

УДК [616.36-092:612.017.1]-092.9

Влияние на экспериментальную иммунную патологию печени ингибитора активации ядерного транскрипционного фактора κB — куркумина

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

(Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев)

The effect of nuclear transcriptional factor κB activation inhibitor – curcumine on the experimental immune liver disease

I.N. Alekseyeva, N.V. Makogon, S.I. Pavlovich, T.M. Bryzgina, L.I. Aleksyuk, T.V. Martynova, V.S. Sukhina

Цель исследования. Изучить на двух моделях иммунного гепатита у мышей (Т-клеточного и антительного генеза) повреждение печени, активность и гибель ее иммунокомпетентных клеток, тимуса и селезенки, а также влияние ингибитора активации NF- κB куркумина на развитие патологического процесса.

Материал и методы. Иммунное поражение печени у мышей линии СВА вызывали с помощью Т-клеточного митогена конканавалина А и ксеногенных противопеченочных антител. Исследования проводили с применением гистологического, цитологического и биохимического методов.

Результаты. В сравнительных исследованиях выявлены особенности развития гепатита клеточного и антительного генеза. При Т-клеточном гепатите более выражены цитолитический компонент поражения печени, первичный и вторичный некроз клеток, угнетение фагоцитарной активности макрофагов, что создает предпосылки для усиления воспаления. При гепатите антительного генеза, по крайней мере на ранних этапах, выражены сосудистые и иммунные реакции на территории печени.

Заключение. Ингибитор активации NF- κB куркумин уменьшает предпосылки для развития воспалительных реакций при экспериментальном Т-клеточном гепатите, а также оказывает протективное действие на печень.

Ключевые слова: экспериментальный иммунный гепатит, конканавалин А, противопеченочные антитела.

Aim of investigation. To study at two models of immune hepatitis (T-cellular and antibody origin) in mice damage of the liver, activity and destruction of its immunocompetent cells, thymus gland and the spleen, as well as the effect of curcumine — inhibitor of NF- κB activation on development of pathological process.

Material and methods. An immune lesion of the liver in mice of CBA line was invoked by T-cellular mitogen concanavalin A and xenogenic anti-liver antibodies. Study was carried out with application of histological, cytological and biochemical methods.

Results. In comparative studies features of hepatitis development of cellular and antibody origin were revealed. At T-cellular hepatitis cytolytic component of liver lesion, primary and secondary cell necrosis, depression of cytophagous activity of macrophages that causes preconditions for enhancement of inflammation were more intensive. At hepatitis of antibody origin, at least at early stages, vascular and immunological reactions are expressed in the liver.

Conclusion. Curcumine, the inhibitor of NF- κB activation reduces preconditions for development of inflammatory response at experimental T-cellular hepatitis, and has protective action for the liver.

Key words: experimental immune hepatitis, concanavalin A, anti-liver antibodies.

Павлович Светлана Ивановна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; контактная информация для переписки — spravl@biph.kiev.ua, tas@biph.kiev.ua, отдел иммунологии и цитотоксических сывороток, Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАНУ, ул. Богомольца 4, Киев 01024, Украина

Иммунное воспаление играет существенную роль в механизмах аутоиммунных заболеваний печени (первичный билиарный цирроз, аутоиммунные гепатиты типа 1 и 2, первичный склерозирующий холангит), а также при других видах ее патологии. Установлено участие Т-клеток, в частности Т-хелперов и натуральных киллеров Т-клеток, в патогенезе аутоиммунного гепатита [8, 16, 22]. Об участии гуморального звена иммунной системы в повреждении печени свидетельствуют гипергаммаглобулинемия, присутствие противопеченочных антител и повышение количества плазмочитов в органе [7, 16, 22]. Роль и соотношение клеточных и гуморальных факторов в развитии аутоиммунных заболеваний печени могут определять стратегию терапевтических воздействий и требуют дальнейшего изучения.

