

Морфологічні зміни у печінці мишей за умов конканавалін А-індукованого гепатиту

С.І. Павлович, Н.В. Макогон, Н.Г. Грушка, Т.М. Бризгіна, Р.І. Янчій

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: spavl@biph.kiev.ua

Вивчали пошкодження тканини печінки, її інфільтрацію клітинами природного та адаптивного імунітету в динаміці конканавалін А (КонА)-індукованого гепатиту у мишей. Використовували напівкількісний метод оцінки пошкодження судинного русла і паренхіми, досліджували лейкоцитарну інфільтрацію печінки і клітинний склад інфільтратів. Первинна реакція печінки на введення КонА полягала у змінах запального характеру в судинному руслі, за якими слідували порушення в паренхімі. Виявлено значне посилення міграції лейкоцитів у печінку, причому спочатку зростала нейтрофільна інфільтрація з максимумом на 6-ту годину експерименту ($63,9 \pm 4,6\%$, $P < 0,001$ до рівня контролю) і лише потім – лімфоцитарна з утворенням багатоклітинних лімфоцитарно-макрофагальних інфільтратів (62% через 48 год порівняно з 6-годинним експериментом) з істотною кількістю плазматичних клітин (4,9%, $P < 0,05$ порівняно з 6-годинним експериментом). Отримані результати дають підставу припускати, що посилена інфільтрація тканини печінки лейкоцитами, зокрема лімфоцитами та моноцитами, у поєднанні зі зростанням некротичної загибелі, створює передумови для ефективної міжклітинної взаємодії та імунної відповіді на власні антигени. Це може бути суттєвим патогенетичним механізмом при розвитку аутоімунних захворювань печінки. Ключові слова: експериментальний імунний гепатит; конканавалін А; лейкоцитарна інфільтрація; морфологія печінки.

ВСТУП

Для вивчення ураження печінки, опосередкованого імунними механізмами, використовуються експериментальна модель конканавалін А (Кон А)-індукованого гострого гепатиту, що відтворює низку рис, притаманних таким захворюванням людини, як аутоімунні та вірусні гепатити, а також антиген-незалежні пошкодження печінки (алкогольне ураження, неалкогольний стеатогепатит, пошкодження при ішемії-реперфузії) [1-3]. Найважливішим ланцюгом при Кон А-гепатиті є активація Т-клітин, в тому числі печінкових лімфоцитів-кіллерів, а також взаємодія Т-хелперів і макрофагів [1,4,5]. Однак серед чисельних літературних даних патоморфологічні особливості дії лектину на печінку описані поверхнево [6-8]. Ці фрагментарні відомості не дають повної уяви

щодо динаміки процесів, котрі відбуваються при експериментальному гепатиті.

Інфільтрація печінки запальними клітинами робить певний внесок в її пошкодження або як першопричина (при аутоімунному гепатиті і первинному біліарному цирозі), або як вторинна відповідь на інші процеси (за умов хронічної вірусної інфекції). Проте динаміка запальної інфільтрації печінки лейкоцитами за умов введення Кон А вивчена недостатньо. При некрозі лейкоцитів, що інфільтрують ділянку запалення, вивільняються біологічно активні і тканинопошкоджувальні молекули. При цьому може запускатися імунна відповідь на приховані раніше власні внутрішньоклітинні антигени [9,10], що становить собою важливий, самопідсилювальний механізм аутоімунного ураження.

Метою нашої роботи було дослідити гістоструктуру тканини печінки та інфільтра-

© С.І. Павлович, Н.В. Макогон, Н.Г. Грушка, Т.М. Бризгіна, Р.І. Янчій

цію її клітинами природного і адаптивного імунітету у динаміці Кон А-індукованого імунного гепатиту у мишей.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на статевозрілих самцях мишей лінії СВА масою 18-20 г. Постановка експериментів відповідала міжнародним біоетичним принципам, міжнародним угодам і національному законодавству у цій галузі [11].

Імунне ушкодження печінки викликали одноразовим внутрішньовенним введенням поліклонального Т-клітинного стимулятора мітогена Кон А («Sigma», США) в дозі 25 мг/кг. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин у відповідному об'ємі. Дослідження проводили з використанням 5-8 тварин у кожній групі через 2, 6, 12, 20 та 48 год.

