© Рикало Н.А., Гумінська О.Ю

УДК: 616.36-002:599.323.4:577.181.7

Рикало Н.А., Гумінська О.Ю.
Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, кафедра патофізіології (вул. М.І. Пирогова, 56, Україна, 21018)

ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ ІМУНІТЕТУ СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ НА ТЛІ ХРОНІЧНОГО РИФАМПІЦИН-ІЗОНІАЗИД ІНДУКОВАНОГО ГЕПАТИТУ, ЇХ КОРЕЛЯЦІЇ З ПОКАЗНИКАМИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ТИМУСУ ТА СЕЛЕЗІНКИ

Резюме. *Установлено достовірне зменшення, у порівнянні з інтактною групою, відносної кількості CD3+на 26,79%, CD4+ на 18,83%, CD8+ на 50,66%, CD22+ на 36,34% при хронічному медикаментозному гепатиті. При застосуванні кверцетину встановлено достовірно вищі, у порівнянні з ХМГ, відносні показники Т-лімфоцитів: CD3+ на 34,15 %, CD4+ на 18,4 %, CD8+ на 92,56 %, CD22+ 49,05 %. При застосуванні "Антралю" встановлено достовірне збільшення кількості CD3+ на 24,34 %, CD4+ на 12 %, CD8+ на 29,73 %, CD22+ достовірно більше на 70,75 % від аналогічних показників при ХМГ. ДНК-цитометрія ядер клітин тимусу при ХМГ достовірно встановила збільшення відсотку ядер клітин тимусу у G2M фазі 38 %, більший на 29,8 % індекс проліферації та на 42 % більше ядер клітин тимусу з ознаками фрагментації ядерної ДНК. При застосуванні кверцетину встановлено достовірне зростання відсотку ядер клітин тимусу у S фазі на 26,6 %, зниження відсотку ядер з ознаками фрагментації ДНК на 56,4 % порівняно з ХМГ. Застосування "Антралю" призвело до достовірного зростання відсотку ядер клітин тимусу у інтервалі G2M на 31,5 % та індексу проліферації на 16,2 %. Аналіз показників ДНК-цитометрії встановив достовірне зменшення відсотку ядер клітин селезінки у G0-G1 фазі на 4,6 %, достовірне збільшення, індексу проліферації на 13%, та збільшення у 4 рази інтервалу RN1. При застосуванні кверцетину достовірно встановлено, що відсоток ядер клітин селезінки із ознаками фрагментації ДНК на 42 % менший, а при використання "Антралю" на 28 % менше від показника нелікованих тварин.*

Ключові слова: *печінка, хронічний медикаментозний гепатит, трансформуючий фактор росту-β1, Т-лімфоцити, клітинний цикл тимусу, клітинний цикл селезінки, статевонезрілі щурі, рифампіцин, ізоніазид, "Квертин", "Антраль".*

Вступ

Імунна система це високоспеціалізована система зі складними та багаторівневими механізмами регуляції, часто інтегрованими та залежними від діяльність багатьох інших систем організму, цитокінів, хемокінів та ряду інших факторів [Ільїнська, 2010].

За літературними даними, спектр причин, які можуть призвести до дизрегуляторних порушень імунної системи досить широкий [Алексеева и др., 1991; Хаитова, 2002; Шульпекова, 2010; de Abajo et al., 2004], тому ізольовано відслідкувати девіації та дизрегуляторні дисфункції у формуванні та функціональній активності імунної системи досить важко.

Зважаючи на те, що неінфекційна патологія печінки займає одне з чільних місць у структурі гепатобіліарних захворювань та має тенденцію до прогресування, пов'язану з об'єктивними предикторами: підвищення рівня хвороб, що потребують тривалої гепатотоксичної терапії, широка доступність гепатотоксичних препаратів у аптекарській мережі, самолікування з непоодинокими випадками поєднання препаратів, що потенціюють побічні ефекти один одного) та фармако-економічними причинами [Мороз, Рикало, 2010; Бризгіна, 2011; Рикало, Гумінська, 2012; Abdullah, Kamal, 2007; Murray et al., 2008; Cheng et al., 2009; Grattagliano et al., 2009; Xiuda Shen et al., 2009; Harshad Devarbhavi, 2011; Kleiner et al., 2014]. За допомогою дослідження показників клітинного циклу ми можемо детальніше дослідити вплив медикаментозного гепатиту на стан імунної системи.

