной зоне 3. Апоптоз обнаруживают в процессе различных повреждений печени, но его регуляция не выяснена. Апоптоз развивается в отдельных клетках в отличие от некроза. В механизмах апоптоза важную роль играет рецепторная система CD95, которая способна экспрессироваться во многих клетках, включая гепатоциты. Считают, что связывание лиганда АРО-1/Fas с CD95 инициирует процесс апоптоза. Апоптоз является достаточно быстрым феноменом, например в печени крыс развитие апоптоза занимает 3 часа. Т-лимфоцитарная и естественная киллерная лимфоцитарная цитотоксичность часто реализуются через инициацию апоптоза. Другим триггером патологического апоптоза является фактор некроза опухолей. TNF является общим медиатором Т-лимфоцитарной и эндотоксиновой цитотоксичности. В отличие от некроза при апоптозе в гепатоцитах повышается синтез РНК и белков. Вероятно, это ответ на повышение активности ряда цитозольных и ядерных ферментов и, прежде всего, кальций,

магний-зависимой эндонуклеазы и цитоплазматической кальций-зависимой транскляминазы. В процессе апоптоза часто отмечается увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция. Недавно обращено внимание на протеиназы семейства интерлейкин-1bb превращающих ферментов, действующих на ядерные белки. Эти эндонуклеазы и протеиназы вызывают межнуклеосомную деградацию ДНК ядер, но не ДНК митохондрий. Цитоплазматическая транскляминаза катализирует разрыв связей между остатками глутамина и лизина, что влияет на процессы агрегации органелл, конденсации цитоплазмы и ретракции целых клеток. Развитие апоптоза в гепатоцитах сопровождается изменениями в деятельности внутриклеточных сигнальных систем типа цАМФ и протеинкиназы С [26]. Наиболее интересные результаты получены при исследовании экспрессии генов, способных ингибировать или активировать запрограммированную гибель клеток, например, bcl-2, c-myc, p53, TRPM-2 гены, а также гены комплекса Fas-лиганд/Fas-АРО-1-антиген. Установлено, что bcl-2 белок (молекулярная масса 25-26 kDa) располагается на внешней ядерной и митохондриальной мембранах и эндоплазматическом ретикулуме и действует как антиоксидант, ингибируя развитие апоптоза, вызванного перекисью водорода или истощением запасов глутатиона. Этот белок не найден в гепатоцитах, но обнаружен в малых желчных протоках. В гепатоцитах найден bax-белок, который рассматривается как ингибитор bcl-2. Гетеродимер bcl-2/bax способствует развитию апоптоза, а bcl-2 ингибирует процесс запрограммированной гибели гепатоцитов [9, 10, 30].

Оценка цитотоксичности лекарственных препаратов

Цитотоксичность различных веществ оценивают используя перфузию печени, срезы печени и изолированные гепатоциты. Наиболее стандартные результаты получаются на изолированных гепатоцитах. Используя гликохенодезоксихолевую кислоту как индуктор некроза и апоптоза, оценивают антинекротическое или антиапоптозное действие изучаемых лекарственных препаратов. Выраженность некроза оценивают по выходу в инкубационную среду цитозольных ферментов, а проявления апоптоза оценивают по регистрации фрагментов ДНК методом электрофореза или визуально оценивают фрагментацию ДНК с помощью специальных красителей. Используя комбинацию красителей Annexin-V и пропидиум йодид, можно дифференцировать апоптотические, некротические и нормальные клетки: апоптотические клетки позитивны для Annexin-V и негативны для пропидиум йодида, некротические клетки позитивны, а нормальные клетки негативны для обоих красителей [1, 2, 30].