Визначали активність аланінамінотрансферази (АлАТ) у сироватці крові, найбільш характерного біохімічного показника ушкодження гепатоцитів [12]. Для морфологічного вивчення шматочки печінки (отримані від 5 тварин у кожній групі) після фіксації 10%-м нейтральним формаліном обробляли за загальноприйнятою гістологічною методикою і заливали у парафін. Зрізи фарбували гематоксилін-еозином і піддавали світлооптичному дослідженню. Морфологічну оцінку змін гістоструктури печінки проводили за розробленим нами комплексом показників, найбільш важливих для характеристики розвитку імунного запалення у печінці: 1) порушення часточкової структури, 2) дистрофія гепатоцитів, 3) загибель гепатоцитів, 4) активація зірчастих ретикулоендотеліоцитів (ЗР). Патологічні зміни мікроциркуляторного русла характеризували за такими показниками: 1) розширення судин, 2) повнокрів'я судин, 3) порушення судинних стінок, 4) периваскулярні набряки, 5) тромбоутворення. Оцінку морфологічних змін проводили за результатами напівкількісного аналізу з використанням 5-бальної шкали: 0 - відсутність

змін, 1- незначні зміни, 2 – зміни середньої важкості, 3 – суттєві зміни, 4- значно виражені ушкодження. Підраховували окремо суму балів стану паренхіми та судин за вищезгаданою шкалою, а також загальну суму балів морфологічних змін у тканині печінки.

При аналізі запальної інфільтрації тканини печінки визначали кількість клітин в інфільтратах. За цим показником характеризували осередки інфільтрації як дрібно- (3–9 клітин), середньо- (10–19 клітин), великовогневищеві (більше ніж 20 клітин). Підраховували кількість інфільтратів вказаних типів у 10 полях зору, об'єктив х20. Клітинний склад (лімфоцити, нейтрофілі та еозинофілі гранулоцити, плазмоти, макрофаги і моноцити) підраховували в 5 випадково вибраних інфільтратах (х40) та визначали відсоток кожного типу клітин. Залежно від клітинного складу диференціювали наступні типи інфільтратів: лімфоцитарні, лімфоцитарно-макрофагальні, лімфоцитарно-нейтрофілі, нейтрофілі та змішаного типу. Вираховували відсоток кожного типу інфільтратів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою непараметричного аналогу ANOVA - критерію Крускала-Волліса з подальшим порівнянням між групами за тестом множинних порівнянь Данна з використанням програми GraphPad Prism (version 5.01, «GraphPad Software», San Diego California США). Результати представлено як $M \pm m$ або як середнє значення та розкид (M , мінімальне та максимальне значення). Критичний рівень значимості при перевірці статистичних гіпотез $P=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

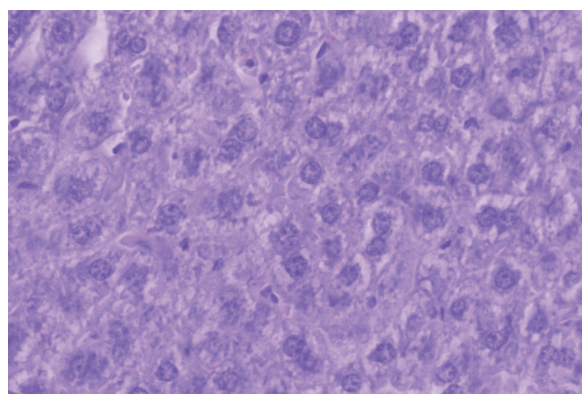
Введення поліклонального активатора Т-клітин КонА спричиняло ушкодження печінки із суттєвим підвищенням вмісту АлАТ у сироватці крові в 2,7, 3,2 та 2,9 рази порівняно з контролем через 6, 12 та 20 год після ін'єкції відповідно ($P < 0,001$). Це свідчило про порушення цілісності плазматичної мембрани

гепатоцитів. Через 48 год статистично значуще підвищення вмісту АЛАТ не виявлялося.

