

Т.М. Бризгіна, Н.В. Макогон, [Л.І. Алексюк], Т.В. Мартинова, С.І. Павлович, В.С. Сухіна,
Р.І. Янчій, [І.М. Алексєєва]

Шляхи та механізми загибелі імунікомпетентних клітин у динаміці експериментального імунного ушкодження печінки

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ

Ключові слова: КонА-гепатит, тимоцити, спленоцити, апоптоз, некроз.

У динаміці КонА-індукованого гепатиту вивчали апоптотичну та некротичну загибель клітин, виділених з тимуса та селезінки. Встановлено, що в тимоцитах зростання апоптозу відбувається раніше, ніж збільшення некрозу. В спленоцитах виявлено значне посилення некрозу в ранні строки дії КонА без суттєвих змін апоптозу. Інгібітор активації NF- κ B андрографолід зменшував як некротичну, так і апоптотичну загибель клітин тимуса й селезінки, викликану КонА. Це свідчить про участь NF- κ B у механізмі посилення загибелі імунікомпетентних клітин за умов КонА індукованого імунного гепатиту.

Пути и механизмы гибели иммунокомпетентных клеток в динамике экспериментального иммунного повреждения печени

Т.М. Брызгина, Н.В. Макогон, Л.И. Алексюк, Т.В. Мартынова, С.И. Павлович, В.С. Сухина, Р.И. Янчий, И.Н. Алексеева

В динамике КонА-индуцированного гепатита изучали апоптотическую и некротическую гибель клеток, выделенных из тимуса и селезенки. Установлено, что в тимоцитах усиление апоптоза происходит раньше, чем возрастание некроза. В спленоцитах выявлено значительное усиление некроза в ранние сроки действия КонА без существенных изменений апоптоза. Ингибитор активации NF- κ B андрографолід ослаблял как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток тимуса и селезенки, вызванную КонА. Это свидетельствует об участии NF- κ B в механизме усиления клеточной гибели в условиях КонА-индуцированного иммунного гепатита.

Ключевые слова: КонА-гепатит, тимоциты, спленоциты, апоптоз, некроз.

Патология. – 2011. – Т.8, №2. – С. 108–110

The pathways and mechanisms of immune cell death in the time course of experimental immune-mediated liver injury

Т.М. Bryzgina, N.V. Makogon, L.I. Alexyuk, T.V. Martynova, S.I. Pavlovich, V.S. Sukhina, R.I. Yanchiy, I.M. Alexeyeva

In this work the apoptotic and necrotic death of cells isolated from primary and secondary lymphoid organs during the course of ConA hepatitis in mice has been investigated. Experiments showed the differences in the pathways of cell death of thymic and splenic lymphocytes. Elevation of apoptosis has been observed earlier than the increase in necrosis in the cells isolated from thymus. A significant increase in necrosis of splenocytes occurred early after ConA treatment, however elevation in the number of apoptotic spleen cells has not been established. Treatment of mice with inhibitor of NF- κ B andrographolide resulted in decrease in both necrosis and apoptosis, induced by ConA. These results suggest a role of NF- κ B in induction of immune cells death during Con A-induced immune hepatitis.

Key words: Concanavalin A-hepatitis, thymocytes, splenocytes, apoptosis, necrosis.

Pathologia. 2011; 8(2): 108–110

Експериментальна модель конканавалін-А (КонА) індукованого гепатиту широко використовується для вивчення ушкодження печінки, опосередкованого імунними механізмами Т-клітинного генезу [1]. При введенні мишам поліклонального активатора Т-клітин мітогену КонА відтворюється ряд характерних рис, властивих для захворювань печінки людини. Зокрема, це стосується клітин, задіяних в ініціації та посиленні запалення (CD4+ Т-лімфоцити, природні кілери Т-клітини, клітини Купфера, нейтрофіли тощо), їх активації та інфільтрації [1,2]. Останнім часом активно вивчається участь різних шляхів клітинної смерті в етіопатогенезі захворювань, однак загибель імунікомпетентних клітин (ІКК) за умов КонА-індукованого ушкодження печінки вивчена недостатньо. Більшість дослідників нині визначають пасивну клітинну загибель (некроз) та активну, програмовану смерть клітин за кількома різними шляхами (апоптоз, апоптозоподібна загибель, некрозоподібна загибель, аутофагія тощо). Некроз, найважливішими рисами якого є втрата цілісності плазматичної мембрани

і вихід клітинного вмісту в тканини, запускає і поглиблює запальні процеси, може призводити до формування імунних реакцій відносно раніше прихованих власних внутрішньоклітинних антигенів [3]. У результаті некрозу лейкоцитів, що інфільтрують вогнище запалення, має місце вихід значної кількості біологічно активних та ушкоджуючих тканини молекул, що, посилюють інфільтрацію і запалення. Апоптотична загибель – більш фізіологічний шлях елімінації клітин, ніж некроз. Однак як надмірне посилення, так і послаблення апоптозу ІКК ведуть до порушення гомеостазу (імунідефіцитні стани, аутоімунні патології) [4,5]. Отримано дані про зміни загибелі лейкоцитів як при захворюваннях печінки різного генезу, так і при їх моделюванні на тваринах [2,6,7,8]. Встановлено, що за умов КонА-гепатиту посилюється загибель активованих клітин природного й адаптивного імунітету в печінці і в імунікомпетентних органах [1,2,8]. Однак шляхи клітинної загибелі практично не вивчені, особливо на початкових етапах розвитку імунного КонА-опосередкованого ушкодження печінки.

Мета роботи

Вивчити загибель клітин первинного та вторинного органів імунної системи мишей (тимуса і селезінки) за апоптотичним та некротичним шляхами в динаміці гострого імунного ушкодження печінки, викликаного КонА.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведені на статевозрілих самцях мишей лінії СВА. При роботі дотримувались положень Європейської конвенції щодо захисту хребтних тварин, яких використовують з експериментальною метою (Страсбург, 1986). Модель імунного гепатиту відтворювали шляхом введення в хвостову вену мишей КонА («Sigma») в дозі 25 мг/кг, контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин. Через 2, 6, 12, 20 і 48 год клітини тимуса і селезінки виділяли за загальноприйнятою методикою механічної дисоціації з наступним гіпотонічним лізисом еритроцитів. Більшість клітин (близько 90%) в отриманих суспензіях становили лімфоцити, як було визначено при їх забарвленні за Папенгеймом. Дослідження дії андрогрофоліду (100 мг/кг), введеного внутрішньоочеревинно за 2 год до КонА, проводили через 20 год.

Апоптоз і некроз виділених клітин визначали при їх прижиттєвому подвійному забарвленні флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 і йодид пропідіуму [9]. Останній проникає тільки в клітини з ушкодженими мембранами, що дає можливість визначити некротичні клітини. Хехст 33342 проникає і через неушкоджені мембрани. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні риси ядерного матеріалу, притаманні апоптозу. Використовували відеосистему передачі зображення з люмінесцентного мікроскопа «Люмам І-1» (водно-імерсійний об'єктив x85) на комп'ютер. Визначали % живих, некротичних, апоптотичних і вторинно-некротичних клітин при підрахунку не менше 200 клітин. Статистичну обробку даних проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим порівнянням середніх значень між групами за тестом Ньюмена-Кейлса з використанням програми STATISTICA-6. Перед статистичним аналізом до всіх даних застосовували арксинус-перетворення за Фішером. Дані представлено як $M \pm SD$ (середнє значення \pm стандартне відхилення). $P < 0,05$ вважалось статистично вірогідним.

Результати та їх обговорення

Введення поліклонального активатора Т-клітин КонА спричинює ураження печінки [1,2,6,8], максимально виражене через 12–20 год. При його розвитку спостерігалось поступове зменшення відсотка живих клітин у суспензіях, виділених як з тимуса, так і з селезінки (рис. 1). У первинному органі імунітету – тимусі – відзначено посилення апоптозу (вже через 2 год після введення КонА, з максимумом на 12 год), тоді як в селезінці статистично значимого збільшення апоптозу не виявлено (рис. 2А). Інші зміни спостерігались у динаміці некрозу клітин первинного і вторинного органів імунної системи мишей. Виявлено раннє (вже через 6 год після введення

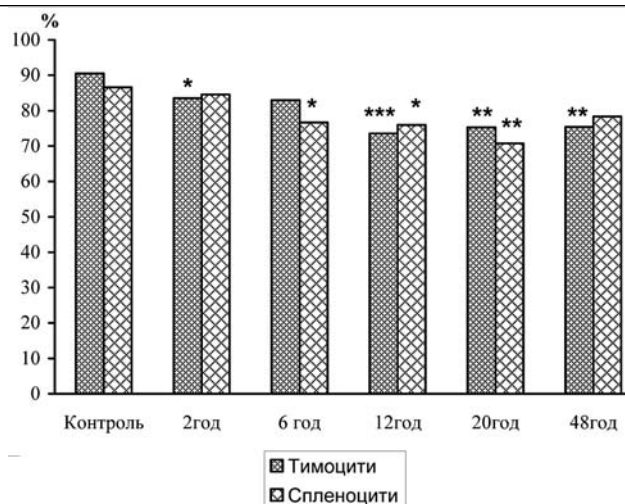


Рис. 1. Відсоток живих клітин, виділених з тимуса і селезінки, в динаміці КонА-індукованого гепатиту. * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ відносно контролю.

