

УДК 581.5 + 612.013:615.9 + 611-018

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АПОПТОЗА В ОРГАНАХ КРЫС НА МОДЕЛИ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ CCL₄

Тышко Н.В., Селяскин К.Е., Тутельян В.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт питания», Москва, e-mail: tnv@ion.ru

На экспериментальной модели *in vivo* проведена сравнительная оценка чувствительности биохимического, морфологического и электрофоретического (ДНК-комет) методов определения апоптоза в органах крыс. Показано, что при активации апоптоза путем внутрибрюшинного введения крысам тетрахлорметана в дозах 0,08 и 0,48 мг/кг массы тела и дозозависимом повышении активности апоптоза в печени, почках и костном мозге динамика изменений активности каспазы-3, уровня фрагментации ДНК и индекса апоптоза имела сходный характер – постепенное возрастание с максимумом через 24 часа. Содержание белков Bcl-2, Bax и p53 в печени достигало максимальных значений через 12 часов. На основании полученных результатов был сделан вывод, что показатели, характеризующие завершающие этапы апоптоза, достигают максимальных значений через 24 часа, поэтому оптимальное время отбора образцов ткани для исследований данных показателей составляет 24 часа после однократного воздействия, при этом чувствительность изученных показателей снижается в ряду индекса апоптоза > уровень фрагментации ДНК > активность каспазы-3. Показатели, характеризующие начало эффекторного этапа апоптоза (содержание белков Bcl-2, Bax и p53), по чувствительности сопоставимы с показателем индекса апоптоза, однако оптимальное время отбора образцов тканей для регистрации содержания данных белков составляет 12 часов после однократного воздействия.

Ключевые слова: апоптоз, тетрахлорметан, индекс апоптоза, уровень фрагментации ДНК, активность каспазы-3

DETECTION OF RAT INTERNAL ORGANS APOPTOSIS ACTIVITY BASED ON MODEL OF CCL₄ TOXIC EFFECTS

Tyshko N.V., Selyaskin K.E., Tutelyan V.A.

FSBI «Institute of Nutrition», Moscow, e-mail: tnv@ion.ru

Comparative assessment of sensitivity of biochemical, morphological and electrophoretic (DNA comet-assay) methods for the determination of apoptosis in rat organs has been carried out in *in vivo* experimental model. It has been shown that activation of apoptosis by intraperitoneal administration of tetrachloromethane to rats at doses of 0.08 and 0.48 mg/kg body weight and a dose-dependent increase in activity of apoptosis in the liver, kidney and bone marrow, dynamic of changes in the caspase-3 activity, the DNA fragmentation level and apoptosis index had a similar character i.e. gradual increase with its maximum in 24 hours. The concentrations of proteins Bcl-2, Bax and p53 in the liver reached their maximum values after 12 hours. Based on these results, it was concluded that the indicators characterizing the apoptosis final stages reach maximum their values after 24 hours, so the optimal time for tissue sampling for the research of these indicators estimates 24 hours after a single exposure, while the sensitivity of the studied parameters is reduced in a number of apoptosis index > DNA fragmentation level > caspase-3 activity. Indicators characterizing the beginning of the effector phase of apoptosis (the content of proteins Bcl-2, Bax and p53) are comparable to the apoptosis index sensitivity however the optimal time for tissue sampling for recording contents of particular proteins estimates 12 hours after single exposure.

Keywords: apoptosis, tetrachloromethane, apoptosis index, DNA fragmentation level, caspase-3 activity

Исследование молекулярных механизмов, отвечающих за контроль процессов апоптоза, позволило выявить ряд диагностически значимых маркеров различных этапов гибели клетки [1, 2, 7]. Поскольку апоптоз является эволюционно-консервативным системным процессом, обеспечивающим поддержание гомеостаза на протяжении всего периода жизни организма, показатели активности апоптоза можно рассматривать как интегральные биомаркеры, отражающие уровень адаптации организма к окружающей среде и обладающие высокой специфичной чувствительностью к воздействиям различной природы [3, 5, 9]. Есть основания предполагать, что определение активности апоптоза может быть эффективно использовано в исследованиях, направленных на изучение влияния эк-

зогенных воздействий различной природы, в том числе низкотоксичных объектов.