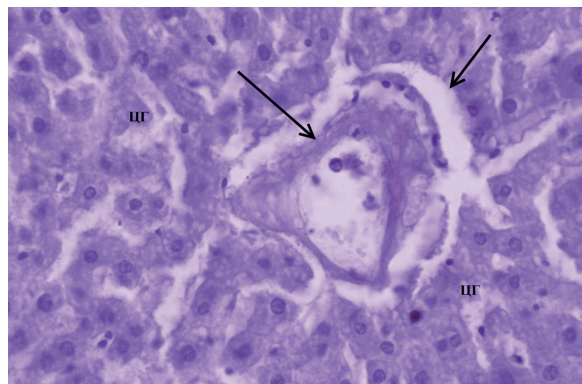
Морфологічне дослідження гістоструктури печінки показало, що у контрольних тварин нормальна архітектоніка печінки зберігалася протягом усього терміну експерименту. Введення КонА призводило до поступового зростання патологічних змін з максимумом через 20 год після введення (рис. 1), пошкодження печінки зберігалася до 48 год. Вірогідні зміни судинного русла, а саме значне розширення судин, периваскулярні набряки, порушення судинної стінки, набухання і десквамація ендотеліоцитів та тромбоутворення спостерігалася вже через 6 год дії КонА як у перипортальних, так і периферичних зонах печінкових ацинусів (табл. 1). Водночас перші статистично значущі морфологічні зміни паренхіми печінки прослідковувалися лише через 12 год (табл. 2) і стосувалися загибелі гепатоцитів та активації ЗР. Виражена вакуольна і білкова дистрофія з ушкодженням цитоплазми, гіпертрофією ядер та ядерець, некробіоз і цитоліз окремих клітин, збільшення кількості дво- та багатоядерних гепатоцитів, а також порушення часточкової структури печінки були виражені тільки через 20 год після введення КонА і зберігалися локально до 48 год.

Виявлені ранні зміни мікроциркуляції супроводжувалися посиленою міграцією лейкоцитів у тканину печінки. Суттєве збільшення дифузної інфільтрації печінки (вже через 6 год після введення КонА), ймовірно, пов'язано зі збільшенням синтезу хемокинів і молекул міжклітинної адгезії. ІФН- γ , що виділяється при активації Т-клітин Кон А, стимулює синусоїдальні ендотеліальні клітини, ЗР і гепатоцити до продукції численних хемокинів та адгезивних молекул, відповідальних за розвиток інфільтрації в печінку лейкоцитів, що, зрештою, призводить до розвитку гепатиту [5,13,14]. Вогнищева інфільтрація, що спостерігалася периваскулярно та у стромі органа, на тлі локального геморагічного просякання паренхіми посилювалася пізніше. Це

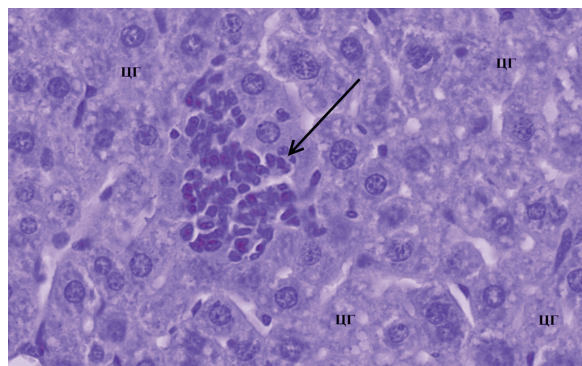
пов'язано, вірогідно, з виявленим у нашому дослідженні більш глибоким ушкодженням судинних стінок через 20 год дії КонА (див. табл. 1), що зумовлює вихід більшої кілько-



а



б



в

Рис. 1. Гістоструктура печінки контрольних мишей (а) та через 20 год після введення конканавалін А (б, в): стрілки на б вказують на судину з периваскулярним набряком та ушкодженою судинною стінкою, на в - на багатоклітинний лімфоцитарно-макрофагальний інфільтрат. ЦГ - зони цитолізу гепатоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином, об'єктив х40

сті клітинних елементів з кров'яного русла у вогнище запалення (див. рис. 1). Цей висновок підтверджується аналізом інфільтратів з різним числом клітин (рис. 2). Встановлено, що введення КонА призводить через 20 і 48 год до значного збільшення відсотка інфільтратів (від їх загальної кількості) із великим вмістом клітин в них (понад 20). Водночас на цей термін дослідження відсоток малоклітинних інфільтратів істотно зменшувався (див. рис. 2).