Мета роботи: дослідити стан імунітету статевонезрілих щурів за умов хронічного рифампіцин-ізоніазид індукованого гепатиту, показники клітинного циклу (КЦ) тимусу та селезінки та їх кореляційні зв'язки.

Матеріал та методи

Експериментальне відтворення хронічного медикаментозного рифампіцин-ізоніазид індукованого гепатиту (ХМГ) виконано на 80 статевонезрілих нелінійних білих щурах-самицях, віком 1 міс, з початковою вагою 50-55 г.

Усі експерименти проводились з дотриманням "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Київ, 2001) та узгоджених із положенням "Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей".

Для моделювання ХМГ (хронічного медикаментозного гепатиту) щурам РІ групи інтрагастрально вводили рифампіцин в дозі 86 мг/кг та ізоніазид в розрахунку 50 мг/кг (на стандартизованому розчиннику ТВІН-65 та дистильованій воді) тричі на тиждень протягом 29 діб [Рикало, Гумінська, 2013]. З метою патогенетичної корекції статевонезрілим щурам РІК групи вводили інтрагастрально "Квертин" ЗАТ НВЦ "Боргщагівський ХВЗ" (діюча речовина - кверцетин), у дозі 75мг/кг, в свою чергу тваринам РІА групи вводили гепатопротектор - "Антраль" у дозі 8 мг/кг (виробництва ВАТ "Фармак", Україна). На 30 добу тварин піддавали евтаназії шляхом цервікальної дислокації під тіопенталовим наркозом.

Імунний статус експериментальних тварин дослід-

жували шляхом визначення відсотку лімфоцитів. Основні популяції лімфоцитів (Т та В-клітини) визначали за кластерами диференціації: Т - клітини по маркеру CD3+, CD4+, CD8+, CD22+. Для визначення маркерів використовували метод непрямої імунофлуоресценції із застосуванням моноклональних антитіл (МКАТ) (Becman Coulter), США.

Підрахунок клітин здійснювали під люмінесцентним мікроскопом XSZ-146TP (FLUO) Ulab TM, у кожному препараті підраховували не менш 200 клітин. Вміст Проточна цитофлоуриметрія (ПЦ) здійснювалась на багатофункціональному проточному цитофлоуриметрі "PartecPAS" (Німеччина) на базі НДЦ ВНМУ імені М.І. Пирогова. Для визначення вмісту ДНК в ядрах клітин тимусу та селезінки методом ПЦ з зазначених органів під стерильною капсулою вилучали зразки тканин (0,5 см3), ретельно їх промивали фізіологічним розчином (0,9 % NaCl) та занурювали у фосфатно-сольовий буфер з pH 7,4 (Sigma, США).

Суспензії ядер з клітин тимусу та селезінки отримували за допомогою розчину для дослідження ядерної ДНК CyStainDNA фірми (Partec, Німеччина), ядерні суспензії виготовляли з використанням одноразових фільтрів CellTrics 50 мкм. Статистичний аналіз отриманих проведений в пакеті "STATISTICA 5.5"" (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М. І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA) з використанням параметричних і непараметричних методів (рангова кореляція Спірмена).