Комплексное изучение апоптоза под влиянием разнообразных средовых или онтогенетических факторов широко представлено в научных публикациях [4, 6, 8], однако влияние токсических факторов на предрасположенность клетки к апоптозу остается до настоящего времени наименее изученным аспектом проблемы.

Целью настоящей работы является выявление наиболее чувствительных методов определения активности апоптоза на модели воздействия токсических факторов.

Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 70 половозрелых крысах-самцах линии Вистар с исходной массой тела $312,4 \pm 10,8$ г, полученных из питомника

лабораторных животных «Столбовая». Животные были произвольно разделены на 3 группы: 10 особей – в контрольной группе и по 30 особей в опытных группах. Крысы содержались в пластиковых клетках с древесной подстилкой, в отапливаемом (температурный режим + 21–23 °С) и венти-

лируемом помещении с естественным освещением, доступ к корму и воде *ad libitum*. На протяжении эксперимента не отмечено гибели крыс контрольной и опытных групп. Состав, пищевая и энергетическая ценность использованного рациона представлены в табл. 1.

Таблица 1

Состав полусинтетического казеинового рациона

Ингредиенты рациона	Кол-во, г	Белок, г	Жиры, г	Углеводы, г	Калорийность	
					ккал	%
Казеин	25,0	20,20	0,38	–	84,22	22,1
Крахмал маисовый	58,0	0,58	–	50,2	203,12	53,3
Масло подсолнечное	5,0	–	4,99	–	44,91	11,8
Лярд	5,0	–	4,98	–	44,82	11,8
Солевая смесь*	4,0	–	–	–	–	–
Смесь в/р витаминов*	1,0	–	–	1,0	4,0	1,0
Смесь ж/р витаминов*	0,1	–	0,1	–	–	–
Микрокристаллическая целлюлоза	2,0	–	–	–	–	–
ИТОГО	100,1	20,78	10,45	51,2	381,07	100

Примечание. * по МУ 2.3.2.2306-07.

В исследованиях оценивали изменения показателей апоптоза через 6, 12, 24 часа после однократного внутрибрюшинного введения CCl_4 в дозе 0,08 и 0,48 мг/кг массы тела по сравнению с животными контрольной группы. В эксперименте были изучены показатели, характеризующие начало эффекторного этапа апоптоза – содержание белков Bcl-2, Bax и p53, завершающую стадию эффекторного этапа апоптоза – активность каспазы-3, а также этап деструкции – уровень фрагментации ДНК, индекс апоптоза.

Содержание белков Bcl-2, Bax и p53 определяли с помощью иммуногистохимического исследования (метод двойных антител с иммунопероксидазной (стрептовидин-биотиновой) меткой). Были использованы моноклональные антитела Bcl-2 (кат. № ab7973), Bax (кат. № ab7977), p53 (кат. № ab4060) фирмы Abcam, Великобритания. Анализ иммуногистохимических микропрепаратов проводили с помощью микроскопа Zeiss AxioImager Z1 в проходящем свете при увеличении $\times 400$, программное обеспечение Zeiss AxioImager Version 4.7.

Активность каспазы-3 в тканях лабораторных животных определяли, используя тест-систему «Caspase 3 Colorimetric Kit» фирмы R&D System, США.

Для оценки степени фрагментации ДНК и расчета индекса апоптоза был использован метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) (по МР 4.2.0014-10).

Обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ прикладного статистического анализа StatSoft STATISTICA 8.0. Характер распределения количественных признаков определяли с помощью χ^2 -критерия. Проверка гипотезы о равенстве дисперсий проводилась с помощью критерия Левена. Вычисляли среднее значение (M),

стандартное отклонение (SD) и стандартную ошибку среднего (m). Данные представлены как $M \pm m$.

Проводили сравнение количественных признаков двух независимых выборок, удовлетворяющих условиям нормального распределения и равенству дисперсий критерия ANOVA. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

После введения CCl_4 у животных на всех сроках эксперимента не наблюдалось каких-либо видимых проявлений токсического действия. На вскрытии также не было выявлено каких-либо макроскопических изменений внутренних органов. Результаты исследований уровня апоптоза в тканях и органах крыс после однократного внутрибрюшинного введения CCl_4 в дозе 0,08 и 0,48 мг/кг представлены в табл. 2–6.

