

УДК 616.36 – 002 + 577.115 + 577.15

© Колектив авторів, 2012.

РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ПЕЧІНЦІ МИШЕЙ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІМУННОМУ ГЕПАТИТІ Т-КЛІТИННОГО ГЕНЕЗУ

Т.В. Мартинова, Н.В. Макогон, Т.М. Брызгіна, С.І. Павлович, В.С. Сухіна, Н.Г. Грушка, Р.І. Янчій

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, відділ імунології і цитотоксичних сироваток (зав. – проф. Р.І. Янчій), м.Київ.

DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS IN THE LIVER OF MICE WITH EXPERIMENTAL T CELL-MEDIATED IMMUNE HEPATITIS

T.V.Martynova, N.V.Makogon, T.M. Bryzgina, S.I.Pavlovich, V.S.Sukhina, N.G. Gruchka, R.I.Yanchy

SUMMARY

Oxidative stress was studied in mice with ConA-induced hepatitis, malondialdehyde (MDA) levels and catalase activity were determined. The levels of MDA in the liver were consistently elevated at 12, 20 and 48 h after ConA exposure and catalase activity was decreased at 48 h. Under these pathological conditions, the treatment of mice with NF- κ B inhibitor andrographolide modulated oxidant homeostasis by reducing levels of MDA.

РАЗВИТИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУННОМ ГЕПАТИТЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ГЕНЕЗА.

Т.В. Мартынова, Н.В. Макогон, Т.М. Брызгина, С.И. Павлович, В.С. Сухина, Н.Г. Грушка, Р.И. Янчий.

РЕЗЮМЕ

На модели КонА-индуцированного гепатита у мышей изучали развитие оксидативного стресса по концентрации малонового диальдегида (МДА) и активности каталазы. Через 12, 20 и 48 час после действия КонА содержание МДА в печени было стабильно высоким, а через 48 час происходило подавление активности каталазы. В этих условиях применение ингибитора активации ядерного фактора- κ B – андрографалида модулирует проокислительно-антиоксидантный гомеостаз в печени, снижая активность МДА.

Ключові слова: оксидативний стрес, імунний гепатит, ядерний фактор- κ B, андрографолід.

Вільнорадикальне окиснення - це процес, що постійно відбувається в клітинах всіх організмів, як в нормі, так і при патології. Його ініціаторами є активні форми кисню (АФК). Рівень накопичення АФК в клітинах контролюється системою природних антиоксидантів (ферментативних і неферментативних), дія яких направлена на підтримку в клітинах окисно-відновного гомеостазу. При підвищенні рівня АФК відбувається експресія редокс-чутливих генів (супероксиддисмутази, каталази тощо), відповідальних за синтез певних білків, необхідних для нормального функціонування клітини та захисту від токсичних ефектів оксидативного стресу. Крім того, редокс-чутливими є ряд факторів транскрипції, зокрема ядерний транскрипційний фактор – κ B (NF- κ B), відомий як кардинальний регулятор запальної відповіді. Накопичені дані [5, 11] свідчать про активацію NF- κ B при запальних процесах, у тому числі при аутоімунних захворюваннях.

Імунне пошкодження печінки пов'язане з розвитком запального процесу, який супроводжується змінами проокисно-антиоксидантного гомеостазу. Ведуча роль в розвитку оксидативного стресу належить АФК, які індукують процеси переокислення ліпідів

(ПОЛ). Продукти ПОЛ викликають зміну проникності ліпідного шару в біологічних мембранах, а надмірна їх кількість призводить до порушення мембран клітин, їх органел та ДНК [13]. Це впливає на функції клітин, їх диференціювання, проліферацію та шляхи загибелі. Продукти розпаду некротичних клітин є одними з ініціаторів розвитку та хронізації запального процесу, а також аутоімунних реакцій. Аутоімунні процеси є провідними етіологічними факторами при захворюваннях печінки, таких як первинний біліарний цироз, аутоімунний хронічний активний гепатит, первинний склерозуючий холангіт [15]. Відомо, що в імунному пошкодженні печінки можуть брати участь як гуморальні, так і клітинні механізми. В патогенезі аутоімунного гепатиту встановлена участь Т-клітин, зокрема субпопуляцій Т-хелперів і природних кілерів Т-клітин [6]. Модель аутоімунного гепатиту Т-клітинного генезу створюють за допомогою поліклонального мітогену Т-лімфоцитів – конканаваліна А (КонА). Сучасні дані, а також наші попередні дослідження [1] свідчать, що при КонА-індукованому гепатиті зростає рівень активності NF- κ B. Відомо, що NF- κ B активує експресію генів прозапальних медіаторів – цитокінів (інтерлейкінів - ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, інтерферону- γ -ІФН- γ , фактору некрозу пухлин- α - ФНП- α), а також молекул адгезії,

