

ИММУНОПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ТЕТРАХЛОРМЕТАНА

^{1,2}Шафигуллина З. А., ²Данилова И. Г., ³Сенцов В. Г.

¹Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики, 620026, г. Екатеринбург, ул. Куйбышева, 48, 8-343-389-97-03, insma@urfu.ru

²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, лаборатория морфологии и биохимии, 8-343-374-00-70, secretar@iip.uran.ru

³ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 620014, г. Екатеринбург, 8-343-214-86-71, usma@usma.ru

Резюме. Действие гепатотропного яда тетрахлорметана (CCl_4) приводит к развитию острой воспалительной реакции в ткани печени, что сопровождается резким увеличением количества Т-лимфоцитов в области кровеносных сосудов и в паренхиме органа. Отмечается угнетение В-клеточного звена иммунитета, выражающееся снижением числа CD45RA^+ клеток в паренхиме печени. В периферическом органе иммунной системы, селезенке, в ранние сроки после интоксикации CCl_4 возрастает количество CD3^+ клеток, а тимусе отмечается резкое увеличение количества CD45RA^+ .

Применение иммуномодулятора аминоталгидразида (АФГ) способствует уменьшению избыточного количества Т-лимфоцитов и нормализует число В-лимфоцитов в поврежденной печени, в тимусе и селезенке – стимулирует лимфопоэз, что выражается в виде увеличения количества Т- и В-лимфоцитов в паренхиме органов иммунной системы.

Ключевые слова: токсическое повреждение, лимфоциты, печень, тимус, селезенка.

IMMUNOPATOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF CARBON TETRACHLORIDE EFFECT

Shafigullina Z. A., Danilova I. G., Sencov V. G.

¹*Ural Federal University Named After the First President of Russia B.N. Yeltsin,
Yekaterinburg, Russian Federation*

²*Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the RAS, Yekaterinburg,
Russian Federation*

³*Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Ural state medical
university» of the ministry of health of the Russian Federation, Yekaterinburg,
Russian Federation*

Abstract. Exposure to hepatotropic poison, carbon tetrachloride (CCl₄) leads to the development of an acute inflammatory reaction in the liver tissue, which is accompanied by a quick increase in the number of T-lymphocytes in the blood vessel region and in the organ parenchyma. Inhibition of B-cell immunity is expressed by decrease in the number of CD45RA⁺ cells in the liver parenchyma. In the peripheral organ of the immune system, the spleen, the number of CD3⁺ cells increases in the early stages after CCl₄ intoxication, and a sharp increase in the number of CD45RA⁺ is noted in the thymus.

The use of an immunomodulator aminophthalhydrazide (APH) helps to reduce the excessive amount of T-lymphocytes and normalizes the number of B-lymphocytes in the damaged liver, thymus and spleen - it stimulates lymphopoiesis, which is expressed as an increase in the number of T- and B-lymphocytes in the parenchyma of the organs of the immune system.

Keywords: toxic damage, carbon tetrachloride, lymphocytes, liver, thymus, spleen.

Введение

Во всех тканях организма в ответ на широкий спектр раздражителей, вызывающих повреждение, развивается воспалительная реакция. Как и в большинстве других органов, воспаление в печени с одной стороны является фактором способным усугублять тяжесть течения заболевания, а с другой – ограничивает степень поражения гепатоцитов, способствует восстановлению поврежденных структур и содействует восстановлению гомеостаза [1-3].

Печень является иммунологически сложным органом, ответственным за выработку белков острой фазы, компонентов системы комплемента, цитокинов и хемокинов, и содержит разнообразные популяции резидентных иммунных клеток [4-6]. При

токсическом повреждении печени образуется большое количество антигенных структур, гидролитических ферментов, токсичных соединений, что приводит к существенным нарушениям в органах иммунной системы. Различные химические вещества могут приводить к угнетению в клетках лимфоидных органов синтеза ДНК, а также к уменьшению в тканях органа количества лимфоцитов, митотически делящихся клеток, макрофагов и усилению деструктивных процессов [7].