Литература

1. Данченко Е.О. Лабораторные методы оценки апоптоза и некроза // Медицинская панорама (Лабораторная медицина).-1999.-№3.-С. 18-19.
2. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Луняк Н.К. Метаболическая терапия препаратами солянки холмовой. – М.:Фитос-1999.
3. Bautista A.P., Spitzer J.J. Inhibition of nitric oxide formation in vivo enhances superoxide release by the perfused liver // Am. J. Physiol. 266 (Gastrointest. Liver. Physiol. 29). – 1994. – G783-G788.
4. Bronk S.F., Gores G.J. pH dependent, non-lysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic cell injury of rat hepatocytes // Am. J. Physiol. – 1993. – Vol. 264. – P. G744-G751.
5. Clancy R.M., Leszczynska-Piziak J., Amin A. Et al. Nitric oxide ADP-ribosylates actin in association with the inhibition of cytoskeletal assembly neutrophils // J. Leukoc. Biol. – 1995. – Vol. 58. – P. 196-202.
6. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells) // Eur. J. Biochem. – 1990. – Vol. 192. – P. 245-261.
7. Deleve L.D. Dacarbazine toxicity in murene liver cells: a model of hepatic endothelial injury and glutathione defense // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1994. – Vol. 268. – P. 1261-1270.
8. Doherty P.C. Cell-mediated cytotoxicity // Cell. – 1993. – Vol. 75. – P. 607-612.
9. Fawthrop D.J., Boobis A.R., Davies D.S. Mechanisms of cell death // Arch. Toxicol.- 1991.- vol. 65.-P. 437-444.
10. Feldmann G. Liver apoptosis // J. Hepatol.- 1997.- vol. 26, Suppl. 2.- P. 1-11.
11. Florine-Casteel K., Lemasters J.J., Herman B. Lipid order in hepatocyte plasma membrane blebs during ATP depletion measured by digitized video fluorescence polarization microscopy // FASEB J. – 1991.- Vol. 5.- P. 2078-2084.
12. Goldstein P., Ojcius D.M., Young D.-E. Cell death mechanisms and the immune system // Immunol. Rev. – 1991. - Vol. 121. – P. 29-65.
13. Guengerich F.P. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 1990.-Vol. 25.-P. 97-153.
14. Herman B., Gores G.J., Nieminen A.L. et al. //Calcium and pH in anoxic and toxic injury. – Crit. Rev. Toxicol. – 1990. – Vol. 21. – P. 127-148.
15. Ioannidis I., Groot H. Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 hepatoma cells; evidence for co-operative action with hydrogen peroxide // Biochem. J. – 1993. – Vol. 296. – P. 341-345.
16. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury // PSEBM – 1995. – Vol. 209. – P. 104-111.
17. Jungermann K., Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations // Physiol. Rev.- 1989.-Vol. 69.-P. 708-764.
18. Kane A.B., Young E.E., Schanne F.A.X., Farber J.L. Calcium dependence of phalloidin-induced liver cell death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980.- Vol. 77.- P. 1177-1180.
19. Kedderis G.L. Biochemical basis of hepatocellular injury // Toxicol. Pathol. – 1996. –Vol. 24. – P. 77-83.
20. Kenna J., Satoh H., Christ D., Pohl L. Metabolic basis for a drug hypersensitivity: antibodies in sera from patients with halotane hepatitis recognize liver neoantigens that contains the trifluoroacetyl group derived from halotane // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1988.-Vol. 245. – P. 1103-1109.
21. Krahenbuhl O., Tschopp J. Perforin-induced pore formation // Immunol. Today. – 1991. – Vol. 12. – P. 399-402.
22. Kretz-Rommel A., Boelsterli U.A. Cytotoxic activity of T cells and non-T cells from diclofenac-immunized mice against cultured syngenic hepatocytes exposed to diclofenac //Hepatology.- 1995. -Vol. 22. – P. 213-222.
23. Lindros K.O., Penttila K.E. Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes // Biochem. J. – 1985.-Vol. 228.-P. 757-760.
24. Lindros K.O. Alcoholic liver disease: pathobiological aspects // J. Hepatol. – 1995.- Vol. 23. – P. 7-15.
25. Lindros K.O. Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver // Gen. Pharmac.-1997.-Vol. 28.-P. 191-196.
26. Losser M.-R., Payen D. Mechanisms of liver damage // Seminar in liver disease.-1996.-Vol. 16.- P.357-367.
27. Mirabelli F., Salis A., Vairetti M. et al. Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative Ca-dependent mechanisms // Arch. Biochem. Biophys. – 1989. – Vol. 270.- P – 478-488.
28. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells // FASEB J. – 1992. – Vol. 6. – P. 3051-3064.
29. Olynyk J.K., Matuschak G.M., Lechner A.J. et al. Differential production of TNF by Kupffer cells after phagocytosis of E. Coli and C. Albicans // Am. J. Physiol. 267 (Gastrointest. Liver Physiol. 30). – 1994. –

G213-G219.

30. Patel T., Gores G. Apoptosis and hepatobiliary disease // *Hepatology*. – 1995. – Vol. 21. – P. 1725-1741.
31. Petronilli V., Cola C., Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH and Ca // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 1011-1016.
32. Podack E.R., Hengartner H., Lichtenheld M.G. A central role of perforin in cytolysis? // *Annu. Rev. Immunol.* – 1991. – Vol. 9. – P. 129-157.
33. Rappaport A.M. Physioanatomical basis to toxic liver injury / in: *Toxic injury of the liver*, E. Farber, M. Fisher (eds). Marcel Dekker. 1979.-N.-Y.-P. 1-57.
34. Richter C., Kass G.E.N. Oxidative stress in mitochondria: Its relationship to cellular Ca homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation // *Chem.-Biol. Interact.* – 1991. – Vol. 77. – P. 1-23.
35. Rollins B.J. Hepatic veno-occlusive disease // *Am. J. Med.* – 1986.-Vol. 81. P. 297-306.
36. Rosser B.G., Gores G.J. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications // *Gastroenterology*.-1995.-Vol. 108. P. 252-275.
37. Steinberg P., Lafranconi W.M., Wolf C.R. et al. Xenobiotic metabolizing enzymes are not restricted to parenchymal cells in rat liver // *Mol. Pharmacol.* – 1987.- Vol. 32.- P. 463-470.
38. Thomas C.E., Reed D.J. Current status of calcium in hepatocellular injury // *Hepatology*. – 1989. – Vol. 10. – P. 375-384.
39. Thornton A.E., Strieter R.M., Lindley I. et al. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 144. – P. 2609-2613.
40. Tribble D.L., Aw T.K., Jones D.P. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury // *Hepatology*. – 1987. – Vol. 7. – P. 377-387.
41. Tschopp J., Nadholz M. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic lymphocytes // *Annu. Rev. Immunol.* – 1990. – Vol. 8. – P. 279-302.
42. Wang J.H., Redmond H.P., Watson R.W.G., Bouchier-Hayes D. Role of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α in induction of hepatocyte necrosis // *Am. J. Physiol.* 269 (Gastrointest. Liver. Physiol.).-1995. – G297-G304.
43. Witthaut R., Farhood A., Smith C.W., Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor- α contribute to MAC-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo // *J. Leukoc. Biol.* – 1994. – Vol. 55. – P. 105-111.