Підрахунок відносної кількості різних типів клітин, що інфільтрують печінку (у відсотках від загальної кількості лейкоцитів в інфільтратах), показав, що вже в ранні терміни розвитку КонА індукованого гепатиту значно посилювалася інфільтрація нейтрофільними гранулоцитами із максимумом на 6-ту годину. Кількість нейтрофілів становила в контролі $3,6 \pm 2,4\%$, через 2 год - $36,2 \pm 6,0\%$ ($P < 0,05$), через 6 год - $63,9 \pm 4,6\%$ ($P < 0,001$), через 12 год - $35,0 \pm 5,0\%$ ($P < 0,05$), через 20 год - $11,9 \pm 1,7\%$, через 48 год - $11,4 \pm 3,6\%$. Змі-

ни лімфоцитарної інфільтрації відбувалися в протифазі відносно нейтрофільної (рис. 3), з істотно вірогідним наростанням кількості лімфоцитів у інфільтратах через 12, 20 і 48 год. Ці результати узгоджуються з даними Bonder і співавт. [15], які виявили через 4 год після введення Кон А значне збільшення числа лейкоцитів, адгезованих до постіснусоїдальних венул, і лише мала частина з них (близько 20%) була Т-лімфоцитами. Збільшення відносної кількості лімфоцитів у складі інфільтратів в поєднанні із посиленням дифузної та вогнищевої інфільтрації (в 5-6 разів) свідчить про значне зростання міграції лімфоцитів у тканину печінки через 12-48 год після введення КонА. Відносна кількість моноцитів/макрофагів, інфільтруючих печінку, практично не змінювалася в часі, однак загальне їх число зростало через посилення дифузної та вогнищевої інфільтрації.

У нашому дослідженні була проведена гістологічна оцінка наявності в тканині

Таблиця 1. Динаміка гістологічних показників ураження судинного русла печінки при введенні Кон А

Показник	Години після введення Кон А					
	0 год	2 год	6 год	12 год	20 год	48 год
Розширення судин						
М	0,2	2,0	2,4*	2,5**	3,3***	2,3
min-max	0-1	2-2	2-3	2-3	3-4	2-3
Повнокров'я судин						
М	0,3	0,3	1,8	1,0	2,1**	2,3***
min-max	0-1	0-1	1-2	0-2	1-3	1-3
Периваскулярні набряки						
М	0	0,5	2,0*	1,5	2,8***	2,0*
min-max	0-0	0-1	2-2	1-3	2-4	1-3
Порушення судинних стінок						
М	0	1,0	2,2**	1,7	2,7***	1,9
min-max	0-0	0-2	2-3	1-2	2-4	1-3
Тромбоутворення						
М	0	0,9	1,9*	1,3	1,9**	2,0**
min-max	0-0	0-1	1-3	1-2	1-3	1-3
Сумарна оцінка ушкодження судин						
М	0,5	4,7	10,3**	8,0	12,8***	10,5**
min-max	0-2	4-6	8-12	7-10	10-14	8-13

Примітка. Тут і в таблиці 2: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ відносно контролю за тестом Крускала-Уолліса та критерієм Данна

Таблиця 2. Зміна гістологічних показників ураження паренхіми печінки при введенні Кон А

Показник	Години після введення Кон А					
	0 год	2 год	6 год	12 год	20 год	48 год
Ступінь дистрофічних змін гепатоцитів						
М	1,0	1,4	2,1	2,3	3,1**	3,2**
min-max	1-1	1-2	1-3	2-3	2-4	2-4
Кількість загиблих гепатоцитів						
М	0,6	1,0	1,8	2,5*	3,4***	3,0**
min-max	0-1	0-2	1-2	2-3	3-4	2-4
Ступінь порушення балкової структури						
М	0	0,2	0,6	1,9	3,0***	2,4**
min-max	0-0	0-1	0-1	1-3	2-4	1-4
Наявність активованих клітин Купфера						
М	0,5	1,1	1,8	2,4**	3,1***	2,0
min-max	0-2	0-2	1-2	2-3	2-4	1-3
Сумарна оцінка змін паренхіми						
М	2,1	3,7	6,3	9,1*	12,8***	10,6**
min-max	1-4	3-6	5-8	7-12	11-14	8-13
Патологічні зміни тканини печінки в цілому						
М	2,6	8,4	16,6	17,1	25,6***	21,1**
min-max	1-4	7-12	13-19	14-19	22-28	19-26