Результати. Обговорення

При дослідженні кількості клітин з маркером CD3+ (%) у периферичній крові статевонезрілих щурів PI групи встановлено, що їх рівень на 26,79 % (26,50±2,76 проти 36,20±2,33, p 0,05) менше від аналогічного показника тварин інтактної групи. Також встановлено, що популяція лімфоцитів CD4+ (%) у тварин PI групи менше на 18,83 % (12,50±1,47 проти 15,40±1,05, p 0,05) від рівня CD4+ (%) у тварин інтактної групи. Констатовано значне зменшення рівня CD8+ (%) периферичної крові тварин з ХМГ, кількість Т-лімфоцитів з маркером CD8+ (%) менше на 50,66 % (15,00±1,52 проти 7,40±0,50, p 0,05) у порівнянні з інтактною групою. Відносна кількість CD22+ PI групи у порівнянні з інтактною групою менше на 36,34 % (16,65±0,81 проти 10,60±1,14, p 0,05). У статевонезрілих щурів з індукованим ХМГ встановлено позитивні кореляції між CD3+ (%) пулом лімфоцитів - з CD4+ (r=0,82, p<0,05), CD8+ (r=0,67, p<0,05) та В-лімфоцитами CD22+ (r=0,74, p<0,05). ДНК-цитометрія ядер клітин тимусу при ХМГ встановила достовірне збільшення відсотку ядер клітин тимусу у G2M фазі 38 % (21,17±2,87 проти 15,34±4,71, при p<0,05), більший на 29,8 % (30,48±3,85 проти 23,48±5,44, p<0,05) індекс проліферації та більше на 37 % (8,85±1,22 проти 6,23±0,74, p<0,05) ядер клітин тимусу із ознаками фрагментації ядерної ДНК. Аналіз показників ДНК-цитометрії встановив достовірне зменшення відсотку ядер клітин селезінки у G0-G1 фазі на 4,6 % (70,73±3,57 проти 74,13±4,61, при p<0,05). Констатовано позитивний зв'язок середньої сили між фазою G0G1 клітин селезінки та кількістю Т-лімфоцитів: - з CD3+ (r=0,59, p<0,05), CD4+ (r=0,63, p<0,05) та CD8+ (r=0,62, p<0,05).

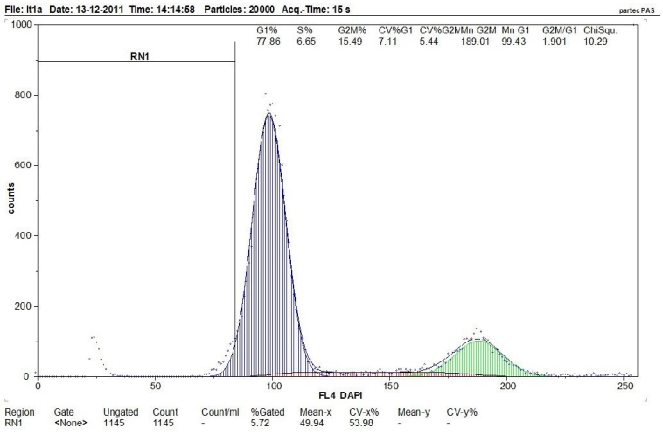


Рис. 1. Фази клітинного циклу ядер клітин тимусу статевонезрілих щурів з хронічним медикаментозним гепатитом. Будова кривої: 1-ий пік - інтервал G0-G1, %; 2-ий пік - фаза S, % 3-ій пік - інтервал G2/M, %, інтервал RN1 - субдиплоїдна область.

У статевонезрілих щурів PIA групи, де на тлі хронічного рифампіцин-ізоніазид індукованого гепатиту ми застосовували "Антраль" - гепатопротектор з імуномодулюючими властивостями, встановлено, що показник CD3+ (%) у статевонезрілих щурів PIA групи у порівнянні з PI групою є більшим на 24,34 % (32,95±4,06 проти 26,50±2,76, p 0,05). Також зафіксовано, що рівень CD4+ (%) на 12 % (14,00±1,65 проти 12,50±1,47, p 0,05) більше, рівень CD8+ (%) тварин PIA групи на 29,73 % (9,60±1,31 проти 7,40±0,50, при p 0,05) більше аналогічних показників у нелікованих тварин, рівень CD22+ (%) тварин PIA групи більше на 70,75 % (18,10±0,72 проти 10,60±1,14, p 0,05).

При аналізі кореляцій показників PIA групи між дослідженими кластерами диференціації Т-лімфоцитів встановлено сильний позитивний зв'язок CD3+ з CD8+ (r=0,96, p<0,05), та сильні позитивні зв'язок з CD4+ (r=0,94, p<0,05). Також зафіксовано сильний позитивний кореляційний зв'язок між кількістю CD3+ та CD22+ (p<0,05). Очікувано встановлено наявність кореляцій між CD4+ та CD8+ (R=0,93, p<0,05). Застосування "Антралю" призвело до достовірного зростання відсотку ядер клітин тимусу в інтервалі G2M на 31,5 % (27,84±1,52 проти 21,17±2,89, при p<0,05), зменшення відсотку ядер клітин тимусу у фазі G0-G1 на 6,84 % (64,76±2,35 проти 69,52±3,85, p<0,05), збільшення у 4 рази інтервалу RN1 (p<0,05), що характеризує фрагментацію ядерної ДНК. Констатовано наявність середньої сили позитивного зв'язку між кількістю Т-лімфоцитів та фазою G0-G1 КЦ ядер клітини тимусу, та сильного позитивного зв'язку фази G0-G1 КЦ тимусу з CD4+ (r=0,83, при p<0,05). Виз-

