

Т.В. Мартинова, Л.І. Алексюк

Функціональна активність перитонеальних макрофагів при ураженні печінки мишей конканаваліном А

У мишей линии СВА конканаваліном А (КонА) вызывали гепатит Т-клеточного генеза, который является моделью аутоиммунного поражения печени у человека. Поражение печени контролировали по активности индикаторных ферментов (аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы) и щелочной фосфатазы в сыворотке крови животных. Исследовали функциональную активность макрофагов перитонеального экссудата по фагоцитозу частиц латекса и кислородзависимому метаболизму (тест с нитросиним тетразолием). Установлено, что однократное введение КонА в дозе 15 и 30 мг/кг через 20 ч вызывало острое поражение печени, которое сопровождалось ослаблением функциональной активности макрофагов – снижением фагоцитоза частиц латекса и кислородзависимого метаболизма. Ослабление функциональной активности макрофагов может быть одной из причин снижения элиминации погибших клеток при иммунном гепатите, поддержания воспалительной реакции и развития аутоиммунного процесса.

ВСТУП

За останнє десятиліття значно поглибилися знання щодо патогенезу захворювань печінки з аутоімунним компонентом. Але багато питань відносно механізмів розвитку патологічного процесу та його прогресування залишаються відкритими. Порушення в системному імунитеті: послаблення імунологічного нагляду, зниження функціональної активності імунокомпетентних клітин – це шляхи до посилення та хронізації патологічного процесу, зокрема в печінці. Для дослідження механізмів патогенезу аутоімунних станів печінки найбільш часто використовують модель аутоімунного гепатиту у мишей – застосування Т-клітинного мітогена – конканаваліну А (КонА) [17, 21]. Відомо, що у перші години після ін'єкції КонА відбувається активація Т-лімфоцитів і макрофагів, які накопичуються переважно в печінці завдяки особливостям її кровопостачання. Ці клітини продукують

низку цитокінів (TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α , IL-1,6) [16, 18, 24]. Останні викликають апоптоз і некроз гепатоцитів [22, 23]. Через 24 год після введення КонА у селезінці мишей генеруються нормальні кілери та цитотоксичні Т-лімфоцити. У динаміці КонА-індукованого гепатиту спостерігали збільшення акцидентальної інволюції тимуса, спустошення Т-клітинних ділянок у селезінці, інтенсивну міграцію активованих лімфоцитів у печінку та бар'єрні тканини [9, 16]. Фагоцитоз апоптотично загинувих клітин запобігає поширенню аутоімунізації внаслідок елімінації видозмінених під час апоптозу власних антигенів. Розвиток аутоімунного процесу пов'язують також з недостатністю елімінації Т-лімфоцитів, що інфільтрують печінку [25]. Показано, що поглинальна здатність фагоцитів може бути порушена при деяких аутоімунних та інфекційних захворюваннях [15, 20]. Однак стан макрофагів після розвитку процесу ураження печінки досліджений недостатньо.

© Т.В. Мартинова, Л.І. Алексюк

Мета нашої роботи – вивчення фагоцитарної активності та киснезалежного метаболізму перитонеальних макрофагів при ураженні печінки мишей Кона.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 56 мишах-самцях лінії СВА, масою 18–22 г з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Моделювання імунного гепатиту. За даними літератури [22], одноразова внутрішньовенна ін'єкція мишам Кона викликає ураження печінки з помітним підвищенням активності трансаміназ у межах 24 год. Для моделювання гепатиту мишам дослідної групи вводили Кона ("Sigma", США) одноразово внутрішньовенно у дозі 15 і 30 мг/кг, який розводили в 500 мкл фізіологічного розчину [19]. Контрольним тваринам замість Кона вводили фізіологічний розчин. Через 20 год після введення препарату мишей декапітували під легким ефірним наркозом.

