

УДК 612.35:577.127.2

© Е.О.Данченко

## ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ НА БИОСИНТЕЗ ДНК, АПОПТОЗ И НЕКРОЗ ГЕПАТОЦИТОВ *IN VITRO*

Е.О.ДАНЧЕНКО

Витебский государственный медицинский университет, 210602 Витебск, пр-кт  
Фрунзе, 27; тел: 00375-212372452, факс: 00375-212372107; E-mail:  
scidep@vitmed.belpak.vitebsk.by

Работа проводилась с использованием первичной культуры гепатоцитов. Показано, что гликохенодезоксихолевая кислота в зависимости от дозы индуцирует апоптоз или некроз гепатоцитов и ингибирует биосинтез ДНК. Препараты урсодезоксихолевой и тауроурсодезоксихолевой кислот не вызывают апоптоз или некроз гепатоцитов в диапазоне доз 25-400 мкг/мл. Но в присутствии ГХДХК оба препарата обладают антиапоптозогенным, а препарат ТУДХК и антинекрозогенным эффектом.

**Ключевые слова:** желчные кислоты, апоптоз, некроз, биосинтез ДНК

**ВВЕДЕНИЕ.** Внутриклеточная аккумуляция желчных кислот при холестатических заболеваниях печени играет главную роль в повреждении и гибели гепатоцитов [1], которая может происходить путем некроза или апоптоза [2,3,4]. Для лечения заболеваний гепатобилиарной системы успешно применяются препараты урсодезоксихолевой и тауроурсодезоксихолевой кислот (УДХК и ТУДХК) [5,6]. Показано, что ТУДХК является более перспективным препаратом для лечения холестатических заболеваний печени, поскольку обладает лучшими, по сравнению с УДХК, физико-химическими и метаболическими свойствами [7,8].

Целью данной работы было сравнение влияния УДХК и ТУДХК на процессы биосинтеза ДНК в гепатоцитах первичной культуры, а также на процессы некроза и апоптоза.

### МЕТОДИКА.

**Получение и культивирование гепатоцитов.** Для получения гепатоцитов использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200-250 г. Крысы содержались в стандартных условиях и получали стандартную лабораторную диету и воду *ad libidum*. Гепатоциты выделяли с помощью раствора коллагеназы (тип I, Seromed<sup>R</sup>, Biochrom KG, Berlin, Germany) согласно методике Zimmermann T. и соавт. [9].

Гепатоциты окрашивали трипановым голубым и в эксперименте использовали суспензии с количеством жизнеспособных гепатоцитов >85%. Получали суспензию клеток плотностью  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл в среде William E (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA), содержащей 10% фетальной сыворотки теленка, 26 ммоль  $\text{NaHCO}_3$  и 50 мкг/мл гентамицина. По 0,6 мл клеточной суспензии пассировали в покрытые коллагеном 12-луночные культуральные плашки и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$ . Через 2 часа после посева среду заменяли новой и добавляли препараты желчных кислот. Гликохенодезоксихолевая кислота (ГХДХК) производства фирмы Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA), УДХК и ТУДХК предоставлены фирмой Dr. Falk Pharma GmbH (Germany).

*Определение активности ЛДГ.* Изолированные гепатоциты инкубировали в покрытых коллагеном 12-луночных планшетах (плотность  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл) в присутствии препаратов желчных кислот (25-400 мкг/мл) в течение 4 ч. После инкубации в надосадочной жидкости определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью наборов фирмы Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). Активность общей ЛДГ оценивали после обработки монослоя гепатоцитов 0,1% раствором Triton X-100.

*Определение биосинтеза ДНК.* Через 2 часа культивирования после замены среды к клеткам добавляли 1мКи/лунка  $[6\text{-}^3\text{H}]$ тимидин (Amersham Buchler, Braunschweig, Germany). Через 12 часов инкубации нуклеотиды экстрагировали и определяли включение  $[6\text{-}^3\text{H}]$ тимидина в ДНК с помощью  $\beta$ -счетчика фирмы Beckman. Для определения количества ДНК клетки снимали с плашек инкубацией с раствором коллагеназы, лизировали буфером (0,1% додецилсульфата, 1мМ ЭДТА, 100 мМ Трис, pH 7,4) и определяли ДНК флуорометрически после окрашивания красителем Hoechst 33342, используя в качестве стандарта ДНК тимуса теленка.