начено наявність обернених зв'язків між фазою G2/M КЦ ядер клітин тимусу та кількістю CD3+ (r=-0,80, при p<0,05), CD4+(r=-0,70, при p<0,05), CD8+ (r=-0,69, при p<0,05). Показник фрагментації ядерної ДНК клітин тимусу тварин РІА має позитивні кореляції середньої сили з кількістю CD3+ (r=0,58, при p<0,05), CD4+(r=0,69, при p<0,05), CD8+ (r=0,64, при p<0,05) та з CD22+ (r=0,54, при p<0,05).

У РІК групі, де для патогенетичного лікування ХМГ застосовували кверцетин - препарат з ряду біофлавоноїдів з імуностимулюючою дією, показники імунітету, при порівнянні з РІ групою, були наступні: рівень CD3+ (%) є більшим на 34,15 % (35,55±1,90 проти 26,50±2,76, p 0,05), що вказує на значні протективні властивості кверцетину, кількість CD4+ на 18,4 % (14,80±1,82 проти 12,50±1,47, p 0,05) більше, рівень CD8+ (%) вище на 92,56 % (14,25±1,77 проти 7,40±0,50, p<0,05), показник В-лімфоцитів (%) є більшим у даній групі відносно групи РІ на 49,05 % (15,80±2,14 проти 10,60±1,14, p<0,05), показники CD4+, CD8+, CD22+ не відрізняється від рівнів інтактної групи. При застосуванні кверцетину достовірно встановлено зростання відсотку ядер клітин тимусу у S фазі на 26,6 % (11,79±1,23 проти 9,31±2,49, p<0,05), зниження відсотку ядер з ознаками фрагментації ДНК на 56,4 % (3,86±0,47 проти 8,85±1,22, p<0,05) порівняно з ХМГ, що підтверджує антиапоптичну дію кверцетину, встановлено, що відсоток ядер клітин селезінки із ознаками фрагментації ДНК на 42 % (7,93±1,97 проти 13,71±2,59, p<0,05) менший. Кількість CD4+ у тварин РІК групи корелює з відсотком ядер клітин КЦ тимусу, що перебувають у S фазі (r=0,62, при p<0,05).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. При хронічному рифампіцин-ізоніазид індукованому медикаментозному гепатиті спостерігається значні зрушення у клітинній ланці імунітету, зокрема зниження рівня CD3+, CD4+, CD8+, CD22+ одночасно, що свідчить про формування вторинного імунодефіциту.

2. Гепатопротектори - "Антраль" та кверцетин позитивно впливають на корекцію популяцій лімфоцитів периферичної крові. При застосуванні антралю спостерігається достатня тенденція до відновлення рівня CD3+, CD4+, CD8+, проте наближення до показників інтактної групи досягти, на жаль, не вдалось.

3. За умов застосування кверцетину спостерігається відновлення рівня CD3+ до показника інтактної групи. Також слід відзначити достовірне більші рівні CD4+ та CD8+, що вказує на тісний зв'язок між морфофункціональним станом печінки та станом клітинної ланки імунітету загалом. Рівень CD22+ у тварин РІК групи має наближається до показників інтактної групи.

4. Наявність та сила кореляційних зв'язків підтверджують взаємозв'язок досліджуваних показників імунограми та показників клітинного циклі тимусу та селезінки та свідчить про стійкі відхилення імунної системи на тлі медикаментозного гепатиту.

Дослідження змін показників клітинного циклу тимусу та селезінки та їх взаємозв'язок з відносною кількістю Т-лімфоцитів у крові статевонезрілих щурів з медикаментозним гепатитом та при корекції "Антралем" та кверцетином дозволять створити теоретичне підґрунтя для розробки патогенетичної корекції медикаментозного гепатиту та вторинного імунодефіциту.

