

Н.Г. Грушка, Г.М. Корнійчук, Н.В. Макогон, І.М.Алексєєва

Вплив тромбоксану B_2 на морфологічні прояви апоптотичної загибелі культивованих гепатоцитів щурів за умов дії гепатотропних речовин

Известно, что тромбоксаны (Тх) оказывают повреждающее действие на печень, но их влияние на клеточную смерть, в частности, на апоптоз и его морфологические проявления практически не изучено. Гибель гепатоцитов крыс в первичной культуре мы изучали методами прижизненной окраски ядерными красителями Хехст 33342 и пропидиум йодид, а также электронной микроскопии. Установлено, что экзогенный TxB_2 в норме увеличивает количество гепатоцитов с ранними стадиями апоптоза (конденсированный хроматин, уменьшение размеров ядер и клеток). Не выявлено достоверных изменений числа клеток с морфологическими признаками, которые характеризуют поздние стадии апоптоза (фрагментированные ядра и распад на апоптотические тельца). TxB_2 усиливал действие четыреххлористого углерода на апоптотическую гибель гепатоцитов и увеличивал конденсацию хроматина в них. При действии TxB_2 на гепатоциты, поврежденные хенодезоксихолевой кислотой, которая является индуктором апоптоза, значительно увеличивалось количество клеток с конечной стадией апоптоза – фрагментацией ядер и клеток.

ВСТУП

За останніми даними розрізняють декілька типів клітинної загибелі (апоптоз, апоптозоподібна загибель, некроз, некрозоподібна загибель, аутофагія, онкоз, піроптоз). Їх класифікація та механізми розвитку знаходяться в стадії детального вивчення і не є загальноприйнятими. Відомо, що морфологічні та біохімічні риси окремих типів клітинної смерті перекриваються. Два загальновизнані типи загибелі клітин – апоптоз і некроз – довгий час розглядалися як фундаментально різні процеси, але останнім часом встановлено, що риси апоптотичної та некротичної загибелі часто співіснують [3, 8, 12, 14]. У дослідженні ураження клітин, зокрема гепатоцитів, доцільно розрізняти морфологічні ознаки, що характеризують стадію апоп-

тотичної загибелі, а також прояви некрозу, що важливо для встановлення механізмів деструкції печінки при різних типах її ушкодження.

Відомо, що продукти метаболізму арахідонової кислоти за циклооксигеназним (простагландини – ПГ, тромбоксани – Тх) і ліпоксигеназним шляхом (лейкотриєни) суттєво впливають на життєдіяльність і загибель клітин, зокрема гепатоцитів, у нормі та при їх ураженні [2, 10, 16, 17], однак шлях клітинної загибелі і її морфологічні особливості не охарактеризовані.

Метою нашої роботи було вивчити вплив TxB_2 на морфологічні особливості апоптотичної загибелі культивованих гепатоцитів щурів у нормі та за умов дії чотирихлористого вуглецю (CCl_4) і хенодезоксихолевої кислоти (ХДХК).

© Н.Г. Грушка, Г.М. Корнійчук, Н.В. Макогон, І.М.Алексєєва

МЕТОДИКА

В експериментах використана первинна культура гепатоцитів щурів лінії Вістар масою 170–200 г. При роботі з тваринами дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Гепатоцити виділяли за допомогою перфузії печінки розчином колагенази та диференційного центрифугування за методом Сеглена [13] з подальшим очищенням за допомогою центрифугування в дискретному градієнті густини Percoll (“Sigma”, США) у концентраціях 73–57–30 %. Кількість живих гепатоцитів становила перед посадкою $84,6 \% \pm 5,6 \%$. Культивування гепатоцитів проводили в 24-лункових планшетах для культур клітин на покритому колагеном склі в кількості $1,5 \cdot 10^5$ клітин на лунку в 0,6 мл культурального середовища (RPMI 1640, забуференого 15 ммоль/л HEPES, з додаванням 10%-ї ембріональної телячої сироватки, 10^{-7} моль/л інсуліну та антибіотиків). Після 18-годинного культивування моношар гепатоцитів відмивали, вносили культуральне середовище (RPMI 1640 без сироватки й інсуліну) та здійснювали протягом 4 год відповідні впливи: CCl_4 – 10 ммоль/л та ХДХК – 100 мкмоль/л. Екзогенний TxB_2 у кінцевій концентрації 1, 0,1, 0,01 і 0,001 мкмоль/л вносили в культури двічі з інтервалом в 1 год, а вплив CCl_4 і ХДХК здійснювали через 30 хв після першого внесення. Контролем були культури, оброблені етанолом у концентрації, що дорівнювала такій у відповідному розчині TxB_2 .