Как видно из табл. 2, при введении CCl_4 в дозе 0,08 мг/кг массы внутренних органов крыс опытной группы не отличались от аналогичных показателей у крыс контрольной группы на всех сроках отбора материала. При введении CCl_4 в дозе 0,48 мг/кг через 24 часа после введения CCl_4 отмечено повышение массы печени у крыс опытной группы: абсолютной – на 15%, относительной – на 20%; при этом массы почек, тимуса и головного мозга не имели значимых различий между группами.

Таблица 2

Масса внутренних органов крыс после введения CCl_4

Показатели		Контроль	Доза CCl_4					
			0,08 мг/кг массы тела			0,48 мг/кг массы тела		
			6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Печень	абс. ¹	10,18 ± 0,15	9,95 ± 0,26	10,38 ± 0,31	10,99 ± 0,36	10,50 ± 0,26	10,32 ± 0,37	11,71 ± 0,39*
	Min-Max	9,41–10,79	8,32–11,01	8,90–12,34	9,11–12,93	9,36–12,20	8,92–12,97	9,68–13,36
	отн. ²	2,49 ± 0,03	2,48 ± 0,05	2,49 ± 0,05	2,53 ± 0,06	2,62 ± 0,06	2,53 ± 0,04	2,99 ± 0,07*
	Min-Max	2,29–2,59	2,25–2,76	2,30–2,85	2,20–2,93	2,27–2,89	2,40–2,75	2,64–3,27
Почки	абс.	2,86 ± 0,07	2,79 ± 0,09	2,78 ± 0,18	2,84 ± 0,10	2,80 ± 0,03	2,72 ± 0,08	2,96 ± 0,04
	Min-Max	2,48–3,28	2,38–3,26	1,10–3,01	2,50–3,32	2,62–2,90	2,36–3,09	2,75–3,27
	отн.	0,71 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,65 ± 0,05	0,65 ± 0,02	0,69 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,69 ± 0,02
	Min-Max	0,60–0,82	0,60–0,77	0,45–0,75	0,56–0,73	0,61–0,80	0,60–0,70	0,61–0,74
Тимус	абс.	0,61 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,53 ± 0,04	0,51 ± 0,04	0,54 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,61 ± 0,06
	Min-Max	0,35–0,50	0,41–0,88	0,36–0,80	0,36–0,68	0,43–0,62	0,37–0,62	0,30–0,91
	отн.	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,02
	Min-Max	0,06–0,12	0,10–0,21	0,10–0,21	0,09–0,15	0,12–0,17	0,10–0,14	0,07–0,20
Мозг	абс.	2,01 ± 0,03	2,01 ± 0,04	1,98 ± 0,04	1,92 ± 0,04	2,00 ± 0,05	1,95 ± 0,06	1,89 ± 0,04
	Min-Max	1,86–2,17	1,85–2,25	1,82–2,33	1,71–2,21	1,73–2,17	1,61–2,22	1,75–2,11
	отн.	0,49 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,01
	Min-Max	0,44–0,53	0,47–0,53	0,47–0,56	0,39–0,56	0,46–0,60	0,01–0,02	0,39–0,57

Примечания:

¹ Абсолютная масса внутренних органов, $M \pm m$, г;

² Относительная масса внутренних органов, $M \pm m$, г/100 г массы тела;

* отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$ ($n = 10$).

Как видно из табл. 3, через 6 часов после однократного внутрибрюшинного введения CCl_4 в дозе 0,08 мг/кг не отмечалось повышения содержания белков Bcl-2, Вах и р53,

через 12 часов зарегистрировано повышение содержания белков Bcl-2 (на 33%, $p < 0,05$) и Вах (на 44%, $p > 0,05$), содержание белка р53 не отличалось от контрольного уровня.