Ураження печінки контролювали за активністю індикаторних ферментів аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ), а також лужної фосфатази, які визначали у сироватці крові мишей загальноживаними методами [5]. Крім того, визначали коефіцієнт де Рітца (АсАТ/АлАТ) [10].

Об'єктом дослідження були макрофаги перитонеального ексудату. Останній отримували за описаним методом [4]. Крім макрофагів (25–30 %) перитонеальний ексудат містив лімфоцити (69–74 %) та гранулоцити (1 %).

Визначення фагоцитозу. Фагоцитоз за поглинанням часток латексу визначали за описаним методом [12] з деякими модифікаціями. Його проводили на предметних скельцях, які попередньо знежирювали та знезаражували у суміші Нікіфорова. Смужки з Parafilm "M" ("American National Can., Sigma", США) з двома паралельними отво-

рами діаметром 10 мм накладали на скельця. Після прикріплення Parafilm "M" вносили суспензію клітин перитонеального ексудату (кінцева концентрація $1 \cdot 10^6$ в об'ємі 100 мкл) до лунок. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою ніж 98 %. Предметні скельця з нанесеною суспензією клітин розміщували у чашках Петрі та витримували для адгезії макрофагів упродовж години при 37°C. Далі клітини, що не адгезували, змивали фосфатним буфером (рН 7,4). До лунок з клітинами вносили по 100 мкл середовища RPMI-1640 ("Sigma", США) і додавали по 50 мкл 1%-го латексу. У дослідах використовували латекс для фагоцитозу (10%-на полістиролова суспензія, діаметр латексних часток 1,5 мкм, "ПанЕко", Росія). Клітини культивували з латексом протягом години при 37°C. Потім лунки з клітинами знову промивали від латексу, сушили, фіксували етиловим спиртом (96%) і фарбували азур-еозіном за Романовським. Під світловим мікроскопом (об. 100x ок.12,5) підраховували 100 макрофагів. Розраховували фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток макрофагів, які поглинули частки латексу, від загального їх числа; фагоцитарне число (ФЧ) Райта – середнє число часток латексу, поглинуте одним макрофагом.

Визначення киснезалежного метаболізму макрофагів за тестом з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест). Тест заснований на здатності практично безбарвного індикатора нітросинього тетразолію відновлюватися до темно-синього формазану під впливом активних форм кисню, продукованих активними фагоцитами [14]. Киснезалежний метаболізм макрофагів визначали у двох варіантах НСТ-тесту (спонтанному та індукованому форбол-міростат-ацетатом, який є активатором протеїнкінази С) [6, 8, 14]. Готували мазки з клітинами перитонеального ексудату, фарбували квасцевим карміном. Під світловим мікроскопом (об.100x ок.12,5) підраховували 100 макро-

фагів, серед яких були клітини з фіолетовими масивними відкладеннями формазану (НСТ-позитивні клітини), підраховували їх відсоток. Розраховували додатковий показник – індекс активації(в умовних одиницях) [2].

Статистичну обробку результатів проводили за методом різниць з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показали, що через 20 год після застосування КонА в сироватці крові дослідних мишей зростала активність трансаміназ (рис.1). КонА викликав ушкодження печінки цитолітичного характеру, на що вказує різке підвищення вмісту АлАТ (при меншій дозі КонА – 15 мг/кг в 2,2 раза відносно контролю та в 2,4 раза при більшій дозі – 30 мг/кг) у сироватці крові. Слід відмітити, що КонА в дозі 30мг/кг був високотоксичним для деяких тварин і викликав їх загибель. Активність АсАТ теж була збільшеною в 1,3 раза при обох застосованих дозах. Однак така зміна не

