

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ У ЖИВОТНЫХ ПРИ ПРИЕМЕ КАРПРОФЕНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Косарева П.В.¹, Лазаренко Л.В.²

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, e-mail: perm-bagira@yandex.ru;

²ФКОУ ВО Пермский институт ФСИН России, Пермь, e-mail: lazarenko.mila2012@yandex.ru

Целью исследований было изучить и провести количественную оценку экспрессии рецепторов цитокинов (интерлейкина-2 (IL-2R α) и фактора некроза опухоли α (TNF α R1)) в паренхиме печени крыс с использованием иммуногистохимических методов. Использовали образцы печени, полученные от экспериментальных моделей с НПВП-гепатопатией, индуцированной длительным применением карпрофена. Для проведения исследований были сформированы четыре группы животных, которым вводили разные дозировки препарата: терапевтическую, двукратную, пятикратную и десятикратную. В предварительно проведенных гистологических исследованиях были выявлены морфологические нарушения в паренхиме печени, которые указывали на развитие токсической гепатопатии. В связи с мембранной локализацией рецепторов цитокинов степень экспрессии оценивали по интенсивности окраски и количеству позитивно окрашенных клеток в печени. Результаты исследований показали увеличение степени экспрессии IL-2R α и TNF α R1 в печени у животных, которым вводили терапевтическую и двукратную дозы карпрофена. У группы, получавшей двукратную дозу, экспрессия была наиболее выражена, то есть изменения имели дозозависимый характер. У животных, которым карпрофен вводили в пяти- и десятикратной дозе, экспрессия рецепторов снижалась, что может быть связано с повреждением клеточной мембраны гепатоцитов и наличием обширных некрозов, выявленных при исследовании. Результаты проведенных исследований продемонстрировали участие интерлейкина-2 и фактора некроза опухоли α (иммунных компонентов) в патогенезе НПВП-гепатопатии, индуцированной длительным приемом карпрофена. Повышение экспрессии TNF α R1 свидетельствует о готовности гепатоцитов к апоптозу, обусловленному действием фактора некроза опухоли α . Экспрессия IL-2R α в паренхиме печени может быть объяснена наличием аутоиммунных механизмов при НПВП-гепатопатии.

Ключевые слова: карпрофен, экспрессия рецепторов, фактор некроза опухоли α , интерлейкин-2

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF INFLAMMATORY CYTOKINE RECEPTORS IN THE LIVER IN ANIMALS WHEN CARPROPHEN ACCEPTED IN EXPERIMENT

Kosareva P.V.¹, Lazarenko L.V.²

¹Perm State University, Perm, e-mail: perm-bagira@yandex.ru;

²Perm Institute of the Federal Penal Service, Perm, e-mail: lazarenko.mila2012@yandex.ru

The aim of the research was to study and quantify the expression of cytokine receptor interleukin-2 (IL-2R α) and tumor necrosis factor α (TNF α R1) in the rat liver parenchyma using immunohistochemical methods. Used samples of the liver, obtained from experimental models with NSAIDs-hepatopathy, induced by prolonged use of carprofen. For researches, four groups of animals were formed, which were injected with different dosages of the drug: therapeutic, double, five-fold and ten-fold. In preliminary histological studies, morphological abnormalities in the liver parenchyma were identified, indicating the development of toxic hepatopathy. In connection with the membran localization of receptors, the degree of expression was assessed by the intensity of staining and the number of positively stained cells in the liver parenchyma. The results of studies showed an increase in the expression of IL-2R α and TNF α R1 in the liver in animals that were given a therapeutic and double dose of carprofen, in the group that received a double dose, the expression was most pronounced, that is, the changes had a dose-dependent effect. In animal that were injected with a five- and tenfold dose of carprofen, the degree of expression of the receptors was significantly reduced, which may be due to the presence of extensive necrosis detected during histological studies, and damage to the cell membrane of hepatocytes. The results of the studies demonstrated the involvement of interleukin-2 and tumor necrosis factor α (immune components) in the pathogenesis of NSAIDs-hepatopathy induced by prolonged administration of carprofen. The increased expression of TNF α R1 indicates that hepatocytes are ready for apoptosis due to the action of tumor necrosis factor α . The expression of IL-2R α in the liver parenchyma can be explained by the presence of autoimmune

В настоящее время важное место в клинической практике занимает проблема гепатотоксичности нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Многие специалисты приходят к выводу об очевидной взаимосвязи поражения печени с приемом НПВП [1–3]. Карпрофен относится к селективным НПВП, влияет преимущественно на фермент циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2). Имеются сведения, что при применении карпрофена у животных наблюдается развитие побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, меньше информации имеется о гепатотоксическом действии карпрофена [4].