*Определение апоптоза.* Биохимически исследовали фрагментацию ДНК методом электрофореза. Через 4 часа инкубации гепатоцитов ( $0,5 \times 10^6$  клеток/мл инкубационной среды) с препаратами клетки были промыты холодным фосфатным буфером, лизированы смесью 100 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 5 мМ/л ЭДТА и 0,2% додецилсульфата натрия и механически сняты с плашек. Затем к гепатоцитам добавляли протеиназу К (20 мг/мл) и смесь инкубировали в течение ночи при 56°C. ДНК экстрагировали дважды смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1), промывали 70% этанолом, высушивали, суспензировали в 10 мМ Трис-HCl и обрабатывали рибонуклеазой А (10 мг/мл) в течение 30 мин при 37°C. Электрофорез ДНК (5 мкг) осуществляли в 1,5% агарозном геле, окрашенном SYBR Green II, при 35 V в течение 4 ч. Наличие апоптоза оценивали по межнуклеосомной фрагментации ДНК.

Морфологически апоптоз оценивали микроскопическим выявлением конденсации хроматина или фрагментации ядра с использованием флюоресцентного микроскопа Olympus AX 70. Изолированные гепатоциты культивировали в покрытых коллагеном 35 мм пластиковых чашках с покровными стеклами ( $0,3 \times 10^6$  клеток/мл). В качестве контроля использовали среду культивирования. После инкубации среду удаляли, клетки промывали средой William E, покровные стекла с гепатоцитами окрашивали 15 мин красителем Hoechst 33342 (50 мкг/мл), промывали фосфатным буфером и фиксировали 20 мин в 5% растворе формальдегида. Подсчитывали 500 клеток и

количество апоптотических клеток выражали как процент от общего числа клеток. Для оценки некроза производили окраску гепатоцитов пропидиум йодидом. Количество некротических клеток подсчитывали, используя флюоресцентный микроскоп.

Каждый эксперимент выполнен 3-6 раз в параллельных пробах. Результаты обработаны с помощью электронной таблицы Microsoft Excel.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В качестве индуктора повреждения гепатоцитов использовали ГХДХК, которая в большей степени накапливается при холестазе и обуславливает повреждение гепатоцитов [10].

Через 4 часа инкубации гепатоцитов с ГХДХК в дозах 25-50 мкг/мл выявлены признаки незначительного цитолитического эффекта (рис. 1). При концентрациях 100-400 мкг/мл высвобождение ЛДГ в инкубационную среду увеличивалось с  $4,89 \pm 0,19\%$  (контроль) до  $45,7 \pm 0,19\%$  (400 мкг/мл) ( $p < 0,05$ ). УДХК и ТУДХК оказали аналогичный результат только при высокой концентрации.

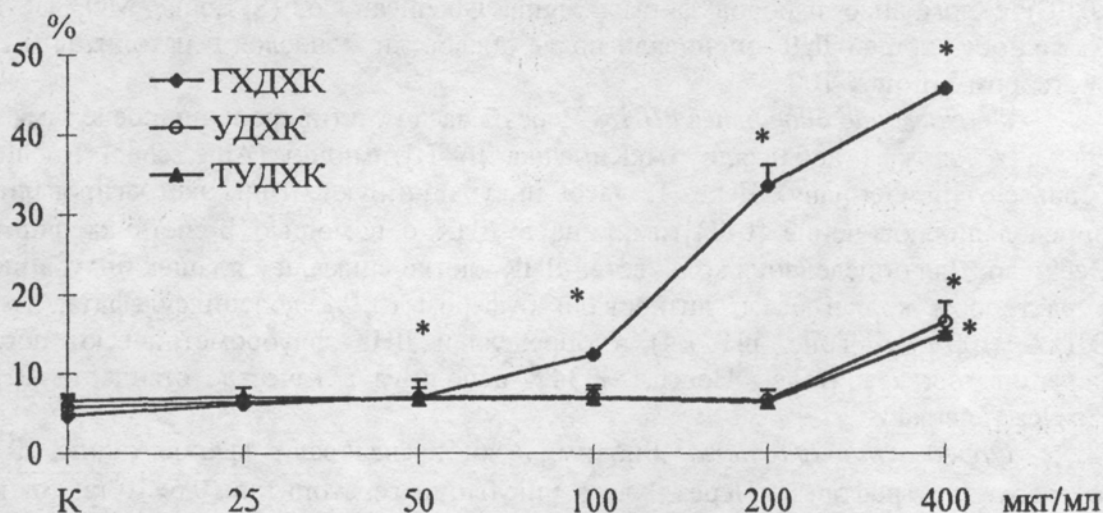


Рисунок 1.