Список літератури

Аллергология. Клинические рекомендации; под ред. Р.М. Хаитова. - М.: ГЭОТАР-Медия, 2006. - 240 с.

Ільїнська І. Ф. Варіанти вторинної імунологічної недостатності, їх діагностичні критерії та принципи імунокорекції (аналітичний огляд) / І. Ф. Ільїнська // Лабораторна діагностика. - 2010. - № 4 (54). - С. 65-72.

Мороз В. М. Експериментальне обгрунтування патогенетичної терапії хронічної патології печінки / Мороз В. М., Рикало Н. А. // Вісник морфології. - 2010. - № 16 (2). - С. 236-241.

Патент № 77270 України, МПК (2013) G09B 23/28. Спосіб моделювання токсичного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів / Н. А. Рикало, О. Ю. Гумінська; власник Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова. - № u2012 08154; заявл. 03.07.2012; опубл.11 .02. 2013, Бюл. № 3.

Печень и иммунологическая реактивность / И. П. Алексеева, Т. М. Брызгина, С. И. Павлович, Н. В. Ильчевич. - К. : Наук. думка, 1991. - 166 с.

Шляхи та механізми загибелі імунокомпетентних клітин у динаміці експериментального імунного ушкодження печінки. / Т.М. Бризгіна, Н.В. Макогон, Л.І. Алексюк [та ін.] // Патология. - 2011. - Т.8, №2. - С. 108-110.

Шульпекова Ю.О. Лекарственные поражения печени / Ю. О. Шульпекова / / Здоровя України. - 2008. - № 8. - С. 24-25.

Abdullah S. Potentiation of isoniazid - induced liver toxicity by rifampicin in a combinational therapy of antituberculosis drugs (rifampicin, isoniazid and pyrazinamide) in Wistar rats: a toxicity profile study / S. Abdullah, R. Kamal // Hepatology Research. - 2007. - Vol. 37, № 10. - P. 845-853.

Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study / F. J. de Abajo, D. Montero, M. Madurga [et al. // British Journal of Clinical Pharmacology. - 2004. - № 58. - P. 71-80.

Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: Certainties and doubts / I. Grattagliano, L. Bonfrate, C. V. Diogo [et al.] // World Journal of Gastroenterology. - 2009. - № (39). - Т. 15. - P. 4865-4876.

Cheng K. TGF-?1 Gene Silencing for Treating Liver Fibrosis / K. Cheng, N. Yang, R.I. Mahato // Molecular Pharmacology. - 2009. - № 6(3). - P. 772-779.

Distinct regulatory roles of transforming growth factor-b and interleukin-4 in the development and maintenance of natural and induced CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells / J. Prochazkova, J. Fric, K. Pokorna [et a.] // Immunology. - 2009. - № 128. - С. 670-678.

Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure / K. F. Murray, N. Hadzic, S. Wirth [et al.] // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. - 2008. - Vol. 47 (4). - P. 395-405.

Harshad Devarbhavi. Antituberculous drug-induced liver injury: current

perspective / Harshad Devarbhavi // Tropical Gastroenterology. - 2011. - № 32 (3). - P. 167-174.
Hepatic Histological Findings in Suspected Drug-Induced Liver Injury: Systematic Evaluation and Clinical Associations / D. E. Kleiner, N. P. Chalasani, W. M. Lee [et al.] // Hepatology. - 2014. - № 59 (2). - C. 661-670.
Xiuda Shen CD4 T cells promote liver inflammation/injury by reverse signaling via CD40 without de novo activation / Xiuda Shen, Yue Wang, Feng Gao [et al.] // Hepatology. - 2009. - № 50 (5). - C. 1537-1546.

Гуминская О.Ю., Рыкало Н.А.

