

Н.О. Розмаріца, Н.В. Макогон, І.І. Геращенко, І.М. Алексєєва

Вплив високодисперсного кремнезему на гепатоцити щурів у культурі

Высокодисперсный кремнезем (ВДК), который является действующим веществом лечебного препарата силикса, обладает способностью сорбировать белок и применяется для выведения вредных веществ белкового происхождения. Для установления новых возможностей применения силикса было изучено влияние ВДК на жизнеспособность культивируемых клеток организма. Исследовали действие 0,0001, 0,001 и 0,01%-й концентрации ВДК на первичную культуру гепатоцитов крыс в течение 4 и 24 ч. Количество живых, апоптотических и некротических клеток определяли по морфологическим признакам после двойного прижизненного окрашивания флуоресцентными ядерными красителями (Хехст 33342 и йодид пропидиума). Количество клеток, в которых развились процессы аутофагии, оценивали с помощью флуоресцентного маркера аутофаголизосом монодансилкадаверина. Установлено, что ВДК обладает выраженным дозозависимым действием на клеточную гибель: через 4 ч и, в большей мере, через 24 ч увеличивалось количество клеток с морфологическими признаками апоптоза. Наименьшая из исследованных концентраций ВДК существенно не влияла на количество живых клеток и даже способствовала уменьшению вторичного постапоптотического некроза. Наибольшая концентрация ВДК приводила к резкому угнетению жизнеспособности гепатоцитов, что проявлялось в увеличении количества погибших клеток с признаками как некроза, так и, в меньшей степени, апоптоза на фоне снижения количества клеток с признаками аутофагии.

ВСТУП

Нині досить поширені методи лікування, що базуються на вилученні з організму отруйних та баластних речовин за допомогою сорбентів. В Інституті хімії поверхні НАН України разом із співробітниками Вінницького медуніверситету ім. М.І. Пирогова розроблено та впроваджено в медичну практику новий ентеросорбент силікс, що являє собою синтетичний аморфний високодисперсний кремнезем (ВДК) [3]. З хімічної точки зору ВДК – це об'ємний полімер, структурною ланкою якого є кремнекисневі тетраедри, з'єднані дисилоксановими містками Si–O–Si. Під час синтезу ВДК утворюється у вигляді непористих, майже сферичних частинок розміром 5–20 нм, які потім об'єднуються у агрегати розміром 100–

200 нм. На поверхні частинок ВДК є багато груп О–Н (щільний гідроксильний покрив), що зумовлює високу гідрофільність і властивість зв'язувати полярні, у тому числі заряджені, молекули, а також молекули, здатні утворювати водневі зв'язки [7]. Головною особливістю ВДК, яка впливає з його фізико-хімічних властивостей, є висока білоксорбуюча здатність. На цьому базується його використання для виведення з організму екзо- й ендотоксинів, патогенних імунних комплексів, продуктів деградації некротичних тканин та інших шкідливих речовин білкового походження, а також мікроорганізмів [3, 4].

Для подальшого з'ясування механізмів дії ВДК, а також встановлення нових можливостей застосування силіксу, важливим є дослідження його впливу на клітини

© Н.О. Розмаріца, Н.В. Макогон, І.І. Геращенко, І.М. Алексєєва

організму при безпосередньому контакті. Відомі дані про взаємодію ВДК з мембранами еритроцитів, що призводить до їх лізису [2,4]. Водночас показано, що одноклітинні водорості при наявності ВДК не просто нормально функціонують, а й починають швидше ділитися [8]. Встановлено, що ВДК має активуючий вплив на фагоцитуючі клітини [1]. Ще один напрямок, який викликає зацікавленість у вивченні мембранотропних ефектів ВДК, – його використання для консервації клітин, наприклад сперматозоїдів [6] і гепатоцитів [11].

З огляду на зазначені факти постає питання поглибленого вивчення мембранотропних властивостей ВДК і його впливу на життєздатність і загибель клітин. За останніми даними розрізняють декілька типів клітинної загибелі (апоптоз, програмова клітинна смерть, апоптозоподібна загибель, некроз, некрозоподібна загибель, аутофагія, онкоз, піроптоз). Їх класифікація та механізми знаходяться в стадії детального вивчення [9, 14]. При дослідженні дії ВДК важливо встановити, як він впливає на кількість живих клітин, а також на їх апоптотичну (чи апоптозоподібну) і некротичну (чи онкотичну) загибель. Останнє важливо, оскільки при некрозі із клітин виходять білки цитоплазми та лізосомальні ферменти, які можуть спричинити подальший розвиток аутоімунних процесів, ушкодження клітин і запалення, при апоптозі цей механізм відсутній.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив різних концентрацій ВДК на гепатоцити щурів у культурі та шляхи їх загибелі.

МЕТОДИКА

В експериментах використано первинну культуру гепатоцитів статевозрілих самців щурів лінії Вістар з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Клітини виділяли за допомогою перфузії печінки

розчином колагенази та подальшого диференційного центрифугування [12]. Гепатоцити додатково очищали від інших клітин печінки та мертвих гепатоцитів за допомогою центрифугування в дискретному градієнті густини Percoll (“Sigma”, США) в концентраціях 73, 57, 30 %. Кількість живих гепатоцитів, яку оцінювали методом виключення барвника трипанового синього, становила перед внесенням в культуральні планшети $85,6\% \pm 3,1\%$. Культивування проводили в 24-лункових планшетах для культур клітин на покритому колагеном склі. Гепатоцити інокулювали в кількості $1,5 \cdot 10^5$ клітин на лунку в 0,6 мл середовища культивування (RPMI – 1640, забуференого 15 ммоль/л HEPES, з додаванням 5 % ембріональної телячої сироватки, 10^{-7} моль/л інсуліну та антибіотиків). Після 18 годинного культивування моношар гепатоцитів відмивали, вносили середовище інкубації (RPMI – 1640 без сироватки та інсуліну) і протягом 4 та 24 год інкубували з ВДК в 0,0001, 0,001 та 0,01%-й кінцевій його концентрації. ВДК вносили у вигляді спеціально виготовленої седиментаційно стійкої суспензії.

Морфологічну оцінку загибелі клітин проводили за допомогою прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними ядерними барвниками (Хехст 33342 та йодид пропідіуму) [13]. Забарвлення проводили в забуференому фосфатами фізіологічному розчині з барвниками в кінцевій концентрації 10 мкмоль/л протягом 10 хв у темряві. Після відмивання буфером від решти барвника клітини фіксували 5%-м формаліном у забуференому фосфатами фізіологічному розчині протягом 3 хв. Після відмивання водою клітини висушували. Морфологічні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-2 з водно-імерсійним об’єктивом х70 та окуляром х5. Визначали відсоток живих, апоптотичних і некротичних гепатоцитів при підрахунку не менше як 400 клітин, а

також кількість клітин з вторинним постапоптотичним некрозом. Результати виражали у відсотках до кількості апоптотичних клітин. Оцінку активності процесів аутофагії в умовах дії різних концентрацій ВДК проводили за допомогою флуоресцентного барвника монодансилкадаверіну (МДК) у кінцевій концентрації 0,05 ммоль/л протягом 10 хв у темряві. Після відмивання холодним забуференим фосфатами фізіологічним розчином здійснювали прижиттєву оцінку процесів аутофагії, підраховуючи кількість клітин з вираженою гранулярною флуоресценцією [10]. Статистичну обробку проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При оцінці шляхів клітинної загибелі за морфологічні ознаки апоптозу вважали зміни ядер і ядерного матеріалу – периферичне розташування хроматину, його конденсацію, фрагментацію ядер, а також розпад гепатоцитів на апоптотичні тільця. Характерною та принциповою рисою некрозу є порушення цілісності плазматичної мембрани із набряканням цитоплазми, ядер і мітохондрій (ядра при цьому не мають ознак конденсації хроматину), що в застосованій нами методиці виявляється за допомогою йодиду пропідіуму, який проникає тільки у клітини з ушкодженими мембранами та забарвлює їх ядра в оранжевий колір. Барвник Хехст 33342 проникає і через неушкожені мембрани та забарвлює ядра живих клітин в синьо-зелений колір. Прижиттєве подвійне забарвлення дає можливість визначити кількість живих, апоптотичних і некротичних гепатоцитів.