Влияние ГХДХК, УДХК и ТУДХК на высвобождение ЛДГ в инкубационную среду культивируемыми гепатоцитами (% от общей ЛДГ). \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Для оценки протективного действия УДХК и ТУДХК на цитолиз гепатоцитов клетки инкубировали одновременно с ГХДХК и различными дозами препаратов. Использовалась доза ГХДХК 100 мкг/мл, поскольку при этой дозе препарата выявлено значительное увеличение высвобождения фермента из гепатоцитов.

Как следует из рис. 2, ТУДХК уменьшала цитолитический эффект ГХДХК и при концентрации 200 мкг/мл полностью предотвращала его. УДХК в дозах выше 50 мкг/мл потенцировала некрозогенный эффект ГХДХК.

При изучении биосинтеза ДНК выявлено, что ГХДХК (25-400 мкг/мл) уменьшала, а УДХК и ТУДХК не влияли на включение  $[6-^3\text{H}]$ тимидина в ДНК гепатоцитов (табл. 1). Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что ТУДХК обладала дозозависимым протективным эффектом и предотвращала



ингибирование включения предшественника в ДНК, вызванное ГХДХК. Позитивного эффекта УДХК на биосинтез ДНК не выявлено.

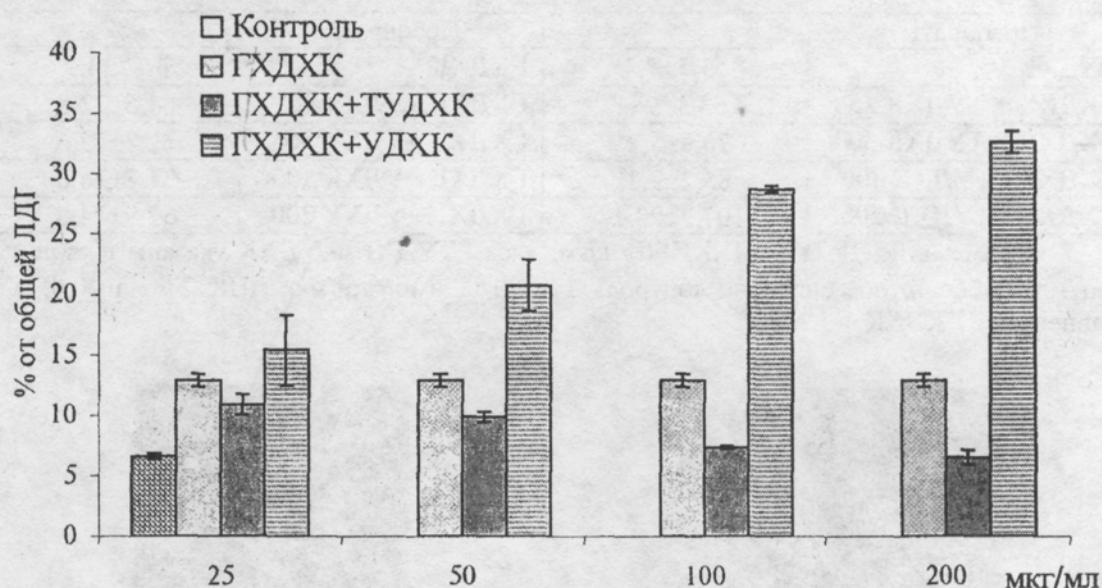


Рисунок 2.

Влияние УДХК и ТУДХК на высвобождение ЛДГ в инкубационную среду при совместной инкубации с ГХДХК (100 мкг/мл). Дозы УДХК и ТУДХК указаны на рисунке (ось X).

Таблица 1. Влияние ГХДХК, ТУДХК и УДХК на включение  $[6-^3\text{H}]$ тимидина в ДНК культивируемых гепатоцитов (% от контроля).