В научной литературе имеется описание нескольких механизмов лекарственного поражения печени: прямое токсическое действие препарата, токсическое действие метаболитов лекарственных средств, а также иммунные и аллергические поражения [5]. Исследования, посвященные данной проблеме, выявили отдельные механизмы повреждения органа на клеточном и субклеточном уровнях. Особый интерес в патогенезе НПВП-гепатопатии представляет участие цитокинов, вовлеченных в различные патофизиологические реакции, – интерлейкина-2 (ИЛ-2) и фактора некроза опухоли α (ФНО α).

Известно, что ФНО α выступает в качестве одного из основных регулирующих белков на этапах формирования воспаления и иммунного ответа, избыточная продукция этого цитокина вызывает токсический эффект у клеток тканей [6, 7]. Таким образом, изучение данного аспекта патогенеза НПВП-индуцированной гепатопатии позволит расширить понимание факторов риска при данной патологии.

Цель исследований – изучение и количественная оценка экспрессии рецепторов цитокинов: интерлейкина-2 и фактора некроза опухоли α – в паренхиме печени у экспериментальных моделей (крыс) с НПВП-гепатопатией, индуцированной длительным приемом карпрофена в различных дозировках.

Материалы и методы исследования. Для иммуногистохимических исследований использовали образцы печени, полученные от нелинейных белых крыс (самцов и самок с массой тела 200–250 г) с моделированной НПВП-гепатопатией. В соответствии с целью исследований в течение 21 дня животным вводили карпрофен (Римадил Р, Pfizer Animal Health, США) per os 1 раз в день за 1 час до кормления. Опытным группам применяли препарат в дозах: 4 мг/кг (терапевтическая доза, n=26); 8 мг/кг (n=28), 20 мг/кг (n=22), 40 мг/кг (n=24). Для сравнительного контроля использовали интактных животных (n=21).

Исследования проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены приказом Министерства здравоохранения РФ № 708

от 23 августа 2010 г.) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г.

Для изучения иммуногистохимической экспрессии рецепторов интерлейкина-2 (IL-2R α) и фактора некроза опухоли α (TNF α R1) использовали антитела TNFR1 (poly) 100 μ l, bs-2941R, Rabbit Anti-TNF Receptor I Polyclonal Antibody (Bioss) и IL-2R α (poly) 1 ml (M-19), sc-666 (Santa Cruz Biotechnology, INC), видоспецифичные к антигенам тканей крысы. Антитела выявляли при использовании системы детекции Uno Vue detection system (100 tests, UMR 100PD); для изготовления препаратов использовали стекла с полилизинным покрытием Menzel.

Препараты просматривали на светооптическом уровне, положительный результат идентифицировали по коричневому окрашиванию. Проводили полуколичественную оценку экспрессии по двум критериям. В «крестах» оценивали интенсивность окрашивания: от слабopоложительной (+) до резко положительной (++++); незначительное очаговое окрашивание оценивали как « \pm » [8]. В баллах оценивали число позитивно окрашенных клеток: 2 балла – до 20%, 4 балла – от 20 до 40%, 6 баллов – более 40% клеток [9]. Достоверность различий результатов определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Предварительно были проведены гистологические исследования, в которых выявили морфологические нарушения паренхимы печени. Из обнаруженных нарушений наиболее распространенными были сосудистые расстройства, которые проявлялись полнокровием центральных вен печеночных долек и расширением синусоидных капилляров, они обнаруживались у всех животных опытных групп, получавших разные дозировки карпрофена. У групп, получавших дозы препарата выше терапевтической, наблюдалось полнокровие сосудов междольковых триад.

Зернистая дистрофия гепатоцитов проявлялась у животных всех опытных групп. У группы, получавшей пятикратную дозировку карпрофена, в единичных клетках наблюдались признаки вакуольной и крупнокапельной жировой дистрофии гепатоцитов. На участках паренхимы печени наблюдались ограниченные некрозы, вокруг некрозов визуализировались очаги регенерации гепатоцитов [10]. Следовательно, длительный прием карпрофена вызывал патоморфологические изменения в печени, характерные для токсического поражения.

Оценку экспрессии рецепторов интерлейкина-2 (IL-2R α) и фактора некроза опухоли α (TNF α R1) в паренхиме печени проводили по интенсивности окрашивания, которая характеризует интенсивность экспрессии рецепторов цитокинов, и по числу окрашенных клеток (количественная характеристика действия цитокинов на печень).

Экспрессия IL-2R α . Просмотр гистологических препаратов показал, что в ткани

печени у интактных животных клетки наблюдались единичные позитивно окрашенные клетки, что оценивалось на $1,82 \pm 0,11$ балла (табл. 1).