Одним из фундаментальных механизмов функционирования иммунной системы, нарушение которого может приводить к аутоиммунной патологии, является поддержание клеточного гомеостаза, необходимого баланса между пролиферацией, дифференциацией, активацией и гибелью иммунокомпетентных клеток, в частности в печени. Особенно важно изучать соотношение апоптотического и некротического путей клеточной гибели, поскольку некроз клеток в отличие от апоптоза способствует развитию воспаления.

Существующие экспериментальные модели аутоиммунного поражения печени не отражают полностью развитие аутоиммунной патологии у человека, но тем не менее позволяют отделить и изучить роль того или иного компонента иммунного воздействия, в частности механизмов, опосредованных Т-клетками или антителами. Признанной моделью иммунного гепатита у мышей стало применение Т-клеточного митогена — *конканавалина А* (КонА) [20, 21]. Печень богата иммунокомпетентными клетками, поскольку на ее территории разворачиваются реакции защиты организма, связанные с поступлением из кишечника бактерий, токсинов, пищевых антигенов. Кроме того, в печени накапливаются Т-лимфоциты как следствие ее специфического кровоснабжения и функции по удалению активированных Т-клеток. Все это приводит к тому, что активация лимфоцитов КонА вызывает провоспалительный цитокиновый ответ и агрессию лимфоцитов относительно паренхимы. С целью воспроизведения иммунного гепатита антительного генеза применяют ксеногенные противопеченочные антитела [1].

Одним из кардинальных регуляторов воспалительной реакции является *ядерный фактор kappa B* (NF-κB), который активирует экспрессию генов провоспалительных медиаторов — цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α), а также молекул адгезии, индуцибельных циклооксигеназы и NO-синтазы [11, 13, 14]. ИЛ-1 и ФНО-α,

в свою очередь, активируют NF-κB, что может приводить к порочному кругу усиления воспалительного процесса.

Блокада активации NF-κB может оказаться перспективным методом терапии, однако требует тщательного изучения, поскольку роль NF-κB, по крайней мере в печени, многогранна. Наряду с провоспалительным действием он способствует выживанию гепатоцитов, ингибируя их апоптотическую гибель через транскрипционную индукцию различных супрессоров апоптоза [15, 23]. Показано, что NF-κB может быть как про-, так и антиапоптотическим фактором в зависимости от природы сигналов клеточной гибели.

Одним из ингибиторов активации NF-κB является куркумин, биологически активный компонент растения *Curcuma longa L.* Куркумин угнетает экспрессию генов ФНО-α и индуцибельной циклооксигеназы, действует как антиоксидант и модулятор пролиферации и апоптоза клеток [17]. Протективное действие блокаторов активации NF-κB было установлено в эксперименте при различных поражениях печени — токсическом, вызванном введением четыреххлористого углерода, при ишемии-реперфузии, стеатогепатите [14, 17, 18], а также на моделях аутоиммунных заболеваний, таких как болезнь Крона, иммунный артрит [6, 11]. Влияние ингибиторов активации NF-κB при аутоиммунной патологии печени изучено недостаточно.

Целью наших исследований было изучить на двух моделях иммунного гепатита у мышей (Т-клеточного и антительного генеза) повреждение печени, активность и гибель ее иммунокомпетентных клеток, тимуса и селезенки, а также влияние ингибитора активации NF-κB куркумина на развитие патологического процесса.

Материал и методы исследования

Исследования проведены на половозрелых самцах мышей линии СВА массой 18–22 г. При работе руководствовались требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986).

Ксеногенные противопеченочные антитела получали путем внутривенной иммунизации кроликов породы шиншилла экстрактом мышечной печени. Из сыворотки крови иммунизированных кроликов с титром противопеченочных антител по реакции связывания комплекса 1:400–1:640 путем высаливания сернокислым аммонием выделяли гамма-глобулиновую фракцию, которую использовали в качестве противопеченочных антител [1].