Дозы (мкг/мл)	ГХДХК	ТУДХК	УДХК
25	88,4±17,4	106,3±3,1	101±13,0
50	73,4±8,8	99,6±7,8 <sup>#</sup>	108,0±18,6 <sup>#</sup>
100	65,1±3,0	95,0±4,4 <sup>#</sup>	117,2±41,9 <sup>#</sup>
200	57,9±9,2	97,2±4,8 <sup>#</sup>	104,4±13,3 <sup>#</sup>
400	46,5±7,0	105,5±1,5 <sup>#</sup>	70,1±16,6 <sup>#</sup>

Примечание. Абсолютное значение контроля  $1455 \pm 129,3$  имп/мин/мкг ДНК  
<sup>#</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с ГХДХК соответствующей дозы

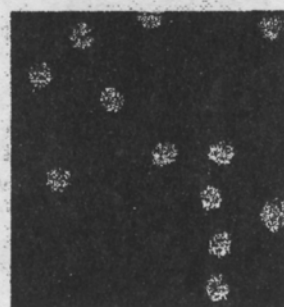
Как показано на рис. 3 и 4 и в табл. 3 препараты желчных кислот по-разному влияли на процесс апоптоза и некроза. Инкубация гепатоцитов с 50 мкг/мл ГХДХК индуцировала апоптоз, что подтверждается наличием типичной ДНК «лестницы», конденсацией хроматина и фрагментацией ядра. После инкубации с ГХДХК количество апоптотических клеток повышалось с  $0,67 \pm 0,8\%$  в контроле до  $15,2 \pm 3,49\%$  в экспериментальной группе. ТУДХК и УДХК не вызывали ни апоптоза, ни некроз гепатоцитов (рис. 3, табл. 3). Тем не менее, оба препарата оказывали антиапоптозогенный эффект: отсутствие ДНК «лестницы» и уменьшение числа апоптотических клеток. Если сравнить выраженность этого эффекта, то ТУДХК более значительно уменьшает число апоптотических клеток и обладает выраженным антинекрозогенным эффектом по сравнению с УДХК.



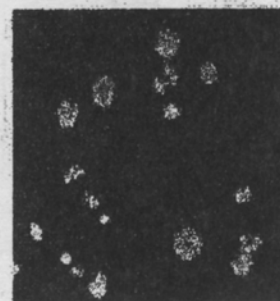
Таблица 2. Влияние ТУДХК и УДХК на включение  $[6-^3\text{H}]$ тимидина в ДНК культивируемых гепатоцитов (% от контроля).

Препараты	%	Препараты	%
ГХДХК	$51,5 \pm 7,4$	ГХДХК	$66,7 \pm 4,9$
ГХДХК + ТУДХК 25	$63,3 \pm 9,6$	ГХДХК + УДХК 25	$64,6 \pm 22,8$
ГХДХК + ТУДХК 50	$76,9 \pm 5,2^{\#}$	ГХДХК + УДХК 50	$62,2 \pm 23,6$
ГХДХК + ТУДХК 100	$85,2 \pm 9,2^{\#}$	ГХДХК + УДХК 100	$51,7 \pm 26,0$
ГХДХК + ТУДХК 200	$107,2 \pm 23,2^{\#}$	ГХДХК + УДХК 200	$52,9 \pm 24,6$

Примечание. Доза ГХДХК 100 мкг/мл, дозы ТУДХК и УДХК указаны в таблице (мкг/мл). Абсолютное значение контроля  $1797 \pm 162$  имп/мин/мкг ДНК.  $\#$  -  $p < 0,05$  по сравнению с ГХДХК.



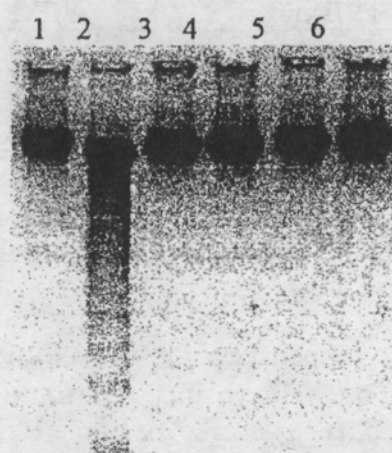
А



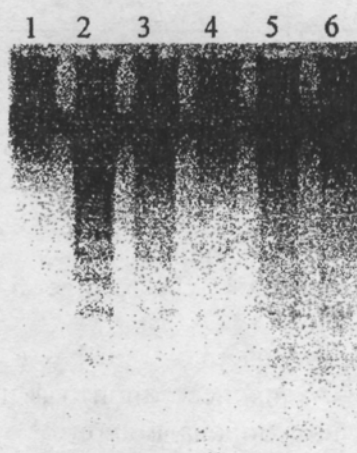
Б

Рисунок 3.