Прижиттєве подвійне забарвлення проводили флуоресцентними ядерними барвниками Хехст 33342 і пропідіум йодидом у кінцевій концентрації 10 мкмоль/л [15], у забуференому фосфатами фізіологічному розчині (ЗФР) протягом 10 хв у темряві. Після ретельного відмивання ЗФР клітини фіксували 5%-м формаліном у ЗФР впродовж 3 хв. Морфологічні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-2 з водно-імерсійним об’єк-

тивом х70 та окуляром х5. Морфологічний метод вважають “золотим стандартом” вивчення апоптозу, оскільки не завжди виявляються його біохімічні показники, або вони спостерігаються і при некротичній загибелі. Метод подвійного забарвлення дає можливість диференціювати живі, апоптотичні та некротичні клітини. Пропідіуму йодид проникає тільки у клітини з ушкодженими мембранами (некроз) і забарвлює їх ядра в оранжевий колір. Барвник Хехст 33342 проникає і через неушкоджені мембрани та забарвлює ядра живих клітин в зелено-синій колір. Зв’язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні риси ядерного матеріалу, притаманні апоптозу: периферичне розташування хроматину, його конденсацію, фрагментацію ядер, а також розпад гепатоцитів на апоптотичні тільця. Визначали відсоток живих, апоптотичних і некротичних гепатоцитів при підрахунку не менш як 400 клітин. У разі неоднорідної популяції, як при ушкодженні CCl_4 , підраховували в кожній культурі 800–1200 клітин на межі зони ушкодження.

При електронно-мікроскопічних дослідженнях клітини культивували в оброблених колагеном 8-лункових планшетах з відривним дном (“Sigma”, США) у кількості $1 \cdot 10^5$ клітин на лунку в 0,3 мл культурального середовища. Через 4 год після впливу (TxB_2 у кінцевій концентрації 0,01 і 0,1 мкмоль/л) клітини тричі відмивали ЗФР і проводили фіксацію та заключення в епоксидні смоли за загальноприйнятою методикою. Ультратонкі зрізи (40–50 нм) контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю за Рейнольдсом і вивчали на електронному мікроскопі JEM 100-CX (“Jeol”, Японія).

Статистичну обробку проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що TxB_2 у кінцевій концентрації 1, 0,1, 0,01 і 0,001 мкмоль/л збільшує загальну кількість клітин з морфологічними

рисами апоптозу: через 4 год культивування в 1,5 ($P<0,05$), 1,6 ($P<0,01$), 2,7 ($P<0,01$) і 2,8 ($P<0,001$) рази (табл. 1), через 8 год в 1,6 ($P<0,05$), 1,9 ($P<0,001$), 2,2 ($P<0,01$) і в 2,5 ($P<0,001$) рази, через 24 год в 1,7 ($P<0,01$), 1,8 ($P<0,01$), 2,5 ($P<0,001$) і 2,0 ($P<0,001$) рази відповідно.

За результатами морфологічних особливостей загибелі гепатоцитів при люмінесцентному дослідженні було виділено п'ять типів клітин, які знаходилися на різних стадіях апоптозу: тип 1 – гепатоцити з конденсованим ядерним хроматином і незначним зменшенням розмірів, що відповідає раннім морфологічним ознакам апоптозу. Плазматична мембрана була або інтактною або значно рідше ушкодженою (вторинний некроз на фоні ранньої стадії апоптозу); тип 2 – суттєво зменшені в розмірах клітини з сильно конденсованими ядрами і, переважно, з ушкодженою мембраною (клітини, в яких апоптоз був перерваний на стадії конденсації ядер); тип 3 – гепатоцити з фрагментованим хроматином або фрагментованими ядрами, зменшені в розмірах, з ущільненою цитоплазмою та неушкодженою плазматичною мембраною,

що відповідає вираженому апоптозу на його завершальній стадії; тип 4 – гепатоцити з вираженими ознаками апоптозу, як і тип 3, однак з ушкодженою плазматичною мембраною (ці клітини мають, таким чином, ознаки вторинного некрозу, що відбувся на фоні розвинутого апоптотичного процесу); тип 5 – гепатоцити, що розпались на апоптотичні тільця, які містять залишки ядерного матеріалу.