Иммунное повреждение печени Т-клеточного или антительного генеза вызывали однократным внутривенным введением КонА (Sigma, USA) в

дозе 0,6 мг на 20 г массы тела или противопеченочных антител в дозе 4,5 мг белка на 20 г массы тела соответственно. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Исследования проводили через 20 ч. Куркумин (Sigma, USA) суспендировали в 5% этаноле и вводили внутривентрикулярно (2 мг/20 г) за 2 ч до введения КонА или антител и через 1 ч после. Контрольным животным вводили растворитель куркумина – 5% этанол.

Активность *аланинаминотрансферазы* (АлАТ), *аспартатаминотрансферазы* (АсАТ) и *щелочной фосфатазы* (ЩФ) в сыворотке крови определяли по общепринятой методике [2]. Гистологическое исследование печени проводили на парафиновых срезах при окраске гематоксилином и эозином. Оценивали диффузную (количество лейкоцитов в 10 полях зрения $\times 40$) и очаговую (количество инфильтратов в 10 полях зрения $\times 20$) инфильтрацию печени. Из печени выделяли мононуклеарные клетки [9], подсчитывали количество больших, средних и малых лимфоцитов, плазмочитов. Иммунофлуоресцентным методом определяли количество мононуклеаров, экспрессирующих ядерный антиген пролиферирующих клеток (с помощью моноклональных антител ИПО-38). Апоптотическую и некротическую гибель мононуклеаров печени, а также клеток, выделенных из тимуса и селезенки, изучали путем прижизненной двойной окраски флуоресцентными красителями нуклеиновых кислот Хёхст 33342 и йодид пропидиума [19].

Все данные, выраженные в процентах, подвергали арксинус-преобразованию Фишера [3]. Для статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с дальнейшим сравнением средних значений по тесту Фишера с использованием программы «STATISTICA-6».

Результаты исследования и их обсуждение

Введение как КонА, так и противопеченочных антител приводило к повышению активности АлАТ в сыворотке крови, в большей степени выраженному при КонА (рис. 1). Показатель АсАТ повышался в равной степени – с $2,0 \pm 0,2$ мМ/л в час в контроле до $2,9 \pm 0,3$ и $3,0 \pm 0,5$ при действии КонА и антител соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях). Активность ЩФ повышалась лишь при введении антител – с $2,1 \pm 0,1$ мМ/л в час в контроле до $2,9 \pm 0,1$ при действии антител ($p < 0,001$).

Гистоструктурные изменения в печени при введении КонА и антител имели черты как сходства, так и различия. Для обоих видов поражения была характерна белковая дистрофия паренхимы с цитоллизом и некробиозом отдельных клеток и

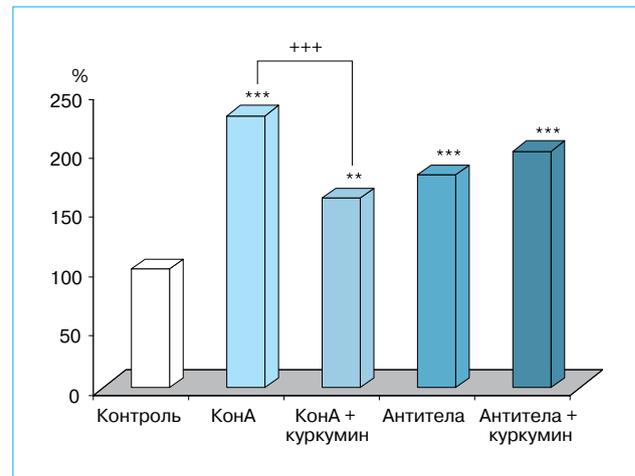


Рис. 1. Изменение активности АлАТ в сыворотке крови мышей (процент от контрольного уровня) при введении КонА и противопеченочных антител, а также при действии куркумина в этих условиях ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по отношению к контролю, *** $p < 0,001$ по отношению к действию КонА

нарушением микроциркуляции. Однако при введении КонА более отчетливо проявлялся цитолитический компонент повреждения печени, тогда как при введении антител преобладали дисциркуляторные изменения. При обоих воздействиях увеличивалась диффузная и очаговая инфильтрация печени лейкоцитами (рис. 2). Анализ распределения инфильтратов на категории по количеству клеток в них показал, что при двух видах иммунного поражения увеличивалось количество многоклеточных и уменьшалось количество малоклеточных инфильтратов, но более выраженным такое перераспределение наблюдалось в условиях введения антител: количество инфильтратов с более чем 50 клетками было большим, чем при

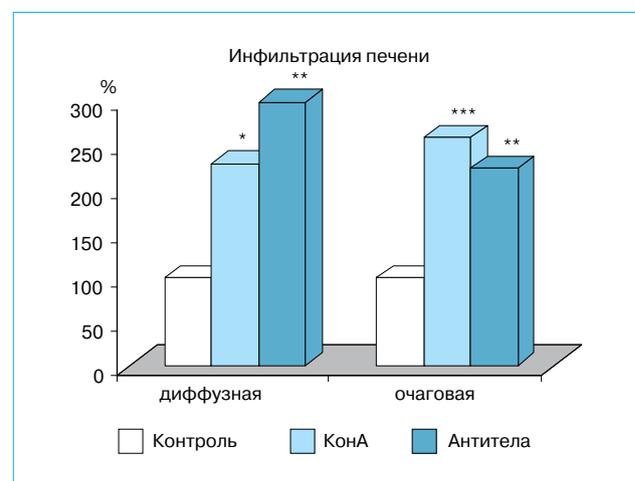


Рис. 2. Диффузная (количество лейкоцитов в 10 полях зрения $\times 40$) и очаговая (количество инфильтратов в 10 полях зрения $\times 20$) инфильтрация печени при действии КонА и противопеченочных антител По оси ординат – процент от уровня контроля. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ по отношению к контролю

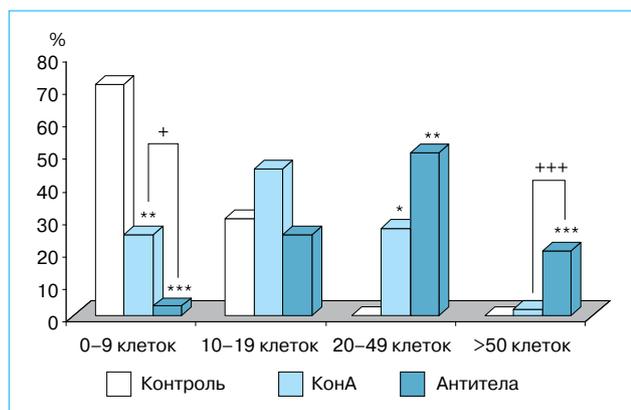


Рис. 3. Распределение инфильтратов по количеству клеток в них при действии КонА и противопеченочных антител

По оси ординат — процент от общего количества инфильтратов. По оси абсцисс — количество клеток в инфильтратах разных категорий. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по отношению к контролю, + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ по отношению к действию КонА

введении КонА ($p < 0,001$) — рис. 3. При этом чаще отмечалось присутствие отдельных плазмочитов и эозинофилов в составе инфильтратов смешанного типа, что является признаком активации иммунных процессов.

При введении антител в отличие от КонА выявлено увеличение количества плазмочитов в составе мононуклеаров, выделенных из печени ($0,09 \pm 0,01\%$ в контроле, $1,02 \pm 0,38\%$ при введении антител, $p < 0,01$; $0,47 \pm 0,20\%$ при действии КонА). Только при введении антител обнаруживалось перераспределение субпопуляций лимфоцитов печени в сторону увеличения процента малых, более дифференцированных лимфоцитов (рис. 4). Установлено усиление пролиферации мононук-