Влияние ГХДХК (50 мкг/мл) на конденсацию хроматина и фрагментацию ядер гепатоцитов. А – контроль, Б – ГХДХК.



А



Б

Рисунок 4.

А. Влияние ГХДХК, ТУДХК и УДХК на межнуклеосомную фрагментацию ДНК. 1 – контроль, 2 – ГХДХК 50 мкг/мл, 3 – ТУДХК – 50 мкг/мл, 4 – ТУДХК – 200 мкг/мл, 5 – УДХК – 50 мкг/мл, 6 – УДХК – 200 мкг/мл;

Б. Влияние ТУДХК и УДХК на межнуклеосомную фрагментацию ДНК при совместной инкубации с 50 мкг/мл ГХДХК. 1 – контроль, 2 – ГХДХК 50 мкг/мл, 3 – ГХДХК + ТУДХК 50 мкг/мл, 4 – ГХДХК + ТУДХК 200 мкг/мл, 5 – ГХДХК + УДХК 50 мкг/мл, 6 – ГХДХК + УДХК 200 мкг/мл.

Таблица 3. Влияние препаратов желчных кислот на апоптоз и некроз гепатоцитов

Препараты (мкг/мл)	% апоптоза	% некроза
Контроль	0,67±0,8	1,90±1,01
ГХДХК 50	15,2±3,49*	6,28±1,0*
ТУДХК 50	1,73±0,42 <sup>#</sup>	2,1±1,13 <sup>#</sup>
ТУДХК 200	1,87±0,50 <sup>#</sup>	2,77±0,67 <sup>#</sup>
УДХК 50	1,07±0,46 <sup>#</sup>	1,7±0,82 <sup>#</sup>
УДХК 200	1,80±0,72 <sup>#</sup>	2,63±0,67 <sup>#</sup>
ГХДХК 50+ТУДХК 50	4,17±1,35* <sup>#</sup>	2,9±0,79 <sup>#</sup>
ГХДХК 50+ТУДХК 200	2,33±1,67 <sup>#</sup>	1,67±0,70 <sup>#</sup>
ГХДХК 50+УДХК 50	7,2±0,35* <sup>#</sup>	7,0±0,2*
ГХДХК 50+УДХК 200	5,43±0,75* <sup>#</sup>	8,93±3,91*

Примечание. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, # -  $p < 0,05$  по сравнению с ГХДХК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидрофобная ГХДХК в исследуемом диапазоне доз ингибирует пролиферацию и вызывает их гибель. Поэтому можно предположить, что механизм повреждения гепатоцитов при холестазе будет обусловлен концентрацией желчных кислот в ткани печени: при низких концентрациях – активация апоптоза, при высоких дозах – индукция некроза гепатоцитов, что соответствует данным литературы [11]. Повреждения гепатоцитов могут быть связаны с прямым цитотоксическим действием желчных кислот на мембраны, обусловленным детергентными свойствами гидрофобных желчных кислот, а также могут являться результатом изменения концентрации свободных  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , снижения внутриклеточной концентрации АТФ, липидной пероксидации [2,11-14]. Механизм активации апоптоза под действием гидрофобных желчных кислот недостаточно изучен. Показано, что апоптоз гепатоцитов при действии желчных кислот может быть вызван активацией нелизосомальных сериновых протеиназ [15], митоген-активированной протеинкиназы [16], повышением внутриклеточной концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  [2], прямой активацией Fas рецептора в отсутствие Fas лиганда [17].