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО РИФАМПИЦИН-ИЗОНИАЗИД ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕПАТИТА, ИХ КОРРЕЛЯЦИИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ

Резюме. *Установлено достоверное меньшее, по сравнению с интактной группой, относительного количества CD3 + на 26,79%, CD4 + на 18,83%, CD8 + на 50,66%, CD22 + на 36,34% при хроническом медикаментозном гепатите. При применении кверцетина установлено, что относительные показатели Т-лимфоцитов, по сравнению с ХМГ, достоверно выше: CD3 + на 34,15%, CD4 + на 18,4%, CD8 + на 92,56%, CD22 + 49,05%. При применении "Антраля" установлено достоверное увеличение количества CD3 + на 24,34%, CD4 + на 12%, CD8 + на 29,73%, CD22 + достоверно больше на 70,75% аналогичного показателей при ХМГ. ДНК-цитометрия ядер клеток тимуса при ХМГ установила достоверное увеличение процента ядер клеток тимуса в G2M фазе 38 %, больше на 29,8 % индекс пролиферации и на 42 % больше ядер клеток тимуса с признаками фрагментации ядерной ДНК. При применении кверцетина установлено достоверное увеличение процента ядер клеток тимуса в S фазе на 26,6 %, снижение процента ядер с признаками фрагментации ДНК на 56,4 % по сравнению с ХМГ. Применение "Антраля" привело к достоверному увеличению процента ядер клеток тимуса в интервале G2M на 31,5 % индекса пролиферации на 16,2 %. Анализ ДНК-цитометрии установил достоверное уменьшение процента ядер клеток селезенки в G0-G1 фазе на 4,6 %, достоверное увеличение индекса пролиферации на 13 %, и увеличение в 4 раза интервала RN1. При применении кверцетина достоверно установлено, что процент ядер клеток селезенки с признаками фрагментации ДНК на 42 % меньше, а при использовании "Антраля" на 28 % меньше показателя нелеченных животных.*

Ключевые слова: *печень, хронический медикаментозный гепатит, клеточный цикл тимуса, клеточный цикл селезенки, Т-лимфоциты, неполовозрелые крысы, рифампицин, изониазид, кверцетин, "Антраль".*

Guminska O., Rikalo N.

FEATURES OF THE STATE OF IMMUNITY OF IMMATURE RATS WITH CHRONIC RIFAMPICIN-ISONIAZID INDUCED HEPATITIS, THEIR CORRELATION WITH THE THYMUS AND SPLEEN CELL CYCLE INDEXES

Summary. *A significantly lower, compared with the intact group, relative number of CD3 + at 26,79% for the CD4 + 18,83% for CD8 + 50,66% + SD22 to 36,34% were founded in chronic drug-induced hepatitis. While using quercetin found that the relative number of T-lymphocytes compared to DILD, was significantly higher: CD3 + at 34,15% for CD4 + 18,4% CD8 + at 92,56%, CD22+ at 49,05%. In applying the "Antral" found a significant increase in the number of CD3 + at 24,34 % CD4 + 12 % CD8 + at 29.73 %, and significantly higher level of CD22 + at 70,75 %, compared with the same indicators in DILD. DNA cytometry thymus cells nuclei of immature rats with the DILD has established a significant increase percentage in thymus cell nuclei in G2M phase, 38 %, proliferation index more on 29,8 % and on 42 % more thymus cells nuclei with the fragmentation of nuclear DNA. Quercetin using significant increase in 26,6 % the percentage of nuclei thymus cells in S phase and leads to reduction in 56.4 % the percent of nuclei with DNA fragmentation signs in comparing with DILD. The use of "Antral" has led to increase in 31,5 % the percentage of thymus cell nuclei in the phase G2M, proliferation index on 16,2%. DNA cytometry analysis found a significant decrease in 4,6 % the percentage of nuclei in the spleen cells G0-G1 and increase in 13% the proliferation index and RN1 interval in 4 times. When using quercetin well established that the percentage of nuclei spleen cells with signs of DNA fragmentation at 42 % lower and when using the "Antral" 28 % lower than in untreated animals.*

Key words: *liver, chronic drug-induced hepatitis, transforming growth factor-?1, thymus cell cycle, cell cycle splenic T lymphocytes, immature rats, rifampicin, isoniazid, "Quercetin", "Antral".*

Стаття надійшла до редакції 16.25.2014 р.

Гумінська Ольга Юріївна - асистент кафедри патофізіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 067 167-49-70; oguminska@gmail.com
Рикало Надія Анатоліївна - д.мед.н., зав кафедри патофізіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова