

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА АКТИВАЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПУТИ АПОПТОЗА ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПРИ ПЕРСИСТЕНЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

И. П. Жураковский, С. А. Архипов¹

На 24 половозрелых крысах-самцах Вистар, у которых с помощью золотистого стафилококка (штамм 209) создан очаг хронической инфекции в большеберцовой кости, изучена возможность инактивации митохондриального пути апоптоза в гепатоцитах крыс. 12 животным внутрибрюшинно вводили мелатонин в дозе 1 мг/кг в вечернее время (20:00 – 20:30) в течение 7 дней. Для изучения экспрессии в клетках печени белков, принимающих участие в регуляции апоптоза (Bcl-2, Bax, Bad, p53), а также маркера пролиферации Ki-67, использовали двухэтапный иммуногистохимический метод. Проведенное исследование позволило установить, что мелатонин у экспериментальных животных, имеющих отдаленный очаг хронической бактериальной инфекции, способствует уменьшению застойных явлений в системе печеночных вен и улучшению микроциркуляции, уменьшает выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации в области портальных трактов и препятствует формированию дискретных инфильтратов. Кроме того, отмечаются признаки инактивации митохондриального пути апоптоза в паренхиматозных клетках, обусловленные одновременным повышением экспрессии белка Bcl-2 на 185 %, $p < 0,0001$, и снижение экспрессии белков Bax (на 27 %, $p = 0,008$) и Bad (на 42 %, $p < 0,0001$), а так же уменьшение пула гепатоцитов, экспрессирующих цитоплазматический p53 на 50 %, $p < 0,0001$, и компенсаторное повышение их пролиферативной активности на 133 %, $p < 0,0005$.

Ключевые слова: мелатонин; апоптоз; гепатоциты; бактериальная инфекция; Bcl-2; Bax; Bad; p53; Ki-67.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, апоптоз играет важную роль как в процессе эмбрионального развития, так и в онтогенезе в целом [6, 12]. Во взрослом организме этот процесс наблюдается в различных типах ткани, где выполняет роль гомеостатической регуляции. Реализация запрограммированной гибели клеток происходит и при различных патологических состояниях. Как известно, это многоступенчатый процесс. На первом этапе происходит инициация и трансдукция проапоптотического сигнала [8]. За ними следует эффекторная фаза, в ходе которой происходит активация каспазной системы клетки. На заключительной стадии развития апоптотического процесса наступает фаза деградации клетки, характеризующаяся деструкцией клеточного материала [8, 13, 14].

Существует несколько путей развития эффекторной фазы апоптоза, принципиальное отличие которых заключается в механизме инициации и трансдукции проапоптотического сигнала. В настоящее время у млекопитающих описано 3 основных пути инициации апоптоза: митохондриальный, липидный и Fas-зависимый [11, 14, 16].

Показано, что митохондриальный путь инициации апоптоза является зависимым от взаимодействия большого количества белков-регуляторов семейства Bcl-2. Белки этого семейства постоянно представлены на

внешней митохондриальной мембране. Белок Bcl-2 и его гомологи (Bcl-xL, Mcl-1 и др.) выполняют функцию защиты клеток от апоптоза. Фактор Bcl-2 поддерживает инактивированное состояние проапоптотического белкового комплекса, в состав которого входят прокаспаза-9 (Araf-3), адаптер Araf-1, флавопротеин AIF, цитохром с (Araf-2), фактор Smac и ряд других факторов [4, 13].

Длительное существование фокальной персистирующей инфекции вызывает определенные изменения в функционировании основных гомеостатических систем, и как следствие, структурную перестройку органов и тканей. Описан синдром сочетанных дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе [1], при формировании которого в печени наблюдаются признаки неспецифического реактивного гепатита. Принимая во внимание, что при этом происходит активация митохондриального пути апоптоза гепатоцитов [2], представляет интерес изучение возможности блокады или нейтрализации данного процесса.

В настоящее время является установленным, что, помимо ритморганизующего эффекта, мелатонин обладает выраженным антиоксидантным и иммуномодулирующим действием. В повышенной концентрации мелатонин связывает свободные радикалы кислорода [15], в то время как в физиологической — выступает как регулятор окислительно-восстановительных ферментов [9], супрессор прооксидантно иницирован-

¹ ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава РФ, Россия, 630091, Новосибирск, Красный пр., 52.

ных и воспалительных процессов [10], а также как митохондриальный модулятор [7].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния мелатонина на индукцию митохондриального пути апоптоза в гепатоцитах крыс при персистенции бактериальной инфекции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 30 половозрелых крысах-самцах Вистар с исходной массой 180 – 220 г (ви-варий ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава РФ, Новосибирск). У 24 животных под общим ингаляционным наркозом выполнена трепанация большеберцовой кости с последующим тампонирующим отверстием хлопчатобумажной нитью, находившейся в течение 30 мин в смыве суточной культуры *S. aureus* (штамм 209). Предварительное исследование позволило установить, что при подобной обработке нити на ней содержится 10^7 колониеобразующих единиц. В последующем у крыс развивался остеомиелит большеберцовой кости, что подтверждали результатами морфологического исследования. Исследование проводили через 2 и 3 мес после воспроизведения очага хронического воспаления в группах: 1 — воспаление 2 мес (6 крыс) и 2 — воспаление 3 мес (6 крыс).

Для изучения влияния мелатонина на активацию митохондриального пути апоптоза гепатоцитов крысам за неделю до срока 2 мес от момента воспроизведения у них хронического воспаления внутривенно вводили изучаемый препарат (мелатонин ICN Biomedicals Inc., USA) в дозе 1 мг/кг в вечернее время (20:00 – 20:30) в течение 7 дней (группа 3 — воспаление + мелатонин, 2 мес, 6 крыс). В группу 4 (воспаление + мелатонин, 3 мес, 6 крыс), для уточнения отдаленного результата действия препарата вошли животные через 1 мес после окончания курса введения мелатонина. В качестве контроля использовали 6 интактных крыс. Эксперимент выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей. Животных выводили из эксперимента путем декапитации.

В целях максимального сохранения прижизненного взаимодействия микроциркуляторного русла и корней лимфатической системы, отмывания печени от крови не производили. Материал фиксировали в 12 % формалине. Из залитых в парафин объектов делали серийные срезы толщиной 7 мкм, которые для обзорной световой микроскопии окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Для изучения экспрессии в гепатоцитах белков, принимающих участие в механизмах инициации и пролонгировании апоптотического процесса в клетках (Bcl-2, Bax, Bad, p53), а также маркера пролиферации (Ki-67), использовали двухэтапный иммуногистохимический метод. Демаскировку антигенов проводили при инкубировании депарафинирован-

ных срезов в растворе тритона X100. В качестве первичных антител использовали: Anti-Bcl-2 (Isotype: Mouse IgG1, Clone: 7; BD Biosciences), Anti-Bax (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse/Rat; BD Biosciences), Anti-Bad (Isotype: Mouse IgG2b, Clone 48; BD Biosciences), Anti-p53 (Novocastra NCL-p53-CM5p, Isotype: Mouse IgG), Anti-Ki-67 (RTU-Ki67-MM1, Isotype: Mouse; Novocastra). Препараты последовательно инкубировали с «первыми антителами» к соответствующим маркерам, вторыми биотинилированными антителами, стрептавидин-пероксидазным комплексом и на конечном этапе окраски — в растворе диаминобензидина (DAB), содержащем H_2O_2 . Зоны клеточных мембран или цитоплазмы, содержащие выявляемые антигены, окрашивались в специфический темно-коричневый цвет. Интенсивность такой окраски прямо пропорциональна количеству экспрессируемого маркера.

Анализ интенсивности экспрессии белков и площади, на которой она выявлялась, проводили с помощью светооптического микроскопа и морфометрического комплекса на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13c фирмы Baumer и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для каждой экспериментальной группы оценивали по 48 изображений. Площадь препарата, получаемого на одном изображении, составляла 21455 мкм². Определяли площадь изучаемых компартментов (s_{obl}), среднее серое значение их яркости (r_{obl}), а также среднее серое значение яркости фона ($r_{фона}$). Затем вычисляли: 1) интенсивность окраски фона ($io_{фона}$) по формуле: $io_{фона} = 255 - r_{фона}$; 2) интенсивность окраски области, занимаемой выявляемыми компонентами (io_{obl}), по формуле: $io_{obl} = 255 - r_{obl} - io_{фона}$; 3) относительную площадь $s_{obl_отн}$ по формуле:

$$s_{obl_отн} = s_{obl} \cdot 100 / s_{\text{микрофотографии}} [3].$$

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы “SPSS 11.5 for Windows”. При сравнении показателей исследуемых групп использовали методы непараметрической статистики, в связи с ненормальным распределением значений в вариационных рядах. Числовые данные приведены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_1 ; Q_3). Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического критерия для k независимых выборок (Крускалла — Уоллиса).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Патологические изменения в ткани печени через 2 мес после создания периферического очага бактериальной инфекции свидетельствовали об имевших место микроциркуляторных нарушениях, сопровождающих застойные явления в системе печеночных вен; развившейся на этом фоне тканевой гипоксии с уме-

ренными дистрофическими изменениями паренхиматозных клеток; воспалительной реакции, проявляющейся в инфильтрации портальных трактов лимфогистиоцитарными элементами, а также наличии дискретных инфильтратов с концентрацией лимфоидных элементов в местах скопления дистрофически измененных гепатоцитов. Отмечали миграцию тучных кле-

ток, разрастание соединительной ткани в области триад, в стенках и окружении центральных вен, и усиление активации митохондриального пути апоптоза гепатоцитов, по сравнению с группой интактных животных (таблица).

При изучении морфологической картины срезов печени, в отличие от группы 1 (воспаление, 2 мес), у жи-

Влияние мелатонина на уровень белков-регуляторов апоптоза и пролиферации в гепатоцитах крыс (иммуногистохимическое исследование) на фоне экспериментальной хронической стафилококковой инфекции большеберцовой кости (Me (Q₁; Q₃))

Показатель	Воспаление		Воспаление + мелатонин		Интактные
	группа 1	группа 2	группа 3	группа 4	группа 5
	2 мес N = 6	3 мес N = 6	2 мес N = 6	3 мес N = 6	N = 6
Относительная площадь гепатоцитов, экспрессирующих Bad, %	5,96 (3,66, 8,23)	4,52 (2,98, 6,98)	1,18 (0,68, 2,03) $p_1 < 0,0001$	2,59 (1,70, 3,95) $p_2 < 0,0001$ $p_3 < 0,0001$	2,27 (1,26, 3,34)
Интенсивность окрашивания гепатоцитов, экспрессирующих Bad, у. е.	34,0 (34,2, 39,1)	34,6 (28,6, 39,3)	43,4 (28,7, 48,0) $p_1 < 0,0001$	49,5 (44,0, 55,1) $p_2 < 0,0001$ $p_3 < 0,0001$	31,0 (29,5, 32,7)
Относительная площадь гепатоцитов, экспрессирующих Bax, %	1,79 (1,17, 3,41)	2,23 (1,38, 3,05)	0,80 (0,45, 1,17) $p_1 < 0,0001$	1,63 (1,11, 2,32) $p_2 = 0,008$ $p_3 < 0,0001$	1,55 (1,04, 2,87)
Интенсивность окрашивания гепатоцитов, экспрессирующих Bax, у. е.	48,1 (42,1, 65,9)	42,1 (39,0, 45,7)	53,5 (49,0, 58,7)	49,7 (43,7, 53,4) $p_2 < 0,0001$ $p_3 = 0,005$	24,6 (20,5, 27,1)
Относительная площадь гепатоцитов, экспрессирующих Bcl-2, %	2,37 (1,17, 4,10)	2,78 (1,63, 3,72)	2,60 (1,98, 3,27)	5,14 (3,51, 7,14) $p_2 < 0,0001$ $p_3 < 0,0001$	7,50 (4,49, 10,49)
Интенсивность окрашивания гепатоцитов, экспрессирующих Bcl-2, у. е.	33,3 (24,4, 43,2)	38,0 (32,0, 42,4)	48,6 (45,3, 55,4) $p_1 < 0,0001$	49,0 (46,2, 54,9) $p_2 < 0,0001$	28,9 (24,7, 32,1)
Относительная площадь гепатоцитов, экспрессирующих p53, %	0,79 (0,47, 1,39)	4,19 (2,75, 6,30)	1,99 (1,54, 3,00) $p_1 < 0,0001$	2,08 (1,82, 2,58) $p_2 < 0,0001$	2,66 (1,60, 4,33)
Интенсивность окрашивания гепатоцитов, экспрессирующих p53, у. е.	52,5 (50,4, 54,7)	41,0 (38,2, 45,7)	49,2 (42,4, 56,0)	58,6 (56,4, 62,0) $p_2 < 0,0001$ $p_3 < 0,0001$	35,1 (32,9, 47,1)
Относительная площадь гепатоцитов, экспрессирующих Ki67, %	0,50 (0,23, 0,96)	3,54 (2,24, 4,81)	3,28 (2,20, 5,65) $p_1 < 0,0001$	4,72 (3,97, 6,48) $p_2 < 0,0005$ $p_3 = 0,014$	4,03 (2,72, 6,74)
Интенсивность окрашивания гепатоцитов, экспрессирующих Ki67, у. е.	33,5 (31,8, 39,4)	49,6 (45,0, 54,9)	49,4 (47,7, 54,1) $p_1 < 0,0001$	42,6 (41,8, 45,0) $p_2 < 0,0001$ $p_3 < 0,0001$	37,5 (32,3, 42,3)

Примечание: группа 1 – 2 мес после инокуляции *S. aureus*; группа 2 – 3 мес после инокуляции *S. aureus*; группа 3 — введение мелатонина в течение 7 дней за неделю до срока 2 мес с момента инокуляции *S. aureus*; группа 4 — через 1 мес после окончания введения мелатонина (3 мес после инокуляции *S. aureus*). p_1 — достоверность различий между группами 1 и 3; p_2 — достоверность различий между группами 2 и 4; p_3 — достоверность различий между группами 3 и 4.

вотных группы 3 (воспаление + мелатонин, 2 мес) отмечали уменьшение застойных явлений в системе печеночных вен и улучшение микроциркуляции, стала менее выраженной лимфогистиоцитарная инфильтрация в области портальных трактов, значительно меньшее присутствие в данных инфильтратах тучных клеток, отсутствовали дискретные инфильтраты, менее выраженными стали дистрофические изменения гепатоцитов. Кроме того, отмечали признаки инактивации митохондриального пути апоптоза в паренхиматозных клетках и компенсаторное повышение их пролиферативной активности (таблица).

Морфологическое исследование препаратов печени через 3 мес после создания очага бактериальной инфекции свидетельствовало об усилении микроциркуляторных нарушений, сопровождавших застойные явления в системе печеночных вен, наличии выраженных дистрофических изменений паренхиматозных клеток и инфильтрацией портальных трактов лимфогистиоцитарными элементами с высоким содержанием мастоцитов, выраженное разрастание соединительной ткани в области триад, в стенках и окружении центральных вен, отмечалось дальнейшее усиление активации митохондриального пути апоптоза гепатоцитов по сравнению с интактными животными.

В отдаленный период после проведенного курса введения мелатонина (группа 4 воспаление + мелатонин, 3 мес), при изучении срезов печени отмечали нормализацию диаметра центральных вен, которые чаще всего оказывались свободными от форменных элементов; синусоидные капилляры, расположенные между печеночными балками, были не расширены, в них отсутствовали эритроцитарные агрегаты; гепатоциты имели обычную форму и величину, ядра занимали центральное положение, часто встречались двуядерные клеточные элементы, как исключение, встречались клетки с гипо- или гиперхромными ядрами. Иммуногистохимическое исследование позволило установить, что через 1 мес после применения мелатонина продолжала сохраняться сниженная, по сравнению с животными, которым препарат не вводили, активность инициации митохондриального пути апоптоза и, как следствие, отмечали повышенную пролиферативную активность гепатоцитов (таблица).

Проведенное исследование позволило установить, что применение мелатонина в дозе 1 мг/кг в течение 7 дней у крыс, имеющих очаг хронической инфекции, сопровождается уменьшением признаков неспецифического реактивного гепатита. Проведенное на этом фоне изучение экспрессии белков-регуляторов апоптоза позволило выявить определенную динамику изменений, касающихся экспрессии белков семейства Bcl-2, от соотношения которых зависит вероятность индукции митохондриального пути апоптоза. Так, непосредственно после завершения применения мелатонина выявлено достоверное уменьшение относительной площади гепатоцитов, экспрессирующих Вах.

Аналогичные изменения отмечались и в отношении продукции Ваd. В тоже время уровень продукции антиапоптогенного белка Bcl-2 достоверно стал выше, о чем свидетельствовало увеличение интенсивности специфического окрашивания к данному маркеру.

Как известно, белки Bcl-2 и Вах, а также Bcl-2 и Ваd, находятся в состоянии постоянного динамического равновесия, образуя гомо- и гетеродимеры, не обладающие проапоптогенной активностью. При доминировании продукции проапоптогенных белков Ваd и Вах такое равновесие нарушается и смещается в сторону образования большого количества гомодимеров из проапоптогенных белков, обладающих высокой проапоптогенной активностью [8]. Следовательно, мелатонин, вызывая усиление продукции в гепатоцитах Bcl-2 и снижение синтеза антиапоптогенных белков Вах и Ваd, влияет на процесс инициации митохондриального пути апоптоза.

Мелатонин вызывает более чем 2-кратное увеличение относительной площади гепатоцитов, экспрессирующих р53, по сравнению с аналогичным сроком воспалительного процесса, но без применения мелатонина, в то же время относительная площадь гепатоцитов, экспрессирующих Ki-67, возросла более чем в 6 раз. В литературе описан механизм, приводящий к апоптозу через конкурентное ингибирование Bcl-2, осуществляемое белком р53, который замедляет в нормальных клетках митотическую активность [17]. Известно, что некоторые стимулы, например гипоксия, активируют ген р53, переводя клетку на апоптогенный путь. Белок р53 задерживает клетку в фазе G1/S клеточного цикла (через репрессию генов, регулирующих транскрипцию), чтобы дать время для работы репаративных систем. На уровне транскрипции фактор р53 регулирует экспрессию генов, участвующих в блокаде клеточного цикла, а также взаимодействует либо с комплексами, определяющими синтез и репарацию ДНК, либо с белками, модулирующими апоптоз. Если повреждение ликвидировать не удастся, то р53 запускает апоптоз [5, 11]. Происходит это через инактивирование Bcl-2 при его связывании с белком Вах.

Через 1 мес после применения мелатонина у животных с наличием очага бактериального воспаления отмеченные выше тенденции по нейтрализации действия проапоптогенных белков сохранялись. Одним из вероятных механизмов запуска апоптоза гепатоцитов при персистенции бактериальной инфекции может являться процесс гетеродимеризации Bcl-2, обусловленный одновременным снижением экспрессии белка Bcl-2 и повышением экспрессии в гепатоцитах белков Вах и Ваd. Указанный процесс гетеродимеризации Bcl-2 может быть сопряжен с изменением степени фосфорилирования/дефосфорилирования белка-индуктора Ваd. Как известно, в этих условиях Ваd дефосфорилируется, образуются гетеродимеры Bcl-2/Ваd, и запускается процесс апоптоза за счет высвобождения митохондриальных факторов, при этом в

конечном итоге происходит активация каспазы-9 [8]. Иными словами, вероятность индукции митохондриального пути апоптоза в гепатоцитах крыс при применении курсового воздействия мелатонином существенно уменьшается. Также установлено, что в отдаленные сроки курсовое применение мелатонина при персистенции бактериальной инфекции способствует снижению пула гепатоцитов, экспрессирующих цитоплазматический p53, и увеличению паренхиматозных клеток, экспрессирующих Ki-67. Это, в свою очередь, может указывать на то, что применение мелатонина способствует созданию условий, в которых происходит восстановление ДНК, и клетки могут вступить в фазу деления, восполняя пул погибших или поврежденных гепатоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Мелатонин (1 мг/кг при внутривенном введении в течение 7 дней) способствует уменьшению застойных явлений в системе печеночных вен и улучшению микроциркуляции, уменьшает выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации в области портальных трактов и препятствует формированию дискретных инфильтратов в ткани печени у крыс, имеющих очаг хронической бактериальной инфекции.