Встановлено (див. табл. 1), що TxB_2 при додаванні в культуру інтактних гепатоцитів у кінцевій концентрації 0,1, 0,01 і 0,001 мкмоль/л через 4 год після внесення в культуральне середовище суттєво збільшував кількість гепатоцитів з конденсованим хроматином (тип 1). Подібні результати було отримано при дії TxB_2 протягом 8 та 24 год (результати не наведені). Спостерігалось збільшення кількості апоптотичних тілець через 4 год при впливі 0,1 мкмоль/л TxB_2 і тенденція до збільшення значення цього показника при дії інших концентрацій та в інші строки. Не виявлено значних змін кількості клітин з морфологічними ознаками, що характеризують пізні стадії апоптозу (тип 3) або постапоптотичного некрозу (тип 2, 4). Ці

Таблиця 1. Кількість (у % до загальної кількості клітин) культивованих гепатоцитів щурів з різними морфологічними рисами апоптозу за умов дії на них екзогенного тромбосану B_2 (TxB_2) у концентрації від 1 до 0,001 мкмоль/л і відповідних концентрацій розчинника етанолу (контроль) протягом 4 год ($M\pm m$; $n=9$)

Схема досліджу	Загальна кількість апоптотичних клітин	Конденсованих хроматин (тип 1)	Конденсовані ядра (тип 2)	Фрагментовані ядра, ціла мембрана (тип 3)	Фрагментовані ядра, ушкоджена мембрана (тип 4)	Розпад на апоптотичні тільця (тип 5)
Контроль до TxB_2						
1 мкмоль/л	5,12±0,59	4,57±0,61	0,19±0,07	0,31±0,13	0	0,05±0,03
TxB_2 1 мкмоль/л	7,94±1,14*	6,81±1,05	0,53±0,16	0,37±0,16	0,05±0,03	0,18±0,08
Контроль до TxB_2						
0,1 мкмоль/л	4,95±0,49	4,35±0,53	0,22±0,07	0,29±0,13	0	0,09±0,04
TxB_2 0,1 мкмоль/л	7,91±0,66*	6,81±0,66*	0,45±0,16	0,29±0,10	0,04±0,03	0,32±0,11*
Контроль до TxB_2						
0,01 мкмоль/л,	2,82±0,44	2,30±0,41	0,18±0,06	0,11±0,07	0,02±0,02	0,21±0,07
0,001 мкмоль/л						
TxB_2 0,01 мкмоль/л	7,90±1,37**	7,18±1,46**	0,42±0,13	0,11±0,06	0,03±0,02	0,16±0,07
TxB_2 0,001 мкмоль/л	7,96±0,85**	7,00±0,91**	0,54±0,16	0,20±0,06	0	0,22±0,10

* $P<0,05$, ** $P<0,01$ відносно до відповідного контролю.

результати підтверджуються електронно-мікроскопічними дослідженнями. У культурах гепатоцитів, оброблених TxV_2 у кінцевій концентрації 0,1 і 0,01 мкмоль/л протягом 4 год значно підвищувалася кількість гепатоцитів зі зміненими ядрами, що проявлялося в зменшенні їхніх розмірів, значній конденсації хроматину з крайовим його розташуванням (див. рис. 1,б,в,г). Конденсований хроматин мав гомогенний вигляд, часто в його масі спостерігалися невеликі везикули (див. рис. 1,в,г). Ядерна мембрана втрачала свою чітку двошарову структуру, однак конденсований хроматин лишався в межах ділянки ядра як компактне утворення. Ядерця ущільнювалися та зливалися з конденсованим хроматином. Цитоплазма таких клітин ущільнена, осміофільна, що