Наші результати показали, що гепатоцити в первинній культурі підлягають спонтанній деградації, яка проявлялась як апоптотична та некротична загибель клітин. Установлено, що ВДК дозозалежно впливає на життєздатність гепатоцитів: при його 0,0001%-й концентрації кількість

живих клітин не відрізнялася від контролю, зі збільшенням концентрації – зменшувалася (таблиця). Ефект посилювався при збільшенні тривалості впливу ВДК. В обидва строки досліджень спостерігався дозозалежний вплив ВДК на некротичну загибель культивованих гепатоцитів: його найменша концентрація практично не впливала на цей показник, тоді як в наявності 0,01 % ВДК кількість некротичних клітин збільшувалася в 3,2 та 4,0 раза через 4 та 24 год інкубації відповідно. Подібним чином ВДК впливав на еритроцити, дозозалежно викликаючи їх лізис [4]. Це можна пояснити його взаємодією з білками мембрани: ВДК в менших концентраціях спричинює лише структурні перебудови мембрани, а при збільшенні концентрації витягає з неї білки, порушуючи цілісність біліпідного шару.

При дії ВДК протягом 4 год відмічалось збільшення кількості апоптотичних клітин, найбільш виражене при 0,001%-й його концентрації (у 1,6 раза в порівнянні з контролем). За 24 год впливу ВДК апоптоз збільшувався, максимальне підвищення кількості апоптотичних клітин спостерігалось при дії 0,01 % ВДК (у 3,3 рази в порівнянні з контролем). Серед морфологічних форм апоптотичних гепатоцитів виявлялися клітини з різними стадіями конденсації хроматину, ущільненими ядрами, з їх фрагментацією. Плазматична мембрана деяких апоптотичних гепатоцитів була ушкодженою, тобто відбувався вторинний постапоптотичний некроз. Додавання ВДК суттєво змінювало відсоток таких клітин від загальної кількості апоптотичних гепатоцитів (див. таблицю), що було більше виражено при тривалому впливі (24 год). Показано, що ВДК у 0,01%-й концентрації значно збільшує кількість апоптотичних клітин з ушкодженою плазматичною мембраною, що свідчить про мембранотоксичні властивості високих концентрацій. Протилежний ефект спостерігався при дії

ВДК в мінімальній концентрації: зменшувалася кількість постапоптотичного некрозу в 3,2 раза. Цей ефект 0,0001%-го розчину ВДК у поєднанні із деяким зниженням первинного некрозу може призводити до зменшення ушкодження та запальних процесів у тканинах.

При вивченні впливу ВДК на аутофагічну загибель клітин виявлена різнонаправлена дія високих і низьких його концентрацій: інкубація з ВДК у дозі 0,01 % пригнічувала аутофагію, зменшуючи відсоток клітин з аутофаголізосомами до $10,6\% \pm 2,7\%$ (з $34,4\% \pm 13,5\%$ у контролі), тоді як ВДК в дозі 0,001 % спричиняв деяке збільшення кількості клітин з ознаками аутофагії (до $39,7\% \pm 7,0\%$). Різниця в ефектах цих доз була вірогідною ($P < 0,05$). У наших експериментах із застосуванням різних концентрацій ВДК більша активність аутофагії співвідносилася з більшою здатністю гепатоцитів до виживання або до фізіологічної загибелі через апоптоз.

Отже, в результаті виконаної роботи показана дозозалежність ефектів ВДК на культивовані гепатоцити шурів: його низькі концентрації сприяють більш фізіологічній апоптотичній загибелі клітин, тоді як висока концентрація має токсичний ефект з різким підвищенням некрозу. Подібну закономірність встановлено для дії багатьох подразнювальних чинників – етанолу, перекису водню тощо, які в невеликих концентраціях призводять до активації регенераторних процесів у клітині та її виживання, при збільшенні концентрації викликають загибель клітин, спочатку апоптотичну, при посиленні впливу збільшується кількість клітин, які гинуть з ушкодженням плазматичної мембрани (некроз і вторинний постапоптотичний некроз) [5]. Ця експериментальна робота спонукає надалі вивчати *in vitro* та *in vivo* дію силіксу і його похідних на інтактні й уражені органи та тканини.

Кількість живих гепатоцитів і клітин з морфологічними ознаками некрозу та апоптозу (% до загальної), кількість клітин з постапоптотичним некрозом (% до кількості апоптотичних клітин) після обробки високодисперсним кремнеземом протягом 4 і 24 год ($M \pm m$; $n=11$)