2. Мелатонин вызывает повышение экспрессии белка Bcl-2 на 185 %, $p < 0,0001$, и снижение экспрессии белков Bax (на 27 %, $p = 0,008$) и Bad (на 42 %, $p < 0,0001$) в гепатоцитах, а также уменьшает пул гепатоцитов, экспрессирующих цитоплазматический p53 на 50 %, $p < 0,0001$, и компенсаторное повышение их пролиферативной активности на 133 %, $p < 0,0005$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. И. Команденко, А. И. Рыжов, И. П. Жураковский, *Остеохондроз позвоночника: Монография*, Сибмедииздат НГМУ, Новосибирск (2006).
2. И. П. Жураковский, М. В. Битхаева, С. А. Архипов и др., *Кубанский науч. мед. вестник*, **2**, 84 – 88 (2012).
3. Е. В. Овсянко, А. О. Кулишенко, Е. Л. Лушникова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **158**(11), 627 – 631 (2014).
4. R. S. Akhtar, Y. Geng, B. J. Klocke, C. B. Latham, et al., *J. Neurosci.*, **26**(27), 7257 – 7264 (2006).
5. R. S. Akhtar, Y. Geng, B. J. Klocke, K. A. Roth, *Cell. Death Differ.*, **13**(10), 1727 – 1739 (2006).
6. F. Drakopanagiotakis, A. Xifteri, V. Polychronopoulos, D. Bouros, *Eur. Respir. J.*, **32**(6), 1631 – 1638 (2008).
7. G. Escames, L. C. López, F. Ortiz, A. López, et al., *FEBS J.*, **274**(8), 2135 – 2147 (2007).
8. C. Franke, M. Nöldner, R. Abdel-Kader, et al., *Neurobiol. Dis.*, **25**(2), 438 – 445 (2007).
9. R. Hardeland, B. Poeggeler, V. Srinivasan, I. Trakht, et al., *Arzneimittel-Forsch.*, **58**(1), 1 – 10 (2008).
10. R. Hardeland, D. P. Cardinali, V. Srinivasan, D. V. Spence, et al., *Prog. Neurobiol.*, **93**(3), 350 – 384 (2011).
11. S. L. Harris, A. J. Levine, *Oncogene*, **24**(17), 2899 – 2908 (2005).
12. M. O. Hengartner, *Nature*, **407**(6805), 770 – 776 (2000).
13. R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **57**(5), 545 – 553 (2006).
14. H. C. Lee, Y. H. Wei, *J. Biomed. Sci.*, **7**(1), 2 – 15 (2000).
15. R. J. Reiter, D. X. Tan, J. C. Mayo, R. M. Sainz, et al., *Acta Biochim. Pol.*, **50**(4), 1129 – 1146 (2003).
16. H-U. Simon, *Eur. Respir. J. Suppl.*, **22**(44), 20s – 21s (2003).
17. J. Yu, L. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**(3), 851 – 858 (2005).

Поступила 08.10.16

THE EFFECT OF MELATONIN ON ACTIVATION OF THE MITOCHONDRIAL APOPTOSIS PATHWAY OF RAT HEPATOCYTES IN PERSISTENCE OF BACTERIAL INFECTION

I. P. Zhurakovskii and S. A. Arkhipov

Novosibirsk State Medical University, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Krasnyi prosp. 52, Novosibirsk, 630091 Russia

The possibility of inactivation of the mitochondrial pathways of apoptosis in rat hepatocytes was studied on a group of 24 adult male Wistar rats, in which a nidus of chronic infection in the tibia was induced with the aid of *Staphylococcus aureus* (strain 209). Melatonin in a dose of 1 mg/kg was injected intraperitoneally to the test group of 12 animals in the evening (20.00 – 20.30) for seven days. The expression of proteins, involved in regulation of apoptotic (Bcl-2, Bax, Bad, p53) in liver cells and the proliferation marker (Ki-67) were studied by two-stage immunohistochemical method, which revealed that the administration of melatonin in test animals with distant foci of chronic bacterial infection decreased stagnation in the hepatic veins and improved microcirculation, reduced the severity of lymphohistiocytic infiltration in the area of portal tracts, and prevented the formation of discrete infiltrates. In addition, there were signs of inactivation of the mitochondrial path of apoptosis in parenchymal cells due to simultaneous increase in the expression of Bcl-2 by 85% ($p < 0.0001$), decrease in expression of Bax by 27% ($p = 0.008$) and Bad (by 42%, $p < 0.0001$), decrease in the pool of hepatocytes expressing cytoplasmic p53 by 50% ($p < 0.0001$), and a compensatory increase in their proliferative activity by 133% ($p < 0.0005$).

Keywords: melatonin; apoptosis; hepatocytes; bacterial infection; Bcl-2; Bax; Bad; p53; Ki-67.