свідчить про втрату води (див. рис. 1,в,г; 2). Цитоплазматичні органели таких клітин (мітохондрії, плазматичний ретикулум і комплекс Гольджі) переважно не зазнавали змін (див. рис. 1,б,в; 2). Спостерігалось утворення вип'ячувань цитоплазми, рідко – відщеплення частин цитоплазми й утворення апоптотичних тілець (див. рис. 2). Таким чином, морфологічні зміни, спричинені TxV_2 , відбувалися переважно в ядрі, а також у цитоплазмі, але не в її органелах і свідчили про підсилення ранніх стадій апоптозу. Слід відмітити, що в широкому спектрі морфологічних змін за умов захворювань печінки є такі, що збігаються з відміченими нами: каріопікноз, фрагментація ядер, конденсація хроматину, його крайове розташування. Морфологічна

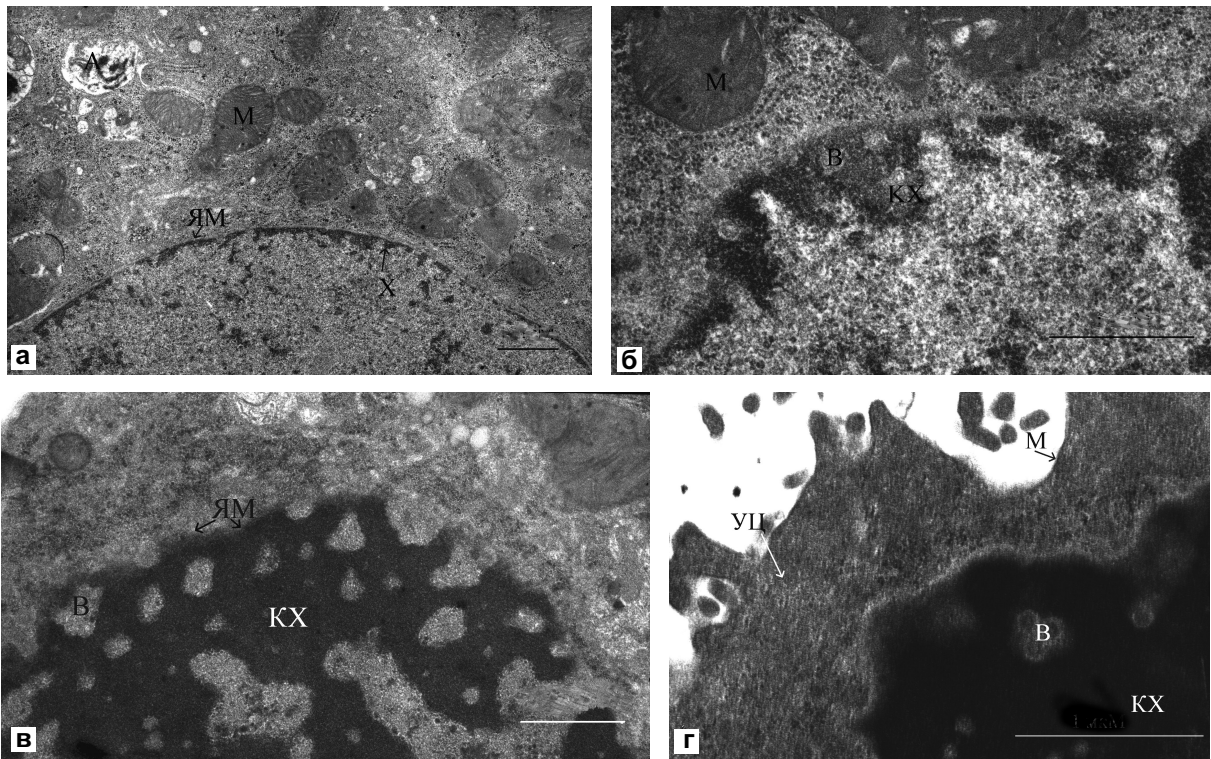


Рис. 1. Ультраструктура інтактних культивованих гепатоцитів (а) і за умов дії екзогенного тромбосану V_2 (TxV_2 ; 0,1 мкмоль/л) протягом 4 год (б, в, г); а – інтактні гепатоцити: А – аутофагосоми, М – мітохондрії, ЯМ – ядерна мембрана, Х – хроматин; б – початкова стадія конденсації хроматину (М – мітохондрії, В – везикули в масі хроматину, КХ – конденсований хроматин); в, г – виражені стадії конденсації хроматину (ЯМ – ядерна мембрана, КХ – конденсований хроматин, В – везикули в масі хроматину, УЦ – ущільнена цитоплазма, М – плазматична мембрана). Маштабна лінія на а, б, в, г – 1 мкм

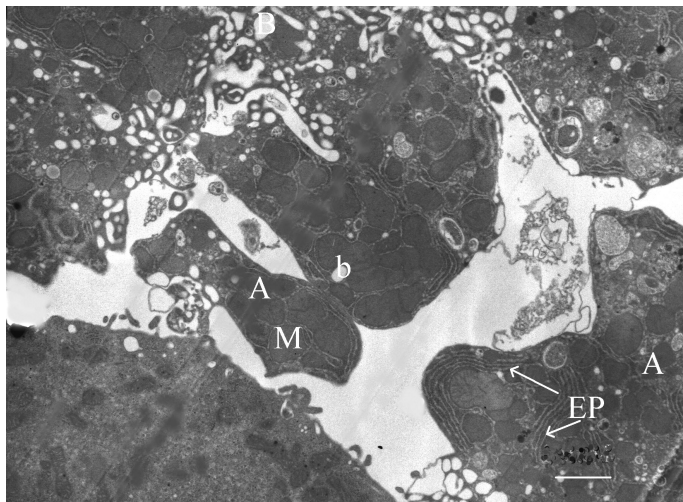


Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитів при дії екзогенного тромбоксану B₂ (TxB₂; 0,1 мкмоль/л) протягом 4 год. Утворення вип'ячувань цитоплазми (blebs) та апоптотичних тілець. А – апоптотичні тільця, b – blebs, EP – щільний ендоплазматичний ретикулум, М – мітохондрії, В – вакуолі. Масштабна лінія – 1 мкм

форма ядер – “пісочні ядра гепатоцитів” є характерною для деяких видів патології печінки, особливо хронічного вірусного гепатиту [1]. Це ядра з периферичним розташуванням конденсованого ядерного хроматину, що з основною морфологічною формою апоптозу гепатоцитів за умов дії TxB₂. Як і в наших дослідках, при захворюваннях печінки апоптоз часто супроводжується процесами вторинного некрозу.

Вивчення впливу TxB₂ на ушкоджені гепатоцити здійснювали на двох моделях: 1) при токсичному ураженні гепатоцитів CCl₄; 2) при індукції апоптозу культивованих клітин гідрофобною жовчною кислотою

ХДХК, що моделює ураження печінки за умов холестазу. З наших попередніх досліджень [4] відомо, що CCl₄ зменшував кількість неушкоджених клітин внаслідок посилення як некрозу, так і апоптозу. TxB₂ дещо зменшував число як живих, так і некротичних гепатоцитів, уражених CCl₄, і підвищував їх апоптоз в 1,21 та в 1,27 раза при концентрації 1 та 0,1 мкмоль/л відповідно (P<0,05 порівняно з дією самого CCl₄). У цьому дослідженні показано, що TxB₂ підвищував кількість апоптотичних клітин на стадії конденсації хроматину – тип 1 (табл. 2). Число апоптотичних клітин з іншими морфологічними ознаками прак-

Таблиця 2. Кількість культивованих гепатоцитів щурів з різними морфологічними рисами апоптозу при дії на них екзогенного тромбоксану B₂ (TxB₂; 0,1 мкмоль/л) за умов ушкодження CCl₄ (10 мкмоль/л) і хенодзоксихолевою кислотою (ХДХК; 100 мкмоль/л) протягом 4 год

Схема досліджу	Загальна кількість апоптотичних клітин	Конденсований хроматин (тип 1)	Конденсовані ядра (тип 2)	Фрагментовані ядра, ціла мембрана (тип 3)	Фрагментовані ядра, ушкоджена мембрана (тип 4)	Розпад на апоптотичні тільця (тип 5)
CCl ₄	37,95	17,06	1,57	12,03	5,59	1,70
CCl ₄ і TxB ₂	45,71*	25,83*	1,47	8,86	7,51	2,04
ХДХК	36,33	1,42	0,74	31,56	0,80	1,81
ХДХК і TxB ₂	46,20**	0,74	0,61	42,22**	0,97	1,66

* P<0,05 відносно дії CCl₄; ** P<0,05 відносно дії ХДХК.