Когда организм подвергается воздействию неблагоприятных факторов среды одной из первых активизируется лимфоидная система, и весь потенциал этой системы, включая морфогенетическую функцию, используется как неотложная помощь [8]. В-лимфоциты обеспечивают иммунологические механизмы защиты, участвуют в развитии специфических реакций гуморального типа в случае индукции воспалительного процесса различными антигенами бактериально-токсической и неинфекционной природы. Реализация морфогенетической функции лимфоцитами осуществляется за счет образования клеточных контактов. На поверхности лимфоцитов имеется широкий спектр разнообразных рецепторов. Так, известно, что в регенерирующей печени на поверхности Т-лимфоцитов экспрессируется ряд рецепторов, влияющих на синтез ДНК. Следовательно, пролиферативные процессы находятся под контролем иммунокомпетентных клеток [8].

Изучение иммунотоксичности CCl_4 и получение новых данных о его влиянии на иммунный гомеостаз, а также на соотношение основных популяций лимфоцитов, позволит разработать и обосновать оптимальную медикаментозную коррекцию нарушений.

Цель: оценить соотношение основных популяций лимфоцитов в печени, тимусе и селезенке при токсическом повреждении и его иммунологической коррекции.

Материалы и методы

Эксперимент был выполнен на 90 крысах-самцах линии Wistar массой 180 ± 10 г. в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.).

Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: интактная, CCl_4 3 сутки, CCl_4 7 сутки, CCl_4 , 14 сутки, CCl_4 +АФГ 3 сутки, CCl_4 +АФГ 7 сутки, CCl_4 +АФГ 14 сутки. Для создания модели токсического повреждения печени использовали CCl_4 , который вводили животным экспериментальных групп однократно внутривентрально в дозе 50 мг/100 г. Инъекции аминоталгидразида (АФГ) экспериментальным животным осуществлялись в течении всего эксперимента внутримышечно из расчета 2 мг/кг. АФГ

обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. Его основные фармакологические эффекты обусловлены способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов и восстанавливать их антигенпрезентирующую и секреторную функции [9]. К группам с CCl₄-воздействием и с применением АФГ были сформированы контрольные группы животных, которым вводили аналогичные дозы масляного раствора внутривентрально и внутримышечно 0,85% раствора хлорида натрия соответственно. Интактную группу составляли здоровые животные. Животных опытных групп выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование печени, тимуса и селезенки осуществляли на цинк-фиксированных, парафиновых срезах. Для оценки экспрессии CD3⁺ и CD45 RA⁺ применяли первичные антитела Purified Mouse Anti-Rat CD3 клон G 4.18 (BD Pharmingentm, USA) и CD45 RA clone OX-33, которые в разведении 1:30 инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре, а затем вторичные антитела Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption) (BD Biosciences, USA) в разведении 1:500. Антигенреактивные клетки выявляли при помощи тест-системы NovolinkTM Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd), контрастируя их хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидин в буферном растворе). DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток. Проводили негативный и изотипический контроль, оценивая в срезах количество клеток с различной интенсивностью положительной ИГХ-реакции. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500 (Leica, Germany) с видеокамерой Leica DFC420, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (V4) (Leica, Germany). Количественную оценку Т- и В-лимфоцитов производили в единице площади в 20 полях зрения при увеличении микроскопа x1000.

Статистический анализ результатов выполнен с использованием программного обеспечения OriginPro 2018 software (OriginLab Corporation, USA) и непараметрического критерия Манна-Уитни для 2-х независимых выборок ($p < 0.05$).

Результаты и их обсуждение

В связи с тем, что в ходе иммуногистохимического анализа тканей печени, тимуса и селезенки различий между интактной и контрольными группами животных не было установлено, в дальнейшем представлены результаты только интактной группы. Лимфоциты печени – важнейшие клетки, регулирующие продолжительность жизни гепатоцитов в физиологическом (апоптоз) и патологическом (некроз) цикле жизни. [10-12]. Как известно, CD3⁺ является маркером количественной оценки всей популяции Т-лимфоцитов [6]. Результаты проведенного исследования показали, что на 3 сутки после

токсического воздействия CCl_4 в ткани печени развивается острая воспалительная реакция, которая сопровождается увеличением количества CD3^+ клеток в паренхиме и периваскулярных областях в 15 и 32 раза по сравнению с показателями интактных животных (таблица 1).

Таблица 1 – Количество Т- и В-лимфоцитов в печени при токсическом повреждении и на фоне введения иммуномодулятора (в 1 мм^2 среза)

Экспериментальная группа\показатель	CD3^+ клетки, паренхима	CD3^+ клетки, периваскулярно	CD45RA^+ клетки, паренхима
Интактные	$0,8 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$	$5,9 \pm 1,3$
CCl_4 , 3 сутки	$12,0 \pm 0,4^*$	$28,7 \pm 0,6^*$	$0,6 \pm 0,1^*$
CCl_4 , 7 сутки	$0,5 \pm 0,01^*$	$0,4 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,04^*$
CCl_4 , 14 сутки	$5,85 \pm 0,06^*$	$7,8 \pm 0,12^*$	$3,9 \pm 1,72$
$\text{CCl}_4 + \text{АФГ}$, 3 сутки	$10,2 \pm 0,3^{*,\#}$	$25,9 \pm 0,3^{*,\#}$	$0,9 \pm 0,3^*$
$\text{CCl}_4 + \text{АФГ}$, 7 сутки	$2,5 \pm 0,4^{*,\#}$	$2,4 \pm 0,4^{*,\#}$	$5,3 \pm 0,4^\#$
$\text{CCl}_4 + \text{АФГ}$, 14 сутки	$2,6 \pm 0,82^{*,\#}$	$5,2 \pm 0,53^{*,\#}$	$6,5 \pm 1,36$

Примечание: * – статистически значимые различия с интактной группой ($p < 0,05$);

– статистически значимые различия с группой CCl_4 ($p < 0,05$).

К 7 суткам эксперимента количество CD3^+ клеток снижается, а на 14 сутки вновь отмечается рост данного показателя. При количественной оценке CD45RA^+ клеток (В-лимфоциты) на фоне токсического воздействия на 3 сутки установлено уменьшение их числа в паренхиме печени в 10 раз, а на 7 сутки – в 8 раз по сравнению со значениями интактной группы (таблица 1).

Применение АФГ способствует снижению степени лимфоцитарной инфильтрации, о чем свидетельствует уменьшение количества CD3^+ клеток в 2 раза в паренхиме печени и в 1,5 раза периваскулярно (таблица 1), а также приводит к наиболее быстрой нормализации количества В-лимфоцитов в печени, что подтверждается увеличением CD45RA^+ клеток к 7 суткам и составляет $5,3 \pm 0,4 \text{ кл/мм}^2$, что близко к значению интактных животных ($5,9 \pm 1,3 \text{ кл/мм}^2$) (таблица 1).

В периферическом органе иммунопоэза, селезенке, на 3 сутки воздействия гепатотропного яда количество CD3^+ клеток увеличивается на 35% (рисунок 1) по сравнению с показателями интактной группы. В более поздние сроки исследования отмечается тенденция к уменьшению числа Т-лимфоцитов. Достоверных изменений количества В-лимфоцитов в селезенке не было обнаружено.

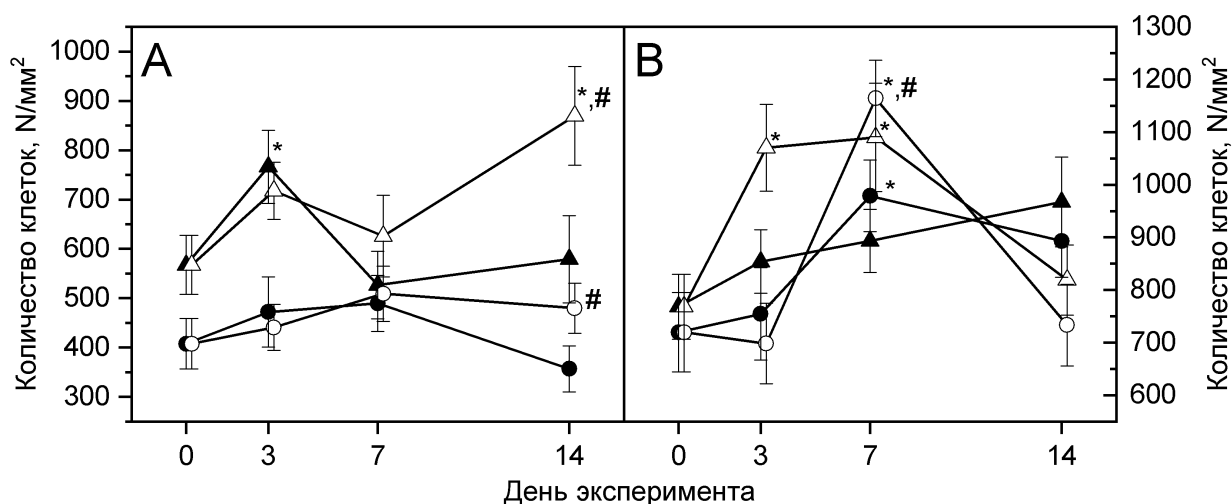


Рисунок 1 – Лимфоциты в селезенке (А) и тимусе (В) при токсическом повреждении (черные символы) и на фоне введения иммуномодулятора (белые символы); ($\blacktriangle \Delta$) – $CD3^+$ клетки, ($\bullet \circ$) – $CD45RA^+$ клетки; * – статистически значимые различия с интактной группой ($p < 0,05$); # – статистически значимые различия с группой CCl_4 ($p < 0,05$).

Иммуномодуляция аминоталгидразидом в течение 2 недель способствует усилению лимфопоэза в селезенке и выражается в виде увеличения $CD3^+$ клеток до 869.71 ± 99.9 кл/мм² по сравнению с показателями группы CCl_4 14 сутки (579.16 ± 88.45 кл/мм²) (рисунок 1), а количество $CD45RA^+$ клеток возросло на 34% (рисунок 1).

Иммуногистохимический анализ тканей тимуса показал, что в ответ на токсическое действие CCl_4 на 7 сутки количество $CD45RA^+$ увеличивается на 36% по сравнению с интактными показателями (рисунок 1).

Применение АФГ на 3 и 7 сутки при токсическом повреждении приводит к увеличению количества Т-лимфоцитов в ткани тимуса относительно показателей интактной группы на 39.3% и 41.9% соответственно (рисунок 1), а также к увеличению содержания В-лимфоцитов на 18.9% к 7 суткам по сравнению с тем же сроком без применения иммуномодулятора (рисунок 1).

Выводы

Токсическое действие тетрахлорметана приводит к развитию острой воспалительной реакции в ткани печени, которая сопровождается резким увеличением количества Т-лимфоцитов в паренхиме органа и периваскулярных областях. В тоже время зафиксировано угнетение В-клеточного звена иммунитета выражающееся снижением числа $CD45RA^+$ клеток. В селезенке в ранние сроки после интоксикации CCl_4 возрастает количество $CD3^+$ клеток, а в центральном органе лимфопоэза отмечается резкое увеличение количества $CD45RA^+$.

Применение АФГ способствует уменьшению избыточного количества Т-лимфоцитов и нормализует число В-лимфоцитов в печени, в тимусе и селезенке – стимулирует лимфопоз, что выражается в виде увеличения количества Т- и В-лимфоцитов в паренхиме органов.

Финансирование.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90012 и бюджетной программы № Гос. регистрации – АААА-А18-118020590107-0 с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Литература

1. Robinson M. W. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis / M. W. Robinson, C. Harmon, C. O'Farrelly // Cellular and Molecular Immunology. 2016. Vol. 13(3). P. 267–276. doi: 10.1038/cmi.2016.3.
2. Кутепов Д. Е. Сравнительная оценка эффективности экстракорпоральных методов и оптимизация лечения больных хронической печеночной недостаточностью : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.20 / Д. Е. Кутепов : ФГБУ ДПО «УНМЦ». – Москва, – 2014. – 228 с.
3. Danilova I. G., Shafigullina Z. A., Gette I. F., Sencov V. G., Medvedeva S. Yu., Abidov M. T. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 80, 106124. – P. 1–11. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106124.
4. Crispe I. N. The liver as a lymphoid organ // Annual Review of Immunology. – 2009. – Vol. 27. – P. 147–163. doi: 10.1146 / annurev.immunol.021908.132629.
5. Nemeth E., Baird A.W., O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system . // Seminars in Immunopathology. 2009. Vol. 31. P. 333–343. doi: 10.1007 / s00281-009-0173-4.
6. O'Farrelly C., Crispe I. N. Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system // Immunology Today. 1999. Vol. 20. P.394–398. doi: 10.1016/s0167-5699(99)01518-2.
7. Сивоконюк О. В. Иммуноморфология органов центрального и периферического иммуногенеза при экспериментальном токсическом // Одесский медицинский журнал. 2007. №3 (101). С. 24–28.

8. Tishevskaya N. V., Babaeva A. G., Gevorkyan N. M Effect of Lymphocyte Morphogenetic Activity on Organism Reactivity and Resistibility // Russian Journal of Developmental Biology. 2018. Vol. 49, Iss. 1. P. 48–59. doi: 10.1134/S106236041801006X.
9. Цыркунов В. М., Андреев В. П., Прокопчик Н. И., Кравчук Р. И. Клиническая морфология печени: дисплазия, апоптоз, регенерация // Гепатология и гастроэнтерология. 2017. Т. 1, № 1. С. 41–52.
10. Цыркунов В. М., Андреев В. П., Прокопчик Н. И., Кравчук Р. И. Клиническая морфология печени: некрозы // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2017. Т. 15, № 5. С. 557–568. doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-5-557-568.
11. Цыркунов В. М., Андреев В. П., Прокопчик Н. И., Кравчук Р. И. Клиническая морфология печени: цитотоксические лимфоциты // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2018. Т. 16, № 3. С. 343–349. doi: 10.25298/2221-8785-2018-16-3-337-349.
12. Patent US, USOO9101629B2, 11.08.2015. Method for obtaining 5-amino 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione alkali metal salts and their use in medicine. Patent United States of America, USOO9101629B2 US 9, 101, 629 B2 / Abidov A. M., Danilova I. G.

References

1. Robinson M. W. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis / M. W. Robinson, C. Harmon, C. O'Farrelly // Cellular and Molecular Immunology. – 2016. – Vol. 13(3). – P. 267–276. doi: 10.1038/cmi.2016.3.
2. Kutepov D. E. Comparative evaluation of the effectiveness of extracorporeal methods and optimization of the treatment of patients with chronic liver failure: abstract. dis. ... Dr. honey. Sciences: 14.01.20 / D. E. Kutepov: FGBU DPO "UNMTs". Moscow. 2014. 228 p. [In Russian].
3. Danilova I. G., Shafigullina Z. A., Gette I. F., Sencov V. G., Medvedeva S. Yu., Abidov M. T. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide // International Immunopharmacology. 2020. Vol. 80, 106124. P. 1–11. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106124.
4. Crispe I. N. The liver as a lymphoid organ / I. N. Crispe // Annual Review of Immunology. – 2009. – Vol. 27. – P. 147–163. doi: 10.1146 / annurev.immunol.021908.132629.

5. Nemeth E., Baird A. W., O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system // *Seminars in Immunopathology*. 2009. Vol. 31. P. 333–343. doi: 10.1007 / s00281-009-0173-4.
6. O'Farrelly C., Crispe I. N. Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system // *Immunology Today*. 1999. Vol. 20. P.394–398. doi: 10.1016/s0167-5699(99)01518-2.
7. Sivokonyuk O. V. Immunomorphology of central and peripheral immunogenesis in experimental toxic hepatitis // *Odessa Medical Journal*. 2007. №. 3 (101). P. 24–28. [In Russian].
8. Tishevskaya N. V., Babaeva A. G., Gevorkyan N. M. Effect of Lymphocyte Morphogenetic Activity on Organism Reactivity and Resistibility // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018. Vol. 49, Iss. 1. P. 48–59. doi: 10.1134/S106236041801006X.
9. Tsyrkunov V. M., Andreev V. P., Prokopchik N. I., Kravchuk R. I. Clinical morphology of the liver: displasia, apoptosis, regeneration // *Hepatology and Gastroenterology*. 2017. Vol. 1, Iss. 1. P. 41–52. [In Russian].
10. Tsyrkunov V. M., Andreev V. P., Prokopchik N. I., Kravchuk R. I. Clinical morphology of the liver: necroses // *Journal of the Grodno State Medical University*. 2017. Vol. 15, Iss. 5. P. 557–568. doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-5-557-568. [In Russian].
11. Tsyrkunov V. M., Andreev V. P., Prokopchik N. I., Kravchuk R. I. Clinical liver morphology: cytotoxic lymphocytes /// *Journal of the Grodno State Medical University*. 2018. Vol. 16, Iss. 3. P. 343–349. doi: 10.25298/2221-8785-2018-16-3-337-349. [In Russian].
12. Patent US, USOO9101629B2, 11.08.2015. Method for obtaining 5-amino 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione alkali metal salts and their use in medicine. Patent United States of America, USOO9101629B2 US 9, 101, 629 B2 / Abidov A.M., Danilova I.G.