Таблица 3

Содержание Bcl-2, Вах и р53 белков в печени крыс после введения CCl_4

Содержание белков, %		Контроль	Доза CCl_4					
			0,08 мг/кг массы тела			0,48 мг/кг массы тела		
			6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Bcl-2	$M \pm m$	2,34 ± 0,27	2,01 ± 0,55	3,12 ± 0,21*	3,03 ± 1,05	4,74 ± 0,62*	5,07 ± 0,33*	4,18 ± 0,76*
	Min-Max	1,86–2,68	1,53–2,88	2,68–3,87	2,75–3,79	4,08–5,62	4,13–6,08	3,67–6,11
Вах	$M \pm m$	1,89 ± 0,57	1,78 ± 0,31	2,73 ± 1,34	2,11 ± 0,79	4,07 ± 0,38*	4,70 ± 0,64*	3,17 ± 0,59*
	Min-Max	1,58–4,02	1,48–2,87	2,09–3,77	1,65–3,11	3,15–4,85	4,36–5,51	2,18–6,19
р53	$M \pm m$	2,20 ± 0,53	2,43 ± 0,67	2,19 ± 0,66	2,15 ± 0,44	3,07 ± 0,52	4,15 ± 0,27*	3,44 ± 0,21*
	Min-Max	1,55–2,68	2,14–3,86	1,63–3,47	1,18–3,18	1,54–4,09	3,12–5,22	3,15–4,18

Примечания: представлены средние данные ($M \pm m$) от $n = 10$;

* отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$.

После введения CCl_4 в дозе 0,48 мг/кг, повышение содержания белков Bcl-2, Вах и р53 отмечено на всех сроках отбора образцов:

через 6 часов – на 103% ($p < 0,05$), 115% ($p < 0,05$) и 40% ($p > 0,05$);

через 12 часов – на 117% ($p < 0,05$), 149% ($p < 0,05$) и 89% ($p < 0,05$);

через 24 часа – на 79% ($p < 0,05$), 68% ($p < 0,05$) и 56% ($p < 0,05$), соответственно.

После введения CCl_4 в дозе 0,08 мг/кг массы тела не наблюдалось изменений активности каспазы-3 в тимусе, мозге и кост-

ном мозге крыс на всех сроках отбора материала. Достоверное возрастание активности каспазы-3 отмечено в печени (на 48%) и почках (на 15%) крыс через 24 часа после введения CCl_4 .

Таблица 4

Активность каспазы-3 в тканях крыс после введения CCl_4

Активность каспазы-3, пмоль/мин/мг белка		Контроль	Доза CCl_4					
			0,08 мг/кг массы тела			0,48 мг/кг массы тела		
			6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Печень	$M \pm m$	23,07 ± 1,02	22,9 ± 1,08	24,38 ± 1,12	34,12 ± 1,27*	28,07 ± 0,92*	27,01 ± 1,09*	45,98 ± 0,87*
	<i>Min-Max</i>	19,15–27,43	17,0–25,0	22,0–29,0	26,0–39,0	24,0–33,0	24,0–34,0	37,0–51,0
Почки	$M \pm m$	8,89 ± 0,27	9,07 ± 0,41	9,31 ± 0,28	10,17 ± 0,49*	9,53 ± 0,44	9,89 ± 0,61	12,09 ± 0,34*
	<i>Min-Max</i>	7,24–10,08	8,13–10,15	8,15–10,85	9,22–10,67	9,03–10,83	8,78–10,78	11,06–12,97
Тимус	$M \pm m$	5,31 ± 0,19	5,21 ± 0,17	5,73 ± 0,29	5,87 ± 0,31	4,83 ± 0,25	5,01 ± 0,26	5,68 ± 0,32
	<i>Min-Max</i>	4,65–6,14	4,87–5,69	5,34–6,13	5,386,87–	4,07–6,00	4,14–5,89	4,78–6,12
Мозг	$M \pm m$	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,02
	<i>Min-Max</i>	0,06–0,08	0,07–0,09	0,07–0,10	0,07–0,12	0,07–0,09	0,06–0,09	0,09–0,12
Костный мозг	$M \pm m$	2,41 ± 0,12	2,38 ± 0,16	2,47 ± 0,24	2,51 ± 0,13	2,35 ± 0,24	2,28 ± 0,18	3,77 ± 0,29*
	<i>Min-Max</i>	2,12–2,87	1,87–2,67	2,19–2,88	2,31–2,79	2,15–2,69	2,08–2,67	2,95–4,78

Примечания: представлены средние данные ($M \pm m$) от $n = 10$;

* отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$.