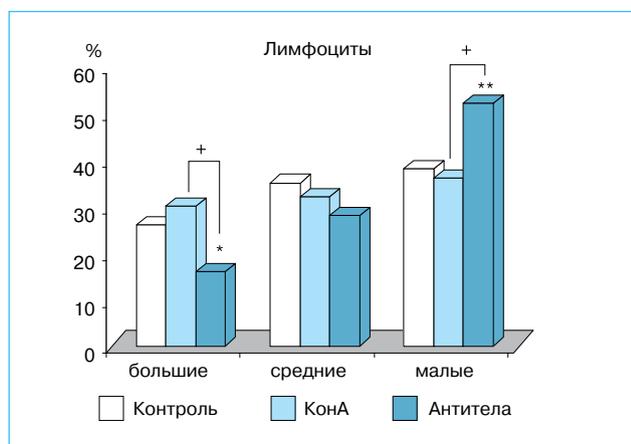


Рис. 4. Влияние КонА и противопеченочных антител на количество больших, средних и малых лимфоцитов в мононуклеарных клетках печени

По оси ординат — процент от количества лимфоцитов, выделенных из печени. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по отношению к контролю, + $p < 0,05$ по отношению к действию КонА

леаров печени при обоих видах ее иммунного поражения: количество клеток, экспрессирующих специфический для пролиферирующих клеток антиген, возрастало с $13,9 \pm 0,9\%$ в контроле до $31,4 \pm 1,8$ и $34,4 \pm 2,5\%$ при действии КонА и антител соответственно ($p < 0,001$ в обоих случаях).

Известно, что пролиферация и активация иммунокомпетентных клеток приводит к усилению клеточной гибели. Это один из базовых механизмов поддержания клеточного гомеостаза и ограничения чрезмерного развития иммунных реакций. Наши исследования выявили увеличение апоптоза мононуклеаров печени с $17,1 \pm 2,6\%$ в контроле до $34,1 \pm 2,2$ и $25,5 \pm 2,8\%$ при введении КонА и антител соответственно ($p < 0,05$ по отношению к контролю в обоих случаях), однако в большей степени апоптоз усиливался при КонА ($p < 0,05$ при сравнении с действием антител).

Ранее мы показали, что при иммунном поражении печени процент мононуклеаров, экспрессирующих Fas-рецептор апоптоза, увеличивался в большей степени при введении КонА, чем при введении антител [4]. В отличие от антител введение КонА усиливало гибель клеток и по некротическому пути. При этом увеличивалось количество мононуклеаров с цитологическими признаками первичного некроза — с $2,2 \pm 0,4\%$ в контроле до $10,4 \pm 1,0\%$ при введении КонА ($p < 0,001$), а также вторичного постапоптотического некроза с фрагментированными ядрами и повреждением плазматической мембраны — с $0,25 \pm 0,17\%$ в контроле до $1,32 \pm 0,41\%$ ($p < 0,05$).

Реакция центрального и периферического органов иммунитета — тимуса и селезенки — при введении КонА и антител также была различной. Только при КонА резко снижалась масса тимуса и уменьшалось количество клеток в нем. Иммунокомпетентные клетки при КонА гибли как по апоптотическому, так и по некротическому пути, наблюдалось усиление первичного и вторичного некроза (рис. 5). Такое усиление некротических процессов при действии КонА приводило к развитию воспаления в организме, подтверждением чего является увеличение процента нейтрофилов, в том числе палочкоядерных, — с $3,1 \pm 0,5\%$ в контроле до $28,0 \pm 2,1\%$ при КонА ($p < 0,001$) при снижении процента лимфоцитов.

Как продемонстрировали наши предыдущие исследования, реакция перитонеальных макрофагов при двух видах иммунного повреждения печени была разнонаправленной [5]: при КонА фагоцитарная активность снижалась, при введении противопеченочных антител повышалась. Учитывая полифункциональность макрофагов, можно предположить, что при КонА-индуцированном гепатите уменьшение их фагоцитарной активности будет способствовать снижению элиминации некротических клеток, что приведет к значительному усилению воспаления. В то же

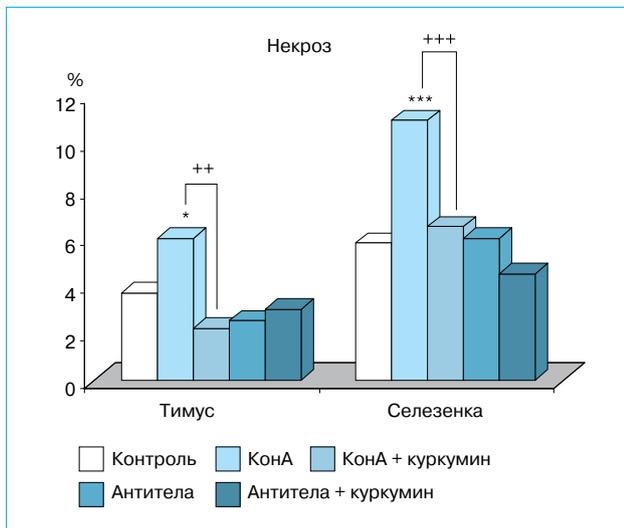


Рис. 5. Некротическая гибель клеток тимуса и селезенки при действии куркумина в условиях введения КонА и противопеченочных антител

По оси ординат — процент от общего количества клеток. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по отношению к контролю, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ по отношению к действию КонА

время введение антител, которые являются мощными опсонинами и активаторами макрофагов, может вызвать активацию иммунных процессов, в том числе на территории печени, что мы видели по другим показателям.

Представленные данные свидетельствуют, что при иммунной патологии Т-клеточного или антительного генеза помимо общих черт повреждения печени и гибели иммунокомпетентных клеток имеются и существенные различия. Так, в первом случае (введение КонА) в изменении гистоструктуры печени преобладал цитолитический компонент, что отражается на более значительном повышении активности АлАТ в сыворотке крови. Наряду с апоптотической гибелью клеток наблюдается и их некроз, который является предпосылкой развития воспалительных реакций, что и проявляется в существенном изменении лейкограммы крови. При иммунной патологии антительного генеза более выражены изменения сосудистого русла и предпосылки для развития иммунных реакций на территории печени (пролиферация мононуклеаров, образование многоклеточных смешанных инфильтратов, увеличение количества плазмочитов, активация макрофагов).

Список литературы

1. Алексеева И.Н. Противопеченочные антитела и функции печени. — Киев: Наукова думка, 1980. — 184 с.
2. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — 912 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.

Ингибитор активации NF- κ B куркумин оказывал протективное действие на печень (по данным активности АлАТ) только при введении КонА (см. рис. 1). При этом снижалась гибель клеток тимуса и селезенки по некротическому пути (см. рис. 5). Куркумин ослаблял воспалительную реакцию по показателям лейкограммы крови: снижалось количество палочкоядерных нейтрофилов — с $28,0 \pm 2,1\%$ при КонА до $17,7 \pm 1,7\%$ при действии куркумина ($p < 0,001$). При введении куркумина на фоне противопеченочных антител существенных изменений этих параметров не происходило. Таким образом, протективное действие куркумина проявлялось только в условиях выраженных воспалительных реакций. Эти наши наблюдения могут быть сопоставлены с данными литературы о том, что куркумин обладает более выраженным противовоспалительным действием при остром воспалении и вдвое меньшим — при хроническом процессе [10, 12].

Выявленные различия в развитии иммунного гепатита Т-клеточного и антительного генеза свидетельствуют о том, что эти два вида иммунного поражения печени в значительной степени опосредуются разными сигнальными механизмами. Известно, что активация Т-клеток митогеном КонА приводит к синтезу ими целого ряда провоспалительных факторов, в первую очередь цитокинов, оказывающих непосредственное влияние на гепатоциты, а также вызывающих активацию NF- κ B и усиление каскада воспалительных как про-, так и антиапоптотических сигналов [13, 20, 23]. При иммунном поражении печени антителами, по крайней мере на ранних этапах, более важным патогенетическим фактором является взаимодействие введенных ксеногенных антител с антигенами печени с вовлечением системы комплемента и образованием иммунных комплексов.

Заключение

Полученные данные о протективном действии куркумина на печень представляют экспериментальное обоснование для дальнейшего исследования возможности терапевтического применения ингибитора активации NF- κ B при аутоиммунном гепатите с активацией Т-клеточного звена иммунитета и выраженными воспалительными реакциями.

4. Макогон Н.В., Павлович С.І., Бризгина Т.М. и др. Проліферація та загибель мононуклеарних клітин печінки мишей за умов її імунного ураження, викликаного введенням конканаваліну А або протипечінкових антитіл // Фізіол. журн. — 2008. — Т. 54, № 6. — С. 49–57.
5. Мартинова Т.В., Алексеева І.М. Функціональна активність перитонеальних макрофагів у мишей при імунному ушкодженні печінки клітинного та антитіль-

- ного генезу // Физиол. журн. — 2008. — Т. 55, № 1. — С. 36–42.
6. *Cuzzocrea S., Chatterjee P.K., Mazzone E.* et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation // *Br. J. Pharm.* — 2002. — Vol. 135, N 2. — P. 496–510.
 7. *Czaja A.* Autoantibodies in autoimmune liver disease // *Adv. Clin. Chem.* — 2005. — Vol. 40. — P. 127–164.
 8. *Czaja A.* Current concepts in autoimmune hepatitis // *Ann. Hepatol.* — 2005. — Vol. 4, N 1. — P. 6–24.
 9. *Dong Z.J., Wei H.M., Sun R.* et al. Isolation and dissection of murine hepatic lymphocytes using mechanical dissection for phenotypic and functional analysis of NK1.1+ cells // *World J. Gastroenterol.* — 2004. — Vol. 10, N 13. — P. 1928–1933.
 10. *Gao X., Kuo J., Jiang H.* et al. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro // *Biochem. Pharm.* — 2004. — Vol. 68. — P. 51–61.
 11. *Jiang H., Deng C.S., Zhang M., Xia J.* Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2 // *World J. Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 12, N 24. — P. 3848–3853.
 12. *Kang B., Song Y., Kim K.* et al. Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4+ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages // *British J. Pharm.* — 1999. — Vol. 128, N 2. — P. 380–384.
 13. *Koerber K., Sass G., Kiemer A.K.* et al. In vivo regulation of inducible NO synthase in immune-mediated liver injury in mice // *Hepatology.* — 2002. — Vol. 36, N 5. — P. 1061–1069.
 14. *Leclercq I.A., Farrell G.C., Sempoux C.* et al. Curcumin inhibits NF- κ B activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice // *J. Hepatol.* — 2004. — Vol. 41, N 6. — P. 926–934.
 15. *Luedde T., Trautwein C.* Intracellular survival pathways in the liver // *Liver International.* — 2006. — Vol. 26. — P. 1163–1174.
 16. *Mackay I.R.* Hepatoimmunology: a perspective // *Immunol. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 80, N 1. — P. 36–44.
 17. *Reyes-Gordillo K., Segovia J., Shibayama M.* et al. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B proinflammatory cytokines production and oxidative stress // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2007. — Vol. 1770. — P. 989–996.
 18. *Shen S-Q., Zhang Y., Xiang J-J.* et al. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes // *World J. Gastroenterol.* — 2007. — Vol. 13, N 13. — P. 1953–1961.
 19. *Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W.* et al. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes // *Am. J. Physiol.* — 1996. — Vol. 271, N 6. — P. 949–958.
 20. *Tiegs G.* Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury // *Z. Gastroenterol.* — 2007. — Vol. 45, N 1. — P. 63–70.
 21. *Tiegs G., Hentschel G., Wendel A.* A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 90, N 1. — P. 196–203.
 22. *Washington M.K.* Autoimmune liver disease: overlap and outliers // *Modern Pathology.* — 2007. — Vol. 20, N 6. — P. 15–30.
 23. *Wullaert A., van Loo G., Heyninck., Beyaert R.* Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor- κ B: effects on liver homeostasis and beyond // *Endocrine Reviews.* — 2007. — Vol. 28, N 4. — P. 365–386.