Досліджені культури	Живі гепатоцити	Некротичні клітини	Апоптотичні клітин	Клітини з постапоптотичним некрозом
		4 год		
Інтактні культури	81,4±4,4	14,7±4,1	3,90±0,70	27,9±10,3
Культури, оброблені ВДК				
0,0001%	82,7±3,7	12,3±3,3	5,00±0,66	31,0±6,7
0,001%	76,9±4,5	16,7±4,1	6,33±0,91	28,3±8,0
			$P < 0,05$	
0,01%	48,1±8,9	47,6±9,1	4,36±0,46	38,1±8,0
	$P < 0,01$	$P < 0,01$		
		24 год		
Інтактні культури	82,3±5,6	15,6±5,5	2,10±0,20	36,5±10,8
Культури, оброблені ВДК				
0,0001%	82,3±5,2	13,9±5,1	3,81±0,43	11,4±3,7
0,001%	76,1±6,0	17,0±5,2	6,83±1,02	32,2±8,5
			$P < 0,001$	
0,01%	28,5±6,1	62,6±7,5	8,97±1,68	72,4±4,7
	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,01$

Примітка. P – відносно інтактних культур.

N. Rozmaritsa, Makogon N., Gerashchenko I., Alexeyeva I.

EFFECT OF HIGHDISPERSSED SILICA ON THE CULTURED RAT HEPATOCYTES

Highdispersed silica (HDS) is an active substance of medicine "Siliks", which demonstrates high protein adsorption property and is used for hatching out toxic agents of protein origin. To discover new potential applications of this substance, it is necessary to study the direct effect of HDS on cell viability. We studied the effects of HDS in concentration 0,0001%, 0,001% and 0,01% on cultured rat hepatocytes at 4 and 24 hours. To estimate the number of alive vs. apoptotic and necrotic cells, fluorescent nucleic dyes Hoechst 33342 and propidium iodide were employed. Cells that underwent autophagic processes were estimated using a specific fluorescent autophagosome marker monodansylcadaverine. We show here that HDS has dose-dependent effect on cell death; the number of cells with apoptotic features increased after 4 hours and in greater extend after 24 hours of treatment with HDS. At the lowest concentration HSD did not significantly affect cell viability, and we observed decrease in postapoptotic necrosis in cell culture. The highest concentration of HSD dramatically increased cell death through both necrosis and apoptosis. At the same time, autophagic activity was suppressed by 0,01% HSD.

*Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv;
Institute of surface chemistry, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бондарчук О.И., Загниборода П.Л., Сандер С.В., Чуйко А.А. Эффективность применения Силикса в хирургической практике. – В кн.: Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наук. думка, 2003. – С. 298–321.
2. Гацький О.О., Геращенко І.І., Луцюк М.Б. Вивчення гемолітичних властивостей високодисперсного кремнезему та його модифікованих форм *in vitro* // Вісн. морфології. – 2004. – **10**, №2. – С. 257–260.

3. Геращенко И.И. Силикс – отечественный сорбент многоцелевого назначения // Провизор. – 2005. – №9. – С. 22–23.
4. Геращенко И.И., Штатъко Е.И., Бондарчук О. И, Чуйко Н.А. Мембранотропные свойства Силикса - В кн.: Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наук. думка, 2003. – С. 168–179.
5. Проскураков С.Я., Габай В.Л., Коноплянников А.Г. Некроз – активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели // Биохимия. – 2002. – **67**, №4. – С. 467–491.
6. Способ обработки спермы сельскохозяйственных животных А.с. СССР. № 1144698 / А.А.Чуйко, В.Е.Недава, В.К.Пикалов и др. – Опубл. 15.06.1985. – Бюл. № 10.
7. Чуйко А.А., Тертых В.А., Лобанов В.В. Структура и физико-химические свойства поверхности кремнезема. – В кн.: Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наук. думка, 2003. – С. 10–21.
8. Gerashchenko B.I., Gerashchenko I.I., Kosaka T., Hosoya H. Stimulatory effect of aerosil on algal growth // Canad. J. Microbiol. – 2002. – **48**. – P.170–175.
9. Broker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review // Clin. Cancer. Res. – 2005. – **11**, №9. – P. 3155–3162.
10. Munafo D.B., Colombo M.I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation // J.Cell sci. – 2001. – **114**, №20. – P. 3619–3629.
11. Muraca M., Vilei M.T., Zanusso E. et al. Encapsulation of hepatocytes by SiO₂ // Transplant. Proc. – 2000. – **32**, № 8. – P. 2713–2714.²
12. Seglen P. Preparation of rat liver cells // Methods Cell Biol. – 1976. – **13**. – P. 29–83.
13. 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.
14. Fink S.L., Cookson B.T. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells // Infect. and Immunity. – 2005. – **73**, № 4. – P. 1907–1916.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т хімії поверхні НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 25.05.2006*