тично не змінювалося. Ці результати свідчать, що TxB_2 посилює апоптотичні процеси в токсично ушкоджених гепатоцитах на ранніх стадіях.

При ушкодженні гепатоцитів ХДХК, зменшувалася кількість інтактних гепатоцитів, однак на відміну від дії CCl_4 , переважно через індукцію апоптозу [4]. За умов дії ХДХК TxB_2 зменшував число живих клітин ($P < 0,01$ в порівнянні з дією самої ХДХК), вірогідно не впливав на некроз, але значною мірою підвищував апоптоз з 36,33 (ХДХК) до 46,20 % (ХДХК+ TxB_2), ($P < 0,05$). У табл. 2 наведено результати, які показують, що TxB_2 , застосований на фоні ураження гепатоцитів ХДХК, збільшував кількість клітин з фрагментованими ядрами і цілою мембраною (тип 3), тобто підсилював завершення апоптотичних процесів без розвитку вторинного постапоптотичного некрозу.

Таким чином, існують суттєві відмінності в дії TxB_2 на загибель гепатоцитів, викликану різними за механізмами дії чинниками. CCl_4 , хоча і призводив до запуску апоптозу гепатоцитів, але викликав досить сильне ушкодження, при якому частина клітин, в котрих починались апоптотичні процеси, не мали ресурсів завершити апоптоз і гинули з ознаками вторинного некрозу. Оксидативний стрес – один з основних чинників токсичної дії CCl_4 – запускає апоптоз через мітохондріальні механізми і призводить до зменшення енергозабезпечення клітини [6]. В умовах дії CCl_4 TxB_2 збільшував кількість клітин, які стали на більш фізіологічний – апоптотичний шлях загибелі. При дії ХДХК, яка сама була індуктором апоптозу, TxB_2 сприяв завершенню апоптотичних процесів. Можна вважати, що TxB_2 , який швидко утворюється при гідроксилуванні TxA_2 , що виділяється в печінці як ушкодженими гепатоцитами, так і іншими клітинами (особливо клітинами Купфера) і крові [9, 16], має суттєвий вплив на загибель гепатоцитів. Існують окремі розрізнені дані щодо впливу Tx на життєздатність клітин: при дії TxA_2

показаний прямий запуск загибелі ретиноваскулярних ендотеліальних клітин, переважно через некроз, меншою мірою – апоптоз [5]. З іншого боку, TxA_2 може стимулювати ріст деяких пухлин або проявляти цитотоксичність відносно інших [11], тобто вплив цього ейкозаноїду на клітини залежить від їх типу та стадії розвитку. Даних про безпосередній вплив Tx на апоптоз гепатоцитів мало, однак встановлено, що при дії на ізольовані гепатоцити TxB_2 спричиняє утворення вип'ячувань плазматичної мембрани (blebs), характерних для апоптозу, через активацію нелізосомальних протеїназ, які атакують деякі білки цитоскелета [7]. Згідно з нашими результатами сам по собі TxB_2 викликає виражені початкові апоптотичні зміни гепатоцитів, однак його вплив недостатній, щоб спричинити завершений апоптоз з фрагментацією ядер і розпадом на апоптотичні тільця. Таким чином, TxB_2 сприяє видаленню старих або уражених клітин печінки більш фізіологічним шляхом – апоптозом, який не призводить до розвитку запального процесу. Однак за умов сильних ушкоджувальних впливів (наприклад, CCl_4 або гідрофобними жовчними кислотами) TxB_2 може поглиблювати ураження цього органа, надмірно підвищуючи апоптотичну загибель клітин.

ВИСНОВКИ

1. Екзогенний TxB_2 при дії на інтактні гепатоци щурів у культурі підвищував кількість апоптотичних клітин з початковою стадією загибелі – конденсацією хроматину.

2. За умов ураження чотирехлористим вуглецем, який поряд з некрозом запускає процеси апоптозу, TxB_2 посилював початкові апоптотичні перетворення, але не призводив до збільшення числа клітин з кінцевими стадіями апоптозу.

3. TxB_2 , застосований на фоні індуктора апоптозу ХДХК, сприяв завершенню апоптотичних процесів у гепатоцитах.

N.G. Grushka, G.M. Korniychuk, N.V. Makogon, I.M. Alexeyeva

MORPHOLOGICAL FEATURES OF APOPTOSIS IN NORMAL AND INJURED CULTURED RAT HEPATOCYTES UNDER THROMBOXANE B₂ TREATMENT

Thromboxanes (TX) are known to have damaging effect on a liver but their influence on the cell death, in particular on hepatocyte apoptosis and its morphological features is not investigated enough. Cell death of the rat hepatocytes was investigated in primary culture by double vital staining with fluorescent nuclear stains Hoechst 33342 and propidium iodide and by electron microscopy. It was established that exogenous Tx B₂ increases the amount of hepatocytes with early stages of apoptosis - the condensed chromatin and nucleus and cell size reduction. The changes in a percentage of hepatocytes with morphological features of the late stages of apoptosis - fragmented nuclei and division on apoptotic bodies were not revealed. Tx B₂ intensified the carbon tetrachloride action on hepatocyte apoptotic death and increased chromatin condensation. Tx B₂ application to hepatocytes injured by chenodeoxycholic acid significantly increased the amount of cells with a final stage of apoptosis.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабак О.Я. Хронические гепатиты. – К.: Блиц-Информ, 1999. – 208 с.
2. Буко В.У. Простагландины при алкогольном поражении печени. – Минск: Наука і техніка, 1991. – 152 с.
3. Фильченков А.А. Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии. – К.: ДИА, 2003. – 76 с.
4. Хабатюк Н.Г., Макогон Н.В., Корнійчук Г.М., Алексеева І.М. Участь циклооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти в модуляції апоптозу культивованих гепатоцитів щурів: 36. наук. праць співробітників КМАПО ім. Н.А. Шупика, – К., 2004. – С.236–240.
5. Beauchamp M.H., Martinez-Bermudez A.K., Gobeil

- F.J et al. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy // J. Appl. Physiol. – 2001. – **90**, №6. – P.2279–2288.
6. Cai Y., Gong L., Qi X. et al. Apoptosis initiated by carbon tetrachloride in mitochondria of rat primary cultured hepatocytes // Acta Pharmacologica Sinica. – 2005. – **26**, №8. – P.969–975.
7. Horton A.A., Wood J.M. Prevention of thromboxane B₂-induced hepatocyte plasma membrane bleb formation by certain prostaglandins and a proteinase inhibitor // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – **1022**, № 3. – P.319–324.
8. Lemasters J. Mechanisms of hepatic toxicity. V. Necroapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis // Amer. J. Physiol. – 1999. – **276**, №1. – P.G1–G6.
9. Marinovich M., Flaminio L., Papagni M., Galli C. Stimulation of arachidonic acid metabolism by CCl₄ in isolated rat hepatocytes // Prostaglandins. – 1989. – **37**, № 1. – P.23–30.
10. Nanji A.A., Khettry U., Sadrzadeh S.M., Yamanaka T. Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandin E₂ leukotriene B₂, and thromboxane B₂ // Amer. J. Pathology. – 1993. – **142**, №2. – P.367–373.
11. Okada M., Sagawa T., Tominaga A. et al. Two mechanisms for platelet-mediated killing of tumour cells: one cyclo-oxygenase dependent and the other nitric oxide dependent // Immunology. – 1996. – **89**, № 1. – P.158–164.
12. Pieper A., Verma A., Zhang J., Snyder S. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death// TiPS. – 1999. – **20**. – P.171–181.
13. Seglen P. Preparation of rat liver cells // Methods Cell Biol. – 1976. – **13**. – P.29–83.
14. Shi J., Aisaki K., Ikawa Y., Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis after the administration of carbon tetrachloride // Amer. J. Pathol. – 1998. – **153**, №2. – P.515–525.
15. Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W. et al. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes// Amer. J. Physiol. – 1996. – **271**, № 6. – P. 949–958.
16. Tolman K. G. Eicosanoids and the liver // Prostaglandins and other Lipid Mediators. – 2000. – **61**. – P.163–174.
17. Totsuka E., Sasaki M., Takahashi K. et al. The effects of intraportal prostaglandin E₁ administration on hepatic ischemia and reperfusion injury in dogs // Surgery Today. – 1995. – **25**, №5. – P.421–428.

Матеріал надійшов до редакції 22.03.2006

In-t фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України, Київ