Гидрофильные желчные кислоты не вызывают апоптоз гепатоцитов и ингибируют апоптоз, вызванный этанолом, трансформирующим ростовым фактором  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Fas лигандами [18]. УДХК и ТУДХК не обладали цитотоксическим эффектом на культивируемые гепатоциты. Однако, ТУДХК по сравнению с УДХК оказала более выраженный протективный эффект, который проявлялся в антиапоптозогенном, антинекрозогенном действии и стимуляции включения  $[6\text{-}^3\text{H}]$ тимидина в ДНК. УДХК ингибировала апоптоз, но при высокой концентрации не уменьшала количество некрозов и увеличивала проницаемость мембран. Более выраженный благоприятный эффект ТУДХК при лечении заболеваний гепатобилиарной системы можно объяснить большей гидрофильностью конъюгатов желчных кислот, более значительным снижением доли гидрофобных желчных кислот в общем пуле [8] и уменьшением биотрансформации ее в гидрофобные метаболиты [19].

Автор благодарен профессору Р.Даргелю и сотрудникам института патобиохимии (г. Йена, Германия). Работа поддержана грантом WEI-002-97 (Deutsche Forschungsgemeinschaft für Luft- und Raumfahrt e.V.)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Greim H., Trülsch D, Czygan P. *et al.* (1972). *Gastroenterology*. **63**, 837-845.
2. Patel T., Bronk S.F., Gores G.J. (1994). *J. Clin. Invest.* **94**, 2183-2192.
3. Gerschenson L.E., Rotello R.J. (1992). *FASEB J.* **6**, 2450-2455.
4. Wyllie A.H., Kerr J.F.R. Currie A.R. (1980). *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
5. Leuschner U., Fischer H., Kurtz W *et al.* (1989). *Gastroenterology*. **97**, 1268-1274.
6. Beuers U., Spengler U., Kruis W. *et al.* (1992). *Hepatology*. **16**, 707-714.
7. Crosignani A., Budillon G., Cimino L. *et al.* (1998). *Hepatogastroenterology*. **45**, 1624-1629.
8. Rodrigues C.M., Kren B.T., Steer C.J. *et al.* (1995). *Gastroenterology*. **105**, 564-572.
9. Zimmerman T., Franke H., Peuker M., Dargel R. (1992). *J. Hepatol.* **15**, 10-16.
10. Greim H., Czygan P., Schaffner F. (1973). *Biochem. Med.*, **8**, 280-286.
11. Benz Ch., Angermüller S., Töx U. *et al.* (1998). *J. Hepatology*. **28**, 99-106.
12. Bomzon A., Ljubuncic P. (1995). *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 581-589.
13. Anwer M.S., Engelking L.R., Nolan K. *et al.* (1991). *Hepatology*. **8**, 887-891.
14. Spivey J., Bronk S., Gores G. (1993). *J. Clin. Invest.*, **92**, 17-24.
15. Kwo P., Patel T., Bronk S., Gores G. (1995). *Am. J. Physiol.*, **268**, G.613-662.
16. Webster C.R.L., Anwer M.S. (1998). *Hepatology*, **27**, 1324-1331
17. Faubion W.A., Guicciardi M.E., Migoshi H. *et al.* (1999). *J. Clin. Invest.*, **103**, 137-145.
18. Rodrigues C.M.P. (1998). Simp.update on bilirubin and bile acid metabolism related inborn errors and new therapies 15-18.
19. Invernizzi P., Setchell K.D., Crosignani A. (1999). *Hepatology*. **29**, 320-327.

Поступила 13.09.2000.

## EFFECTS OF BILE ACIDS ON THE DNA BIOSYNTHESIS, APOPTOSIS AND NECROSIS OF HEPATOCYTES *IN VITRO*

E.O.DANCHENKO

Vitebsk Medical University, 210602 Vitebsk, Frunze ave., 27; tel: 00375-212372452,  
fax: 00375-212372107; E-mail: scidep@vitmed.belpak.vitebsk.by

Using primary culture of hepatocytes it was shown that glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) in a dose dependent manner induces apoptosis or necrosis of the hepatocytes and inhibits DNA biosynthesis. Ursodeoxycholic acid (UDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) do not cause apoptosis or necrosis of the hepatocytes in a range of doses 25-400 µg/ml. But in the presence of GCDCA both preparations have an antiapoptogenic effect and TUDCA has also an antinecrotic effect.

**Key words:** bile acids, apoptosis, necrosis, DNA biosynthesis.