печінки інфільтратів, різних за клітинним складом (лімфоцитарних, лімфоцитарно-макрофагальних, нейтрофільних, лімфоцитарно-нейтрофільних, змішаних). Показано, що

в пізній термін розвитку КонА-індукованого гепатиту збільшувалася відносна кількість лімфоцитарно-макрофагальних інфільтратів, яка становила 58 % (розкид 40 - 80%) через

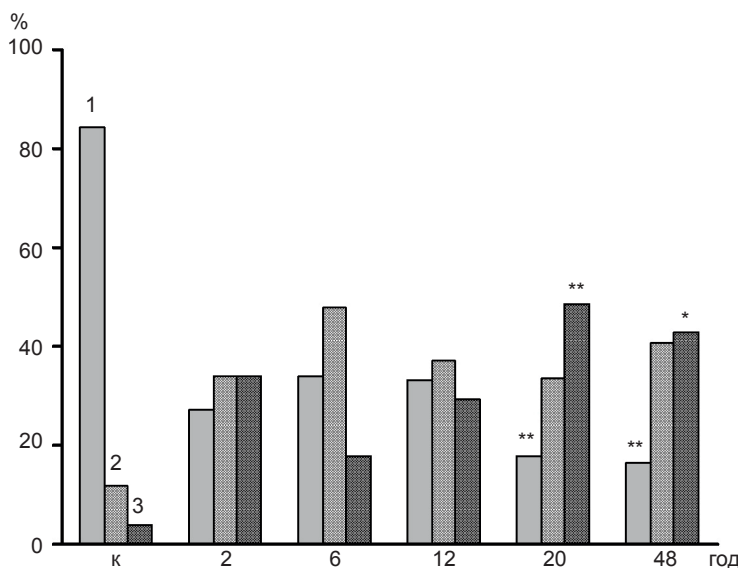


Рис. 2. Розподіл інфільтратів за кількістю у них клітин в динаміці після введення конканаваліну А. За віссю ординат – відсоток інфільтратів із зазначеною кількістю клітин (3-9, 10-19, більше ніж 20 клітин в інфільтраті) від загальної кількості інфільтратів; 1 – 3-9 клітин в інфільтраті; 2 – 10-19 клітин; 3 – понад 20 клітин в інфільтраті. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контролю за тестом Крускала-Уоллеса та порівнянням між групами за критерієм Данна

20 і через 48 год 62 % (20 - 80 %) в порівнянні з 6-ю годиною ($P < 0,01$), коли спостерігалось максимальне число нейтрофілів. Саме лімфоцитарно-макрофагальний тип інфільтратів сприяє міжклітинній взаємодії імунітетів, необхідній для розвитку імунної реакції. Таким чином, на 20-48-му годину експерименту створюються передумови для ефективної взаємодії клітин моноцитарно-макрофагального ряду та лімфоцитів, що може призводити до імунної відповіді проти власних антигенів. Як було показано нами раніше, введення КонА призводить до посилення некротичної загибелі як гепатоцитів, так і лейкоцитів, котрі в значній кількості інфільтрують печінку [13,16]. В результаті посиленого некрозу вивільняється значна кількість аутоантигенів та молекул-індукторів запалення, що також сприяє розвитку аутоімунної відповіді. Це було підтверджено виявленням нами суттєвим збільшенням у печінці популяції плазматичних клітин, які синтезують імуноглобуліни. На 48-му годину збільшувалося число плазмоцитів,

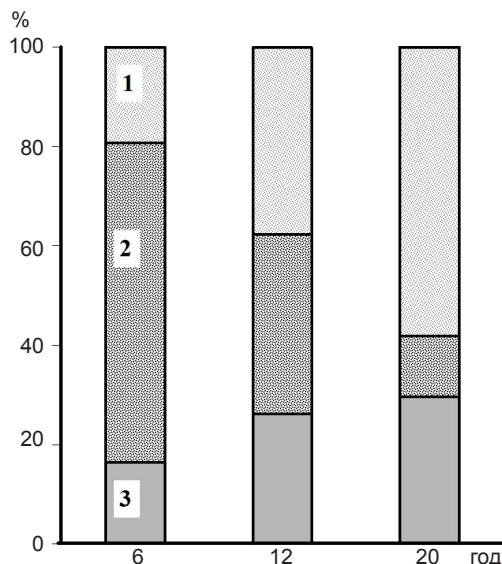


Рис. 3. Нормована гистограма відносної кількості різних популяцій клітин в інфільтратах через 6, 12 та 20 год після введення конканаваліну А. За віссю ординат – відсоток від загальної кількості клітин, підрахованих у 5 інфільтратах: 1 – лімфоцити; 2 – нейтрофілі/гранулоцити, 3 – моноцити/макрофаги

яке становило 4,9 % від загальної кількості інфільтруючих клітин ($P < 0,05$ порівняно з 6-ю годиною, коли вони в досліджуваних інфільтратах не виявлялись). Отже, у другій фазі імунозапального процесу в печінці створюються передумови для розвитку імунної відповіді на власні антигени, пов'язані з посиленням некротичної загибелі клітин та лімфоцитарно-макрофагальною взаємодією у досліджуваному органі, що призводить до появи значного пулу плазматичних клітин.

Таким чином, введення Кон А мишам призводило до виникнення гострого запального процесу в печінці. Гістологічні дослідження показали, що при Кон А-індукованому гепатиті насамперед спостерігалися процеси запального характеру в судинному руслі, за якими відбувалися морфологічні зміни в паренхімі. На тлі ранніх судинних запальних проявів у печінці реєструвалося істотне збільшення кількості клітин природного та адаптивного імунітету. Інфільтрація тканини печінки лейкоцитами є характерною морфологічною рисою аутоімунних захворювань органа [1,3,6,15]. Вважають, що, імуноопосередковане пошкодження підтримується повторюваними циклами безперервної міграції, утримання, виживання і загибелі ефektorних лейкоцитів [9,17]. У дослідженнях останніх років отримані суперечливі дані, що стосуються ролі нейтрофілів при гострому Кон А-індукованому гепатиті. Так, встановлено [15], що протягом декількох годин після введення препарату збільшується кількість макрофагів і нейтрофілів у печінці. Деплеція нейтрофілів при Кон А-гепатиті призводила до зниження міграції Т-лімфоцитів-хелперів ($CD 4^+$) в печінку і значного зменшення її пошкодження. Це підтверджує дані про те, що нейтрофіли, які в багатьох патологічних умовах є першим типом клітин, що мігрують у вогнище запалення, є ключовими в залученні інших лейкоцитів. З іншого боку, не виявлено кореляції ступеня ураження печінки та кількості інфільтруючих її нейтрофілів при дії Кон А на мишей, дефіцитних за молекулами адгезії

L-селектину та ICAM-1 [18].

На моделі імунного запалення печінки Т-клітинного генезу нами встановлено, що в ранній період (2-6 год) істотно зростала інфільтрація печінки клітинами-ефекторами запалення нейтрофілами з подальшим збільшенням кількості клітин адаптивного імунітету - лімфоцитів. Ці результати свідчать на користь припущення, що інфільтрація і активація нейтрофілів може бути суттєвим патогенетичним механізмом на початковій стадії розвитку захворювань печінки, опосередкованих Т-клітинами. Надалі активовані нейтрофіли сприяють збільшенню інфільтрації лімфоцитів та моноцитів і у досліджуваному органі створюються передумови для розвитку аутоімунного ушкодження. Іншим важливим патогенетичним фактором при гепатитах може бути некроз клітин, що циркулюють в крові і інфільтрують печінку. Введення Кон А посилює загибель клітин природного та адаптивного імунітету як у печінці, так і в імунокомпетентних органах [13,16,19]. Також виявлено підвищення активності ефекторного апоптотичного ферменту каспази-3, що було пов'язано, зокрема, з інфільтруючими печінку лімфоцитами, які піддаються апоптотичній активаційноіндукованій клітинній загибелі [20]. У наших попередніх дослідженнях [13,16] спостерігалось зростання некрозу лейкоцитів на тлі посиленої інфільтрації ними тканини печінки, ще до настання виражених ушкоджень гепатоцитів. Ми припускаємо, що некроз, який посилюється при розвитку запальної реакції, і вихід у тканину внутрішньоклітинного вмісту (все це, в свою чергу, має прозапальні і пошкоджувальні властивості), може за типом позитивного зворотного зв'язку додавати істотний внесок в пошкодження печінки. Посилення некротичної загибелі клітин в поєднанні з ефективною лімфоцитарно-макрофагальною взаємодією призводить до появи значної кількості плазматичних клітин у печінці, що вказує на розвиток імунної відповіді на власні антигени.

ВИСНОВКИ

1. Гістологічні дослідження показали, що першими при Кон А-індукованому імунному гепатиті відбувалися процеси запального характеру в судинному руслі, до яких пізніше приєднувалися морфологічні зміни в паренхімі печінки.

2. Виявлено значне посилення міграції лейкоцитів у печінку, що супроводжувалося збільшенням дифузної інфільтрації та змінами якісного складу інфільтратів, причому спочатку істотно зростала нейтрофільна інфільтрація і лише потім – лімфоцитарна.

3. Встановлено, що в динаміці КонА-індукованого гепатиту змінювався кількісний склад інфільтратів з утворенням багатоклітинних лімфоцитарно-макрофагальних з наявністю плазмоцитів.

4. Отримані результати дають підставу припускати, що розвиток аутоімунного гепатиту значною мірою опосередкований інфільтрацією тканини печінки клітинами природного й адаптивного імунітету, що створює передумови для імунної відповіді на власні антигени.

5. Урахування патоморфологічних особливостей динаміки КонА-індукованого гепатиту сприятиме вдосконаленню терапевтичних підходів при запальних захворюваннях печінки Т-клітинного генезу.

**С.І.Павлович, Н.В.Макогон, Н.Г.Грушка,
Т.М.Брызгина, Р.И.Янчий**

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ КОНКА-НАВАЛИН А-ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕПАТИТА

Изучали повреждение ткани печени, ее инфильтрацию клетками естественного и адаптивного иммунитета в динамике КонА-индуцированного гепатита у мышей. Использовали полуколичественный метод оценки повреждения микроциркуляторного русла и паренхимы, исследовали лейкоцитарную инфильтрацию печени и клеточный состав инфильтратов. Первичная реакция печени на введение КонА заключалась в изменениях воспалительного характера в сосудистом русле, за которыми следовали нарушения в паренхиме. Выявлено значительное усиление миграции лейкоцитов в печень, причем вначале

возрастала нейтрофильная инфильтрация с максимумом на 6-й час ($63,9 \pm 4,6\%$, $P < 0,001$ относительно контроля), а затем - лимфоцитарная с образованием многоклеточных лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов (62% через 48 ч в сравнении с 6-часовым экспериментом) и существенным количеством плазматических клеток (4,9%, $P < 0,05$ сравнительно с 6-часовым экспериментом). Полученные результаты дают основание предполагать, что усиленная инфильтрация тканей печени лейкоцитами, в частности лимфоцитами и моноцитами, в сочетании с возрастанием некротической гибели, создает предпосылки для эффективного межклеточного взаимодействия и иммунного ответа на собственные антигены. Это может быть существенным патогенетическим механизмом при развитии аутоиммунных заболеваний печени.

Ключевые слова: экспериментальный иммунный гепатит; конканавалин А; лейкоцитарная инфильтрация; морфология печени.