После введения CCl_4 в дозе 0,48 мг/кг было отмечено достоверное увеличение активности каспазы-3 в печени (через 6 часов – на 21%, через 12 часов – на 17%, через 24 часа – на 99%), почках (через 24 часа – на 27%) и костном мозге (через 24 часа – на 60%). Изменений активности каспазы-3 в тимусе и головном мозге крыс не выявлено.

Как видно из табл. 5–6, характер изменений уровня фрагментации ДНК и индекса апоптоза в тканях крыс в целом соответствовал характеру изменений активности каспазы-3 (табл. 2), однако изменения уров-

ня фрагментации ДНК и индекса апоптоза проявлялись на более ранней стадии: после введения CCl_4 в дозе 0,08 мг/кг массы тела достоверное возрастание уровня фрагментации ДНК и индекса апоптоза отмечено в печени через 12 и 24 часа: на 28 и 29% и на 81 и 155% соответственно. Также отмечено возрастание индекса апоптоза в почках – на 87 и 60% через 12 и 24 часа соответственно. Не выявлено изменений уровня фрагментации ДНК в тимусе, почках, мозге и костном мозге, изменений индекса апоптоза – в тимусе, мозге и костном мозге.

Таблица 5

Уровень фрагментации ДНК в тканях крыс после введения CCl_4

Степень фрагментации ДНК, % ДНК		Контроль	Доза CCl_4					
			0,08 мг/кг массы тела			0,48 мг/кг массы тела		
			6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Печень	$M \pm m$	7,08 ± 0,15	7,34 ± 0,18	9,07 ± 0,23*	9,14 ± 0,14*	12,34 ± 0,28*	14,37 ± 0,23*	18,19 ± 0,44*
	<i>Min-Max</i>	6,28–7,78	6,58–7,91	8,51–9,77	8,44–9,67	11,83–12,69	13,48–14,98	17,25–19,08
Почки	$M \pm m$	7,32 ± 0,29	7,43 ± 0,21	7,29 ± 0,16	7,38 ± 0,21	7,69 ± 0,12	8,42 ± 0,24*	9,54 ± 0,25*
	<i>Min-Max</i>	7,02–7,91	7,08–7,99	6,87–7,73	6,91–7,85	7,03–8,09	8,04–8,93	9,01–10,07
Тимус	$M \pm m$	8,83 ± 0,21	8,71 ± 0,18	8,64 ± 0,15	8,89 ± 0,22	8,71 ± 0,18	8,64 ± 0,15	8,89 ± 0,22
	<i>Min-Max</i>	8,45–9,22	8,15–9,31	8,08–9,12	8,13–9,44	8,30–9,26	8,14–8,97	8,33–9,42
Мозг	$M \pm m$	5,34 ± 0,11	5,14 ± 0,09	5,21 ± 0,12	5,17 ± 0,08	5,14 ± 0,09	5,21 ± 0,12	5,17 ± 0,08
	<i>Min-Max</i>	5,06–5,61	4,87–5,35	4,85–5,89	5,07–5,59	4,87–5,47	4,73–5,81	4,71–5,66
Костный мозг	$M \pm m$	8,31 ± 0,24	8,24 ± 0,31	8,09 ± 0,18	8,16 ± 0,15	8,05 ± 0,17	9,24 ± 0,21*	9,88 ± 0,26*
	<i>Min-Max</i>	7,89–8,73	7,73–8,69	7,59–8,67	7,73–8,71	7,13–8,61	8,75–10,08	9,12–10,59

Примечания: представлены средние данные ($M \pm m$) от $n = 10$;

* отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$.

После введения CCl_4 в дозе 0,48 мг/кг было отмечено достоверное повышение уровня фрагментации ДНК и индекса апоптоза в печени (через 6 часов – на 74 и 82%, через 12 часов – на 102 и 190%, через 24 часа – на 156 и 189%), почках (через

12 часов – на 15 и 63%, через 24 часа – на 30 и 99%) и костном мозге (через 12 часов – на 11 и 14%, через 24 часа – на 19 и 22%). Изменений уровня фрагментации ДНК и индекса апоптоза в тимусе и мозге крыс не выявлено.