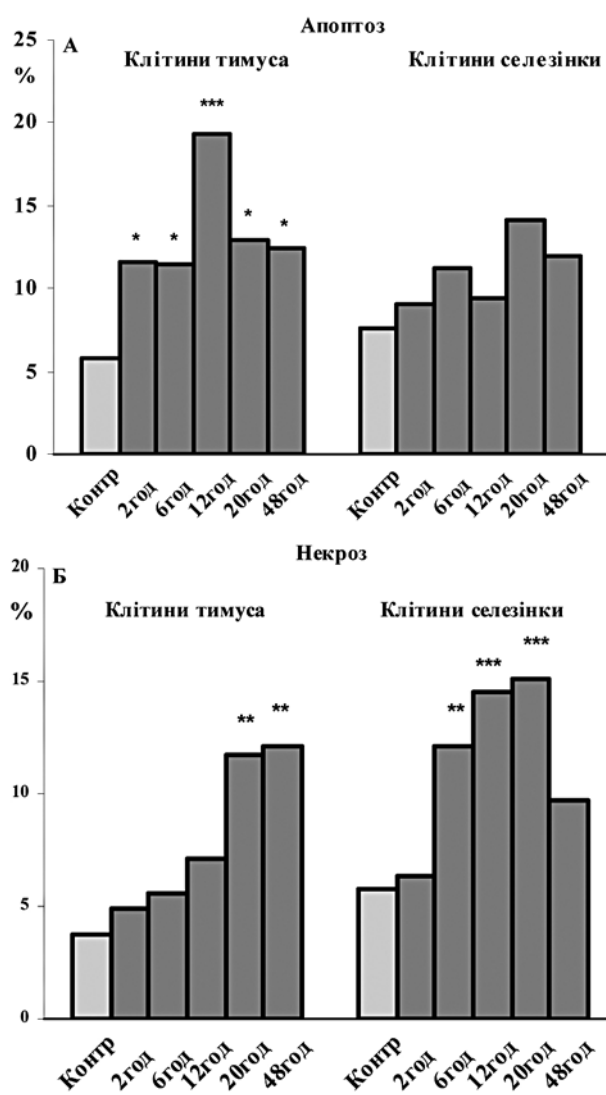


Рис. 2. Апоптоз (А) і некроз (Б) клітин, виділених з тимуса і селезінки, в динаміці КонА-індукованого гепатиту. За віссю ординат – відсоток клітин з морфологічними проявами апоптозу або некрозу. * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ відносно контролю.

КонА) посилення некротичної загибелі спленоцитів, тоді як статистично значуще підвищення некрозу тимоцитів відзначалось лише з 20 год (рис. 2 Б).

Клітини вторинних лімфоїдних органів, периферичної крові й інфільтратів здебільшого підлягають дії прозапальних і пронекротичних факторів, що виділяються у пошкодженому органі та в крові. Це спостерігали при дослідженні клітин селезінки, коли некроз посилювався в ранні строки, ще до настання виражених морфологічних проявів ураження паренхіми печінки.

На різних стадіях апоптозу може відбутись втрата цілісності плазматичної мембрани, що нині визначається як вторинний постапоптотичний некроз [3]. Виявлено збільшення відносної кількості вториннонекротичних клітин селезінки (з апоптотичними змінами ядер та ушкодженою плазматичною мембраною) з $1,4 \pm 0,81\%$ у контролі до $3,8 \pm 2,0$ через 20 год після введення КонА, $P < 0,05$. Останнім часом вторинний постапоптотичний некроз, при якому також відбувається вихід клітинного вмісту назовні, розглядається як важливий патогенетичний механізм розвитку запалення.

З метою з'ясування окремих механізмів посилення клітинної загибелі застосовували інгібітор активації ядерного транскрипційного фактора NF- κ B андрографолід (Анд) [10]. Введення Анд послаблювало клітинну загибель, спричинену КонА. Апоптоз тимоцитів зменшувався з $12,9 \pm 4,7\%$ при введенні КонА до $2,4 \pm 1,4\%$ при дії Анд, $P < 0,001$ (контроль – $5,8 \pm 3,8\%$), а апоптоз спленоцитів – з $14,1 \pm 6,8\%$ при введенні КонА до $7,6 \pm 2,7\%$, $P < 0,05$ (контроль – $7,7 \pm 3,0\%$). Подібні результати отримали при дослідженні некротичної загибелі: некроз тимоцитів зменшувався з $11,8 \pm 5,6\%$ при введенні КонА до $4,7 \pm 1,8\%$ при дії Анд, $P < 0,01$ (контроль – $3,7 \pm 1,9\%$), а некроз спленоцитів – з $15,1 \pm 5,3\%$ при введенні КонА до $9,4 \pm 2,2\%$, $P < 0,01$ (контроль – $5,6 \pm 0,8\%$). Раніше встановлено, що інший інгібітор активації NF- κ B куркумін також зменшував викидану КонА загибель ІКК [6]. Узагальнюючи отримані дані, можна вважати, що в посиленні як апоптотичної, так і некротичної загибелі ІКК за умов розвитку гострого запального процесу в печінці, викликаного введенням поліклонального активатора Т-клітин КонА, задіяні NF- κ B-опосередковані механізми.

Висновки

1. Встановлено, що в динаміці розвитку КонА-індукованого гепатиту відбувається посилення клітинної загибелі і зменшення кількості живих клітин, виділених з тимуса і селезінки.

2. Виявлено різну динаміку посилення загибелі клітин первинного і вторинного органів імунної системи: в клітинах тимуса зростання апоптозу відбувається раніше, ніж збільшення некрозу. В клітинах селезінки встановлено раннє посилення некрозу без суттєвого зростання апоптозу.

3. Інгібітор активації NF- κ B андрографолід зменшував КонА-індуковану як некротичну, так і апоптотичну загибель клітин тимуса і селезінки. Це свідчить про NF- κ B-опосередкований механізм посилення клітинної загибелі за умов експериментального імунного гепатиту Т-клітинного генезу.

Література

1. *Tiegs G.* Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury / G. Tiegs // *Z. Gastroenterol.* – 2007. – V. 45, №1. – P. 63–70.
2. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis / K. Takeda, Y. Hayakawa, L. Van Kaer [et al.] // *PNAS.* – 2000. – V. 97, №10. – P. 5498–5503.
3. *Silva M.* Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications/ M. Silva., A. do Vale, N. dos Santos // *Apoptosis.* – 2008. – V. 13. – P. 463–482.
4. *Maniati E.* Control of apoptosis in autoimmunity / E. Maniati, P. Potter, P. Rogers // *J. Pathol.* – 2008. – V. 214. – P. 190–198.
5. *Чередеев А.Н.* Патогенетический принцип оценки иммунной системы человека: современные проблемы / А.Н. Чередеев, Л.В. Ковальчук // *Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии: Сб. трудов 1-й нац. конф. Росс. асоц. аллергологов и клинических иммунологов.* – 1997. – С. 74–80.
6. Влияние на экспериментальную иммунную патологию печени ингибитора активации ядерного транскрипционного фактора κ B-куркумина / И.Н. Алексеева, Н.В. Макогон, С.И. Павлович [и др.] // *Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* – 2010. – Т. 20, №1. – С. 38–43.
7. Апоптоз периферических лейкоцитов при хронических вирусных гепатитах / А.О. Буеверов, Е.В. Тихонина, Е.Ю. Москалева [и др.] // *Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* – 2000. – №6. – С. 30–33.
8. Проліферація та загибель мононуклеарних клітин печінки мишей за умов її імунного ураження, викликаного введенням конканаваліну А або протипечінкових антитіл / Н.В. Макогон, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна [та ін.] // *Фізіол. журн.* – 2008. – Т. 54, №6. – С. 49–57.
9. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes / S. Shimizu, Y. Eguchi, W. Kamiike [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1996. – V. 271, №6. – P. 949–958.
10. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF- κ B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50 / Y-F. Xia, B. Ye, Y-D. Li [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173. – P. 4207–4217.

Відомості про авторів:

Бризгіна, Т.М., к. мед. н., ст. науковий співробітник, відділ імунології та цитотоксичних сироваток.

Макогон Н.В., к. біол. н., провідний науковий співробітник, відділ імунології та цитотоксичних сироваток.

Алексюк Л.І., к. біол. н., ст. науковий співробітник, відділ імунології та цитотоксичних сироваток.

Мартинова Т.В., к. біол. н., ст. науковий співробітник, відділ імунології та цитотоксичних сироваток.

Павлович С.І., к. біол. н., ст. науковий співробітник, відділ імунології та цитотоксичних сироваток.

Сухіна В.С., науковий співробітник, відділ імунології та цитотоксичних сироваток.

Янчій Р.І., д. біол. н., зав. відділу імунології та цитотоксичних сироваток.

Алексєєва І.М., д. біол. н.

Адреса для листування:

Бризгіна Тетяна Михайлівна. 01601, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

Тел.: 050 358 55 16. E-mail: tas@biph.kiev.ua