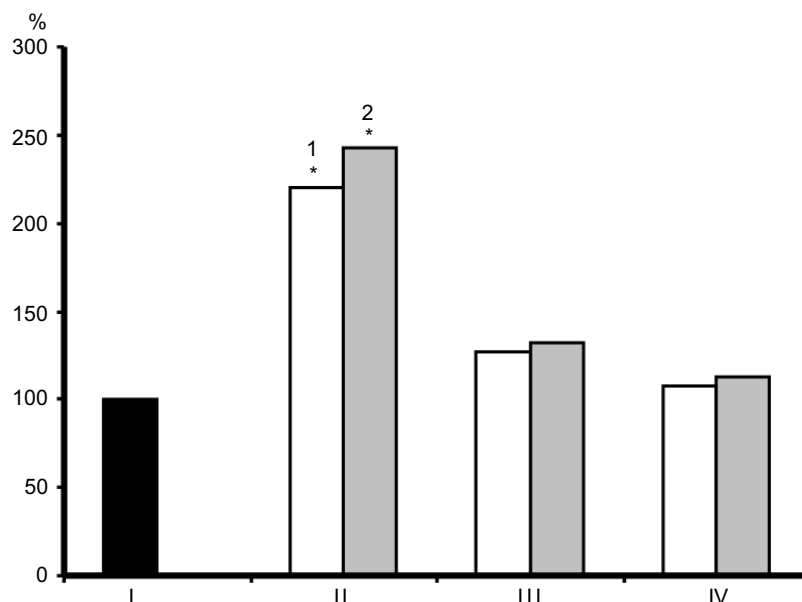


Рис. 1. Зміни активності ферментів у сироватці крові мишей під впливом конканаваліну А різної концентрації: 1 – 15 мг/кг; 2 – 30 мг/кг; I – контроль; II – аланінамінотрансфераза; III – аспаргатамінотрансфераза; IV – лужна фосфатаза; $P < 0,001$ відносно контролю

була вірогідною. Отримані результати узгоджуються з даними літератури [10], що при гострих процесах у печінці активність АлАТ підвищується набагато сильніше, ніж АсАТ. Крім того, підрахований коефіцієнт де Рітіса, який був нижчим за одиницю і дорівнював при меншій дозі КонА – 0,62 та при більшій дозі КонА – 0,58, характеризував ступінь пошкодження гепатоцитів при різних концентраціях КонА. У сучасній літературі є повідомлення [9], що і більш низька доза КонА викликала у мишей підвищення в сироватці крові активності АлАТ та АсАТ, і це підтверджує морфологічні ознаки альтерації гепатоцитів. Дослідження ще одного ферменту – лужної фосфатази, яка є відображенням зміненої проникності клітинних мембран, показали, що КонА в обох використаних дозах 15 і 30 мг/кг викликав несуттєве підвищення її активності відносно контролю (на 7 та 13 % відповідно).

За цих умов функціональна активність перитонеальних макрофагів за даними фагоцитозу латексних часток вірогідно знижувалася (рис. 2). Так, ФІ знизився на 17 % (при дозі КонА 15мг/кг) та на 19 % (при дозі КонА 30мг/кг) від контролю, при цьому ФЧ теж було зменшене на 25 та 17 % відповідно.

Фагоцитарна активність макрофагів та їх киснезалежний метаболізм тісно пов'язані. Відомо, що фагоцитоз, який здійснюється за допомогою лізосомальних ферментів, супроводжується “респіраторним або метаболічним вибухом”, тобто