S.I. Pavlovych, N.V. Makogon, N.G. Grushka, T.M. Bryzgina, R.I. Janchiy

MORPHOLOGICAL CHANGES IN MICE LIVER IN DYNAMICS OF CONCAVALIN A - INDUCED HEPATITIS

The injure of the liver tissue and its infiltration by cells of the innate and adaptive immunity in dynamics of Con A-induced hepatitis in mice was studied. The semiquantitative method of damage rate of microcirculation channel and liver parenchyma was used, leukocyte liver infiltration and cellular composition of infiltrates were investigated also. Primary liver reaction to the Con-A was the inflammatory changes in the vascular bed, followed by disturbances in the parenchyma. The sufficient increasing of leukocyte migration to the liver was revealed. Besides, the neutrophile infiltration was increased first with a maximum at 6 hours of the experiment ($63,9 \pm 4,6\%$, $p < 0,001$ to the control level), and then the lymphocyte infiltration was increased with creation of manycellular lymphocyte-macrophage infiltrates (62% at 48 hours comparing to 6 hours of experiment) and sufficient quantity of plasma cells population (4,9%, $p < 0,05$ comparing to 6 hours of experiment). The obtained data gives the base to suggest that the elevated infiltration of liver tissue by leukocytes, particularly by lymphocytes and monocytes, together with necrotic death increasing creates the conditions for effective intracellular interaction and immune response to autoantigenes. This can be the essential pathogenic mechanism of development of autoimmune liver diseases.

Key words: experimental immune hepatitis; concanavalin A; leukocyte infiltration; liver morphology.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv.

REFERENCES

1. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The

- concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim.* 2015 Apr; 49(1 Suppl):12-20.
- Ponezheva JB. Clinical and immunological aspects of pathogenesis of chronic hepatitis C and ways to optimize the therapy. [dissertation]. Nalchik: 2011. [Russian].
- Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(21): 3306 -12.
- Tiegs G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. *Z Gastroenterol.* 2007; 45(1): 63 -70.
- Wang HX, Liu M, Weng SY et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012 Jan 14; 18(2):119-25.
- Hu B, Zou Y, Liu S et al. Salidroside attenuates concanavalin A-induced hepatitis via modulating cytokines secretion and lymphocyte migration in mice. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:314081.
- Massaguer A, Perez-Del-Pulgar S, Engel P et al. Concanavalin A-induced injury is severely impaired in mice deficient in P-selectin. *J Leukoc Biol.* 2004; 72 (2): 262-70.
- Obernihin SS Morphological changes of the immune system in Concanavalin A-induced hepatitis. [dissertation]: Moscow. 2005 [Russian].
- Magrone T, Jirillo E. Mechanisms of neutrophil-mediated disease: innovative therapeutic interventions. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(12):1609-19.
- Miyake Y, Yamasaki S. Sensing necrotic cells. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 738:144-52.
- Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. *Off J Europ Union.* 2007; 50, № L197; 1-89.
- Kamishnikov VS. Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnosis. Moscow: Medpress-inform; 2009.
- Pavlovich SI, Bryzgina TM, Makogon NV et al. Infiltration of the liver by cells of innate and adaptive immunity and their destruction in development of experimental immune concanavalin-A-induced hepatitis. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2011; 21(6): 42-48.
- Jaruga B, Hong F, Kim W, Gao B. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 207, (5):1044 - 52.
- Bonder C, Ajuebor M, Zbutnuik L et al. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A - induced hepatitis. *J Immunol.* 2004; 172: 45 - 53.
- Makogon NV, Pavlovych SI, Bryzgina TM, Aleksiuk LI, Sukhina VS, Grushka NH, Alekseyeva IM. Proliferation and death of liver mononuclear cells in immune lesions induced by concanavalin A and anti-liver antibodies in mice. *Fiziol Zh.* 2008; 54(6): 49-57.
- Eksteen B, Afford S, Wigmore S et al. Immune-mediated

- liver injury. Semin Liver Dis. 2007; 27(4): 351 – 66.
18. Kawasuji A, Hasegawa M, Horikawa M et al. L-selectin and intercellular adhesion molecule – 1 regulate the development of Concanavalin A – induced liver injury. J Leukoc Biol. 2006; 79, (4): 696 – 705.
19. Fayad R, Sennello J, Kim S et al. Induction of thymocyte apoptosis by systemic administration of concanavalin A in mice: role of TNF- α , IFN- γ and glucocorticoids. Eur J Immunol. 2005; 35(8): 2304 – 12.
20. Biburger M, Tiegs G. α -Galactosylceramide – induced liver injury in mice is mediated by TNF- α but independent of Kupffer cells. J Immun. 2005; 175: 1540 – 50.

*Матеріал надійшов до
редакції 13.02.2015*