індуцибельних циклооксигенази і NO-синтази [11]. ІЛІ-1, ФНП- α , в свою чергу, активують NF- κ B, що може призводити до порочного кола посилення запального процесу. Речовини, які мають антиоксидантні властивості і пригнічують активацію NF- κ B, перспективні для терапії запального процесу. До таких сполук належать фітопрепарати, серед яких певної уваги заслуговує андрографолід. Це біциклічний дітерпеноїд лактон, вилучений з екстракту рослини *Andrographis paniculate* [9]. Андрографолід має протизапальні властивості, зокрема при астмі та експериментальному аутоімунному енцефаломієліті [5, 14, 9]. Є повідомлення про його гепатопротективні властивості [7]. Показано [5], що він блокує активність транскрипційного фактора NF- κ B, зменшує експресію прозапальних протеїнів, таких як циклооксигеназа-2 [8], пригнічує активність ФНП- α , модулює T- клітинну активність [9], зменшує утворення АФК в нейтрофілах [14].

Враховуючи вищезазначене, безсумнівний інтерес представляє вивчення дії андрографоліду на стан проокисно-антиоксидантного гомеостазу. Метою даної роботи стало дослідження ПОЛ (за вмістом одного з його продуктів - малонового діальдегіду- МДА) і активності ферменту антиоксидантного захисту каталази в динаміці експериментального імунного пошкодження печінки мишей T-клітинного генезу та їх змін під впливом блокатора NF- κ B – андрографоліду.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проведено на мишах самця лінії СВА, масою 20-22 г. При роботі з тваринами було дотримано всі необхідні Директиви Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986).

З метою моделювання імунного гепатиту застосовували КонА ("Sigma", USA) в дозі 25мг/кг маси тіла [4]. Контрольним тваринам замість КонА вводили фізіологічний розчин. Тварин виводили з експерименту через 12, 20 та 48 годин після введення КонА, вилучали печінку і заморожували в рідкому азоті. Андрографолід ("Sigma", USA), розчинений у 5% диметилсульфоксиді вводили внутрішньоочеревинно у дозі 100 мг/кг маси тіла [1, 7] за 2 години до КонА і проводили дослідження в зазначені вище строки. Контрольним тваринам вводили розчинник андрографоліду 5% диметилсульфоксид.

Рівень активності ПОЛ оцінювали за концентрацією в печінці одного з кінцевих його продуктів – МДА - стандартним методом [3]. Активність каталази в гомогенатах печінки оцінювали за методом в модифікації Королук М.А. і співат [2].

Для статистичної обробки використовували однофакторний дисперсний аналіз ANOVA з подальшим порівнянням середніх значень за тестом Фішера з використанням програми «STATISTICA-6»

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення КонА призводило до суттєвого пошкодження печінки мишей. За попередніми нашими гістологічними дослідженнями в печінці визначалися дистрофічні та деструктивні порушення паренхіми, суттєві ушкодження мікроциркуляторного русла, а також запальна інфільтрація тканини печінки лейкоцитами. КонА викликав наростання патологічних змін у печінці з максимумом через 20 год після його введення, які зберігалися до 48 год [4]. В цих умовах відбувалося посилення вільнорадикального окиснення ліпідів, про що свідчить значне зростання вмісту одного із кінцевих продуктів ПОЛ- МДА (Рис.1).

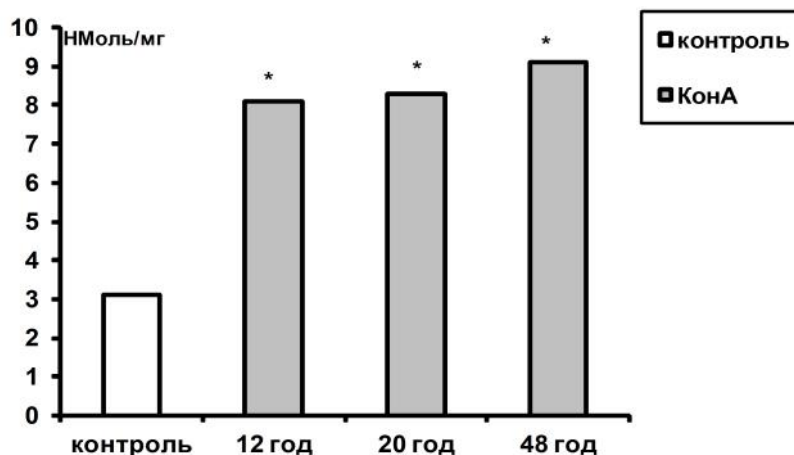


Рис.1. Вміст малонового діальдегіду в гомогенаті тканини печінки мишей в динаміці КонА – індукованого гепатиту. *P<0,001 відносно контролю.

Встановлено, що вже через 12 год після введення КонА вміст МДА в тканині печінки зростає в 3 рази по відношенню до контролю ($P < 0,001$). Цей показник зберігається на такому ж високому рівні і в подальші строки (через 20 та 48 год). Надлишкове утворення МДА в процесі ПОЛ вважають маркером оксидативного стресу, крім того він є мутагеном і має виражену цитотоксичність, яка призводить до змін в структурі клітинної мембрани і може приводить до її розриву [13]. В наших попередніх дослідженнях [4] введення КонА призвело до підвищення активності ферменту аланінамінотрансферази в сироватці крові мишей в усі строки досліджень, що свідчить про порушення цілісності плазматичних мембран гепатоцитів. Окиснені ліпіди мають антигенні властивості, запускаючи аутоімунні процеси пошкодження тканин. Таким чином, підвищення концентрації МДА в печінці може бути одним із маркерів гепатоцелюлярного ушкодження та патогенетичних факторів за умов аутоімунного гепатиту.

Захист тканин і органів від агресивної дії вільних радикалів і продуктів їх діяльності забезпечується дією антиоксидантної системи. Так, деструктивному впливу МДА протистоїть внутрішньоклітинна антиоксидантна система, до якої входять антиокислювальні ферменти - супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіонпероксидаза. Ці ферменти розглядаються як перша лінія антиоксидантної системи захисту від АФК, що утворюються при оксидативному стресі [13]. Їх активність, зокрема каталази, використовується як показник оцінки антирадикального захисту організму. В той же час зниження активності каталази може відігравати важливу роль в етіології ряду захворювань, наприклад, хвороби Паркінсона [12]. Цей фермент широко поширений в тканинах, але особливо його багато в печінці. Каталаза відноситься до ферментів, які мають високу активність і найбільш довго її зберігають [2]. Отже визначення її активності, як показника антиоксидантного захисту, має важливе значення для з'ясування механізмів розвитку оксидативного стресу в печінці.

Нами встановлено, що через 12 та 20 год після введення КонА активність каталази в гомогенаті тканини печінки вірогідно не відрізнялася від контрольних значень і становила у контролі $101,7 \pm 16$, через 12 год дії КонА – $98,6 \pm 13,8$; через 20 год – $110,1 \pm 16,7$ мкмоль/хв·мг білка. Даний показник суттєво змінився лише через 48 год після введення КонА і становив $58,8 \pm 7,5$ мкмоль/хв·мг білка ($P < 0,001$ по відношенню до контролю та 12 і 20 год дії КонА). Слід зазначити, що найбільш значне порушення рівноваги між процесами ПОЛ і активністю антиоксидантного захисту виявилось через 48 год після ін'єкції КонА тваринам. Очевидно, що високий рівень ПОЛ на протязі 48 год після введення КонА

мишам є одним з механізмів, який призводить до виснаження системи антиоксидантного захисту, зокрема ферменту каталази. Таким чином, за умов КонА-індукованого гепатиту відбувалося порушення в печінці мишей рівноваги між процесами ПОЛ і активністю антиоксидантного захисту в бік активації ліпопероксидації.

З метою обмеження розвитку оксидативного стресу та активації NF- κ B, яка встановлена нами при КонА-індукованому гепатиті у мишей [1], застосували фармакологічний підхід з використанням блокатора активації транскрипційного фактора NF- κ B – андрографоліду, який має також і антиоксидантні властивості [10]. Серію досліджень з андрографолідом проводили в строки з максимальними змінами показників МДА і каталази – на 20-й і 48-й год імунного пошкодження печінки мишей КонА. Через 20 год після введення КонА, в умовах дії андрографоліду відбувалося вірогідне зниження високого вмісту МДА в гомогенаті тканини печінки до рівня контрольних значень. Однак на 48-й год розвитку імунного запалення в печінці не спостерігалось впливу андрографоліду на вміст МДА, який залишався істотно вищим, ніж в контролі (Рис.2).

Дія андрографоліду на активність каталази проявлялася в той же строк, що і ефект даної речовини на вміст МДА (20 год після введення КонА). Спостерігалось зменшення активності даного ферменту (Рис.3).

На 48-й годині розвитку імунного запалення в печінці андрографолід не змінював зниженої в цей строк активності антиоксидантного ферменту.

Таким чином, інгібітор активації NF- κ B – андрографолід мав модулюючу дію на проокисно-антиоксидантний гомеостаз за показниками вмісту МДА і каталази, що було виявлено на 20-й годині розвитку імунопатологічного процесу в тканинах печінки. Дані ефекти не спостерігалися через 48 годин, коли введення КонА призводило до значного пригнічення активності каталази. Дане дослідження виявило протективну та антиоксидантну дію андрографоліду за показниками вмісту МДА. Однак, андрографолід не мав позитивного ефекту на активність каталази, що свідчить про глибину порушень даної ланки системи антиоксидантного захисту за умов експериментального імунного ушкодження печінки.

Отримані дані свідчать про дисбаланс у системі «ПОЛ та антиоксидантний захист» з суттєвою перевагою у бік рівня окиснювальної активності в умовах розвитку гепатиту Т-клітинного генезу. Недостатність або порушення механізмів інактивації перекисних продуктів сприяє їх надмірному вмісту. Ймовірно, не стільки рівень накопичення продуктів ПОЛ в тканинах печінки, скільки функціональна неспроможність клітинних ферментів

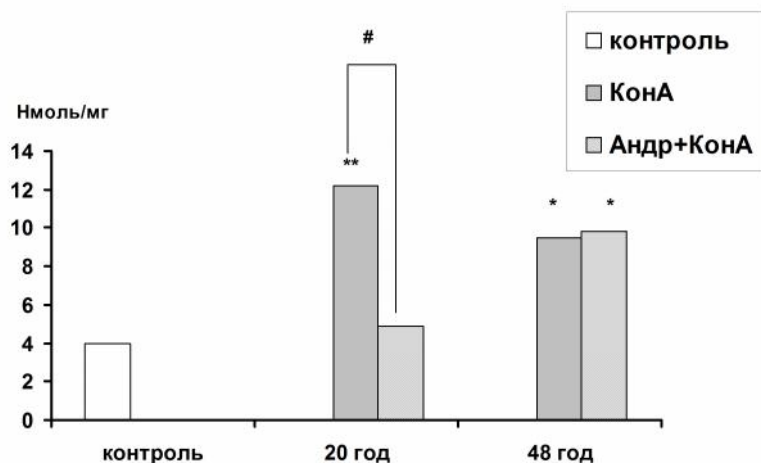


Рис.2. Вміст малонового діальдегіду в гомогенаті тканини печінки мишей в динаміці КонА – індукованого гепатиту та на тлі дії андрографоліду. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ відносно контролю; # $P < 0,001$ відносно дії КонА.

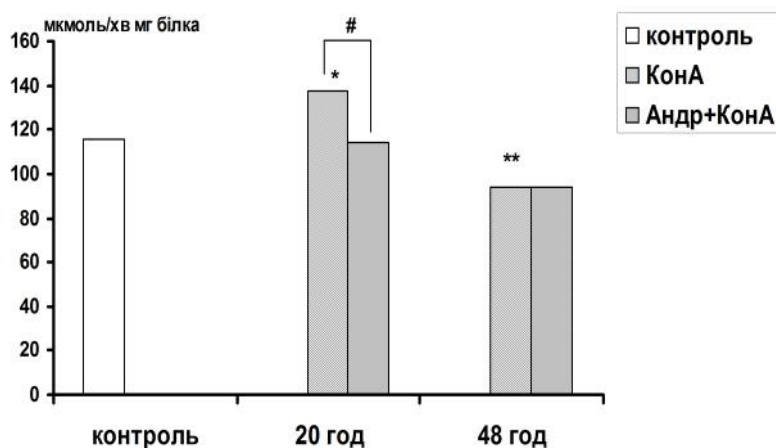


Рис.3. Активність каталази в гомогенаті тканин печінки мишей в динаміці КонА-індукованого гепатиту та на тлі дії андрографоліду. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,001$ відносно контролю та 20-ої години КонА-індукованого гепатиту; # $P < 0,01$ відносно дії КонА.

антиоксидантного захисту є визначальним у порушенні окисного гомеостазу за умов

КонА індукованого гепатиту. Це призводить до оксидативного стресу при гепатиті Т-клітинного генезу і створює умови для посилення та подальшої підтримки запального процесу в тканинах печінки.

ВИСНОВКИ

1. Введення КонА спричиняє оксидативний стрес, про що свідчить значне підвищення вмісту МДА та пригнічення активності каталази в печінці мишей.

2. Виявлено особливості розвитку змін ПОЛ та антиоксидантного захисту в печінці: вміст МДА підвищувався вже через 12 год та зберігався на високому рівні на 20-й і 48-й год імунного гепатиту, тоді як пригнічення активності каталази спостерігалось значно пізніше, на 48 год.

3. Інгібітор активації NF- κ B – андрографолід мав модулюючу дію на проокисно-антиоксидантний

гомеостаз в печінці при її імунному ураженні, а зменшення вмісту МДА свідчить про його антиоксидантний ефект за даних умов.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алексеева И.Н., Макогон Н.В., Алексюк Л.И. и др. Роль транскрипционного фактора NF- κ B и ядерного фермента поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) в механизмах развития экспериментального иммунного воспаления печени // Научные труды ШСъезда физиологов СНГ. – Под ред. И.А. Григорьева, О.А. Кришталя, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили. – М.: Медицина-Здоровье. - 2011. - 336с.

2. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майоров И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988, №1. – С.16-19.

3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии. – М., 1977. – С.66-68.

4. Павлович С.И., Брызгина Т.М., Макогон Н.В. и др. И.Н. Инфильтрация печени клетками иннатного

и адаптивного иммунитета и их гибель в динамике экспериментального иммунного конканавалин А-индуцированного гепатита //Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол.колопроктол. – 2011. №6. – С.42-48.

5. Bao Z, Guan S, Cheng C. et al. A novel antiinflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway //Am J Respir Crit Care Med. – 2009. - 179(8). – P.657-665.

6. Czaja AJ. Current concepts in autoimmune hepatitis // Ann Hepatol. – 2005.- 4(1).- P.6-24.

7. Handa SS, Sharma A. Hepatoprotective activity of andrographolide against galactosamine paracetamol intoxication in rats //Indian. J.Med Res. – 1990. - 92. – P. 284-282.

8. Hidalgo M.A., Romero A, Figueroa J. et al. Andrographolide interferes with binding of nuclear factor-kappa B to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells //Br.J.Pharmacol. – 2005.-144(5). – P.680-686.

9. Iruretagoyena M.I., Tobar J.A., González P.A. et al. Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in

the mouse //J Pharmacol Exp Ther. – 2005. -312(1). – P.366-372.

10. Lin FL, Wu SJ, Lee SC, Ng LT. Antioxidant, antioedema and analgesic activities of *Andrographis paniculata* extracts and their active constituent andrographolide //Phytother Res. – 2009. - 23(7). – P.958-964.

11. Neurath MF, Becker C, Barbuiescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut //Gut. – 1998. - 43(6). – P.856-860.

12. Nazroplu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system //J Recept Signal Transduct Res.–2012.- 32(3). – P.134-141.

13. Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis //Indian J Exp Biol. – 2002. - 40(11). - P.1213-1232.

14. Shen Y.C., Chen C.F., Chiou W.F. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in anti-inflammatory effect //Br.J. Pharmacol. - 2002. - 135(2). – P.399-406.

15. Washington M.K. Autoimmune liver disease: overlap and outliers //Modern Pathology – 2007. – 20. – S15-S30.