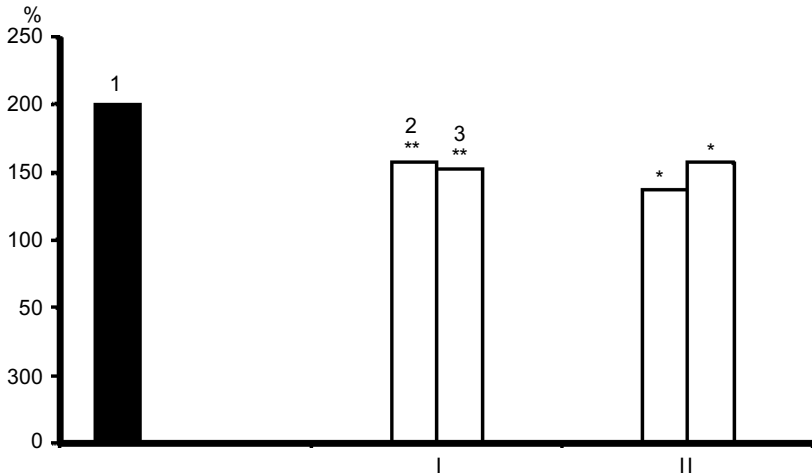


Рис. 2. Вплив конканаваліну А (КонА) на фагоцитоз латексних часток макрофагами перитонеального ексудату мишей: I – фагоцитарний індекс; II – фагоцитарне число; 1 – контроль; 2, 3 – КонА (15 та 30 мг/кг відповідно). *P<0,01; **P<0,001 відносно контролю

утворенням активних форм кисню [13]. Для оцінки цього “вибуху” використовують цитохімічний тест відновлення нітросинього тетразолію [6]. У цілому НСТ-тест відображує ступінь активації киснезалежного метаболізму, перш за все функцію гексозомонофосфатного шунта та пов’язану з ним продукцію вільних радикалів. НАДФН – оксидазний комплекс який локалізується у плазматичній мембрані і за фагоцитозу разом з нею інвагується всередину клітини. Саме тому активація, що пов’язана з поглинанням, супроводжується внутрішньофагосомним відновленням НСТ. Однак при стимуляції розчиненими антигенами фагосом не утворюються і формазан відкладається на плазматичній мемб-

рані. Відомо, що можливе пригнічення поглинання при збереженні нормальної здатності до відновлення НСТ [7].

У наших дослідженнях було встановлено, що КонА послаблював киснезалежний метаболізм макрофагів (рис. 3). При меншій дозі КонА у спонтанному варіанті НСТ-тесту, який відображує ступінь функціонального подразнення фагоцитів in

vivo, це послаблення є несуттєвим. Так, індекс активації знижувався тільки на 9 % у порівнянні з контролем. Водночас в індукованому варіанті НСТ-тесту спостерігали більше послаблення метаболізму. Обидва показники, які підраховувалися

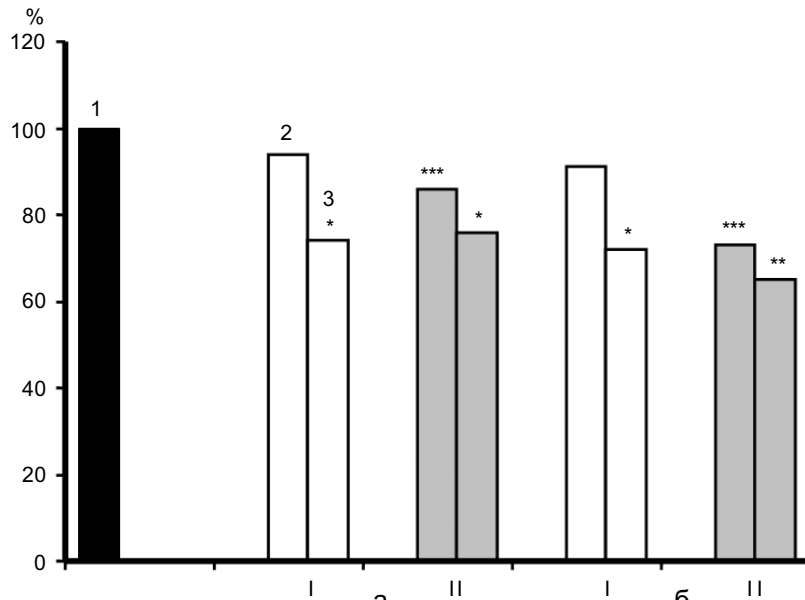


Рис. 3. Вплив конканаваліну А (КонА) на відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) у перитонеальних макрофагах мишей: а – кількість НСТ-позитивних клітин; б – індекс активації; I – спонтанний варіант НСТ-тесту; II – індукований варіант НСТ-тесту; 1 – контроль; 2, 3 – КонА (15 та 30 мг/кг відповідно). * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 відносно контролю

(відсоток позитивних клітин та індекс активації) вірогідно відображали цей процес: кількість позитивних клітин, що містять зерна формазану зменшувалася на 14 % ($P < 0,001$) щодо контролю, а індекс активації зменшився на 27 % ($P < 0,001$) відносно контролю. Отже, вивчення фагоцитів при стимуляції їх внутрішньоклітинного метаболізму (в наших дослідах це варіант тесту з форбол-міристат-ацетатом, який стимулює споживання кисню через гексозомонофосфатний шунт, відновлення НСТ, збільшення продукування H_2O_2) дає змогу оцінювати потенціальний ресурс і дефекти системи фагоцитозу. Використання більшої дози КонА призвело до вірогідного зменшення значень усіх показників киснезалежного метаболізму макрофагів: відсоток позитивних клітин у спонтанному варіанті тесту знизився на 26 % і в індукованому на 24 % відносно контролю, при цьому індекс активації зменшився на 28 та 35 % відповідно.

Одержані результати свідчать про те, що гострий гепатит у мишей, викликаний введенням Т-клітинного мітогена КонА, супроводжується послабленням функціональної активності перитонеальних макрофагів за даними фагоцитарної активності та киснезалежного метаболізму. Важливо те, що підвищення ступеня ураження печінки при збільшенні дози КонА супроводжується поглибленням порушень функціональної активності макрофагів. Послаблення активності макрофагів може бути викликане як впливом мітогена безпосередньо на ці клітини, так і опосередковано через порушення функціонального стану печінки. Є дані про те, що в культурі лімфоцитів КонА знижує активність лізосомальних гідролаз, а використання його у великих дозах викликає загибель лімфоцитів [3]. При аутоімунних станах відмічають зміни лізосомальних ферментів, які безпосередньо пов'язані з процесами імуногенезу і розвитком аутоімунних феноменів [11].

Роль макрофагів у розвитку імунного гепатиту як і всіх імунних реакцій, безумовно, пов'язана і з іншими їх функціями, крім фагоцитозу та респіраторного вибуху, в тому числі з антигенпрезентуючою функцією. Численні дані літератури свідчать про те, що при патології печінки знижується імунологічна реактивність за різними показниками [1], що є наслідком порушення метаболічних процесів у печінці. Разом з цим послаблення функції макрофагів може бути причиною зниження елімінації загиблих клітин при імунному гепатиті, що підтримує запальну реакцію та сприяє розвитку аутоімунного процесу.

T.V. Martynova, L.I. Alexyuk

FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES AT CONCANAVALIN A - INDUCED HEPATITIS IN MICE

Hepatitis of T-cell genesis, a model of autoimmune damage of human liver, was caused in mice of CBA line by concanavalin A (Con A). The damage of liver was examined by activities of transaminases (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase) and alkaline phosphatase in mice blood plasma. Functional activity of macrophages in peritoneal fluid was studied by examination of phagocytosis of latex particles and oxygen - dependent metabolism (nitro-blue-tetrazolium-test). We demonstrated that a single intravenous injection of Con A in different doses (15 and 30 mg/kg of body weight) caused acute hepatic damage in 20 hours. Weakening of macrophage functional activities may be one of the reasons of decrease in dead cells elimination following induction of immune hepatitis, it may support inflammatory reaction and promote the development of autoimmune process.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеева И.Н., Брызгина Т.М., Павлович С.И., Ильчевич Н.В. Печень и иммунологическая реактивность. – К.: Наук. думка, 1991. – 168 с.
2. Алексеева И.М., Брызгина Т.М., Алексюк Л.І. та ін. Роль оксиду азоту в розвитку гуморальної імунної відповіді у мишей // Фізіол. журн. – 2005. – 51, № 4. – С.13–19.
3. Дрожеников В.А., Ляшенко В.А., Сургай В.В. та ін. Динамика активности лизосомальных гидролаз лимфоцитов мыши при действии конканавалина А //