Таблица 6

Индекс апоптоза в тканях крыс после введения CCl_4

Индекс апоптоза, % ДНК		Контроль	Доза CCl_4					
			0,08 мг/кг массы тела			0,48 мг/кг массы тела		
			6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Печень	$M \pm m$	0,84 ± 0,05	0,98 ± 0,18	1,52 ± 0,23 *	2,15 ± 0,31 *	1,53 ± 0,24*	2,44 ± 0,54 *	2,43 ± 0,19 *
	<i>Min-Max</i>	0,75–1,03	0,78–1,24	1,14–1,87	1,69–2,54	1,28–1,79	2,04–3,19	1,98–2,87
Почки	$M \pm m$	1,12 ± 0,12	1,23 ± 0,14	2,09 ± 0,17 *	1,79 ± 0,26 *	1,19 ± 0,15	1,83 ± 0,11 *	2,23 ± 0,12 *
	<i>Min-Max</i>	0,92–1,34	1,07–1,43	1,78–2,34	1,51–2,13	0,98–1,44	1,48–2,08	2,01–2,51
Тимус	$M \pm m$	1,34 ± 0,14	1,23 ± 0,11	1,44 ± 0,17	1,34 ± 0,27	1,27 ± 0,15	1,33 ± 0,18	1,48 ± 0,19
	<i>Min-Max</i>	1,15–1,54	1,08–1,48	1,21–1,68	1,14–1,57	1,09–1,67	1,17–1,67	1,28–1,78
Мозг	$M \pm m$	0,59 ± 0,06	0,55 ± 0,04	0,65 ± 0,05	0,60 ± 0,10	0,61 ± 0,04	0,58 ± 0,03	0,64 ± 0,05
	<i>Min-Max</i>	0,48–0,67	0,42–0,64	0,53–0,78	0,51–0,74	0,48–0,72	0,46–0,71	0,53–0,73
Костный мозг	$M \pm m$	1,18 ± 0,15	1,09 ± 0,09	1,20 ± 0,12	1,15 ± 0,12	1,19 ± 0,15	1,34 ± 0,06*	1,48 ± 0,04*
	<i>Min-Max</i>	1,02–1,31	0,91–1,21	1,08–1,39	1,04–1,33	1,05–1,39	1,14–1,48	1,35–1,69

Примечания: представлены средние данные ($M \pm m$) от $n = 10$; * отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$.

Таким образом, моделирование токсического воздействия путем внутрибрюшинного введения CCl_4 приводит к увеличению активности апоптоза в печени, почках и костном мозге лабораторных животных, при этом динамика изменений активности каспазы-3, уровня фрагментации ДНК и индекса апоптоза имеет сходный характер: значения этих показателей возрастают постепенно, достигая максимума через 24 часа после введения CCl_4 . Динамика изменения содержания белков Bcl-2, Вах и р53 имеет иной характер, их содержание в печени начинает увеличиваться через 6 часов после введения CCl_4 , достигая максимальных значений через 12 часов и снижаясь через 24 часа. Следует отметить, что время реализации каждой стадии апоптоза не зависело от использованных доз воздействующего фактора: начало эффекторного этапа отмечено через 6 часов, максимальное развитие эффекторного этапа – через 12 часов, завершение эффекторного этапа и этап деструкции – через 24 часа. Полученные данные соответствуют современным представлениям о молекулярных механизмах регуляции апоптоза и времени реализации стадий апоптоза.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что показатели, ха-

рактеризующие завершающие этапы апоптоза, достигают максимальных значений через 24 часа, поэтому оптимальное время отбора образцов ткани для исследований данных показателей составляет 24 часа после однократного воздействия, при этом чувствительность изученных показателей снижается в ряду индекс апоптоза > уровень фрагментации ДНК > активность каспазы-3. Показатели, характеризующие начало эффекторного этапа апоптоза (содержание белков Bcl-2, Вах и р53), по чувствительности сопоставимы с показателем индекса апоптоза, однако оптимальное время отбора образцов тканей для регистрации содержания данных белков составляет 12 часов после однократного воздействия.