- Иммунология. – 1984. – № 4. – С.19–22.
4. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – С.367–369
 5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
 6. Маянский А.Н., Виксман М.Е., Котельников П.Н., Молчанова И.В. Характеристика функциональной активности нейтрофилов крови человека с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия // Журн. микробиологии. – 1977. – №6. – С.108–111.
 7. Маянский А.Н. Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. – Новосибирск: Наука, 1989. – 344 с.
 8. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики. – Минск: Беларусь, 1979. – 223 с.
 9. Обернихин С.С., Макарова О.В., Малайцев В.В. и др. Динамика морфофункциональных изменений органов иммунной системы мышей BALB/c при экспериментальном гепатите // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2006. – 141, № 4. – С.451–454.
 10. Островский А.Г., Карашуров Е.С. Функции печени при заболеваниях органов пищеварения. – Петрозаводск, 1982. – 112 с.
 11. Робинсон М.В., Топорков Л.Б., Труфакин В.А. Морфология и метаболизм лимфоцитов. – Новосибирск: Наука, 1986. – 126 с.
 12. Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения: Метод. рекомендации // Киевский НИИ фтизиатрии и пульмонологии. – К., 1988. – 18 с.
 13. Хаитов Р.В., Пинегин Б.В. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса // Иммунология. – 1995. – № 4. – С.3–8.
 14. Шубич М.Г., Медникова В.Г. NST –тест у детей в норме и при гнойно-бактериальных инфекциях // Лаб. дело. – 1978, №9. – С.515–518.
 15. Jirillo E., Caccavo D., Magrone T. et al. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings // J. Endotoxin Res. – 2002, 8(5). – P.319–327.
 16. Mivagi T., Takehara T., Tatsumi T. et al. Concanavalin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver // Hepatology. – 2004, 40(5). – P.1190–1196.
 17. Mizuhara H., O'Neill E., Seki N. et al. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6 // J. Exp. Med. – 1994, 179(5). – P.1592–1537.
 18. Okamoto S., Yokohama S., Yoneda M. et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha plays a crucial role in concanavalin A-induced liver injury through induction of proinflammatory cytokines in mice // Hepatol. Res. – 2005, 32(1). – P. 38–45.
 19. Okamoto T., Nakano Y., Asakura W. et al. Expression of cytokine mRNA in extrahepatic organs in a mouse concanavalin A – hepatitis model // Jap. J. Pharmacol. – 1998, 77(3). – P. 219–225.
 20. Salmon J.E., Kimberly R.P., Gibofsky A., Fotino M. Altered phagocytosis by monocytes from HLA-DR2 and DR3-positive healthy adults is Fc gamma receptor specific // J. Immunol. – 1986, 136(10). – P.3625–3630.
 21. Tieges G., Hentschel J., Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A // J. Clin. Invest. – 1992, 90(1). – P.196–203.
 22. Tieges G. Experimental hepatitis and role of cytokines // Acta Gastroenterol. Belg. – 1997, 60(2). – P.176–179.
 23. Trautwein C., Rakermann T., Malek N.P. et al. Concanavalin A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation // J. Clin. Invest. – 1998, 101(9). – P.1960–1969.
 24. Wolf D., Hallmann R., Sass G. et al. TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1-relevance for concanavalin A-induced hepatitis // J. Immunol. – 2001, 166(2). – P.1300–1307.
 25. Zhan H.G., Mountz J.D., Fleck M. et al. Specific deletion of autoreactive T cells by adenovirus transfected, Fas ligand producing antigen presenting cells // Immunol. Res. – 2002, 26(1–3). – P.235–246.

Матеріал надійшов до редакції 19.04.2007

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