Результаты получены в рамках прикладных научных исследований на средства субсидии Минобрнауки России, предоставленной из федерального бюджета (Соглашение № 14.604.21.0142).

Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0142. Шифр лота 2014-14-576-0160 по теме: «Использование показателей активности апоптоза в качестве биомаркеров воздействия генно-инженерно-модифицированных организмов на здоровье млекопитающих».

Список литературы

1. Bilyy R., Stoika R. Search for novel cell surface markers of apoptotic cells // *Autoimmunity*. – 2007. – Vol. 40. – P. 249–53.
2. Brenner C., Marzo I., Kroemer G. A revolution in apoptosis: From a nucleocentric to a mitochondriocentric perspective // *Exp Gerontol.* – 1998. – Vol. 33. – P. 543–53.
3. Canbakan B., Senturk H., Canbakan M. et. al. Is alanine aminotransferase level a surrogate biomarker of hepatic apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease? // *Biomarkers in Medicine*. – 2010. – Vol. 4. – № 2. – P. 205–214.
4. Coutts S.M., Fulton N., Anderson R.A. Environmental toxicant-induced germ cell apoptosis in the human fetal testis // *Human Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – № 11. – P. 2912–2918.
5. Dick S.A., Megeney L.A. Cell death proteins: an evolutionary role in cellular adaptation before the advent of apoptosis // *Bioessays*. – 2013. – Vol. 35. – № 11. – P. 974–983.
6. Meier P., Finch A., Evan G. Apoptosis in development // *Nature*. – 2000. – Vol. 40. – № 6805. – P. 796–801.
7. Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology // *Toxicological Sciences*. – 2011. – № 119 (1). – P. 3–19.
8. Robertson J.D., Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2000. – Vol. 30. – № 5. – P. 609–627.
9. Stone A., Cowley M.J., Valdes-Mora F. et. al. BCL-2 hypermethylation is a potential biomarker of sensitivity to antimetabolic chemotherapy in endocrine-resistant breast cancer // *Mol. Cancer Ther.* – 2013. – Vol. 12. – № 9. – P. 1874–1875.

References

1. Bilyy R., Stoika R. Search for novel cell surface markers of apoptotic cells. *Autoimmunity*, 2007, Vol. 40, pp. 249–53.
2. Brenner C., Marzo I., Kroemer G. A revolution in apoptosis: From a nucleocentric to a mitochondriocentric perspective. *Exp Gerontol.*, 1998, Vol. 33, pp. 543–53.

3. Canbakan B., Senturk H., Canbakan M. et. al. Is alanine aminotransferase level a surrogate biomarker of hepatic apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease? *Biomarkers in Medicine*, 2010, Vol. 4, no. 2, pp. 205–214.

4. Coutts S.M., Fulton N., Anderson R.A. Environmental toxicant-induced germ cell apoptosis in the human fetal testis. *Human Reprod.*, 2007, Vol. 22, no. 11, pp. 2912–2918.

5. Dick S.A., Megeney L.A. Cell death proteins: an evolutionary role in cellular adaptation before the advent of apoptosis. *Bioessays*, 2013, Vol. 35, no. 11, pp. 97–983.

6. Meier P., Finch A., Evan G. Apoptosis in development. *Nature*, 2000, Vol. 40, no. 6805, pp. 796–801.

7. Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences*, 2011, 119 (1): 3–19.

8. Robertson J.D., Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2000, Vol. 30, no. 5, pp. 609–627.

9. Stone A., Cowley M.J., Valdes-Mora F. et. al. BCL-2 hypermethylation is a potential biomarker of sensitivity to antimetabolic chemotherapy in endocrine-resistant breast cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2013, Vol. 12, no. 9, pp. 1874–1875.

Рецензенты:

Ханферьян Р.А., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией спортивного питания с группой алиментарной патологии, ФГБНУ «НИИ питания», г. Москва;

Дурнев А.Д., д.м.н., профессор, руководитель лабораторий лекарственной токсикологии и фармакологии мутагенеза, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва.

Работа поступила в редакцию 06.11.2014.