Таблица 1

Оценка экспрессии IL-2R α в печени экспериментальных животных

Группа животных	Полуколичественная оценка	
	В «+» (интенсивность окрашивания)	В баллах (число позитивно окрашенных клеток)
Интактных	±	$1,82 \pm 0,11$
Получавших дозу 4,0 мг/кг	+++	$4,87 \pm 0,64^*$ (p=0,000)
Получавших дозу 8,0 мг/кг	++++	$5,48 \pm 0,92^*$ (p=0,001)
Получавших дозу 20,0 мг/кг	+++	$4,53 \pm 0,48^*$ (p=0,000)
Получавших дозу 40,0 мг/кг	++	$3,56 \pm 0,29^*$ (p=0,000)

* p<0,05 по сравнению с животными контрольной группы.

Во всех опытных группах (различающихся дозировками карпрофена) паренхима печени и часть желчных протоков портальных трактов были иммунопозитивны к IL-2R α (рис. 1). Увеличивалось число IL-2R α -позитивных клеток: наибольшее увеличение было в группе, получавшей двукратную дозу, – в 3 раза (p<0,05), а в группе, получавшей десятикратную дозу, – приблизительно в 2 раза (p<0,05).

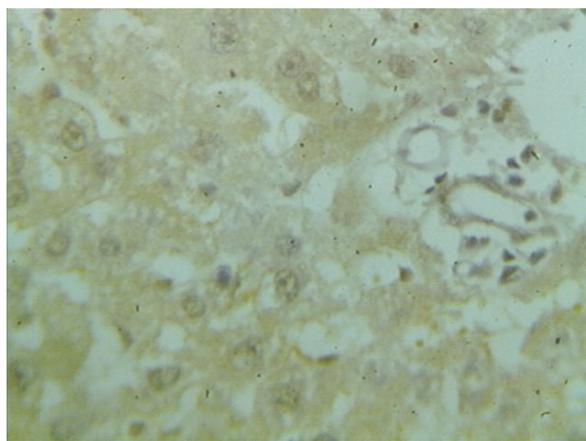


Рис. 1. Экспрессия IL-2R α в паренхиме печени животного, получавшего карпрофен в дозе 40,0 мг/кг, х600

Интенсивность экспрессии IL-2R α между группами отличалась (табл. 1). Наиболее выраженной она была у животных, получавших двукратную дозу карпрофена (++++), наименьшей – в группе, получавшей десятикратную дозу (++).

Экспрессия TNF α R1. У интактных животных TNF α R1-позитивные клетки наблюдались в качестве единичных гепатоцитов и клеток эпителия желчных протоков портальных трактов, что составило $1,79 \pm 0,14$ балла (рис. 2, табл. 2).

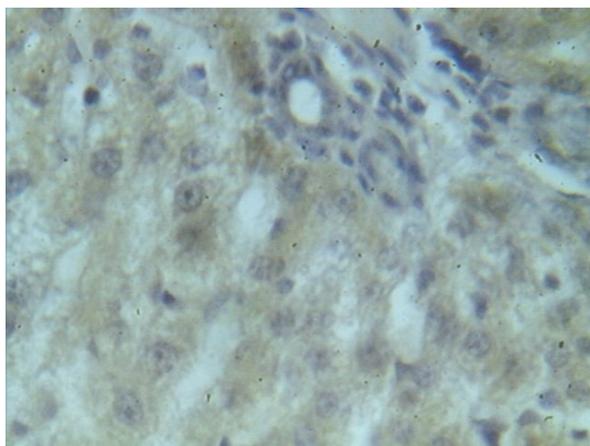


Рис. 2. Иммунонегативная к TNFαR1 паренхима печени интактного животного, х600

Таблица 2

Оценка экспрессии TNF-αR1 в печени экспериментальных животных

Группа животных	Полуколичественная оценка	
	В «+» (интенсивность окрашивания)	В баллах (число позитивно окрашенных клеток)
Интактных	±	1,79 ± 0,14
Получавших дозу 4,0 мг/кг	+++	5,93±0,54* (p=0,000)
Получавших дозу 8,0 мг/кг	++++	5,98±0,67* (p=0,000)
Получавших дозу 20,0 мг/кг	++	5,81±0,74* (p=0,000)
Получавших дозу 40,0 мг/кг	++	5,73±0,56* (p=0,000)

* p<0,05 по сравнению с животными контрольной группы.

У животных всех опытных групп, получавших карпрофен, наблюдалось иммунопозитивное окрашивание как гепатоцитов, так и большей части желчных протоков портальных трактов (рис. 3). Во всех группах приблизительно в 3,7 раза (p<0,05 по сравнению с интактными животными) увеличивалось количество окрашенных клеток в паренхиме печени. Высокая степень окрашивания (++++) наблюдалась в группе животных, получавших карпрофен в двукратной дозировке (рис. 3). Значительно меньше (++) была окраска паренхимы печени у крыс, получавших пяти- и десятикратную дозы.

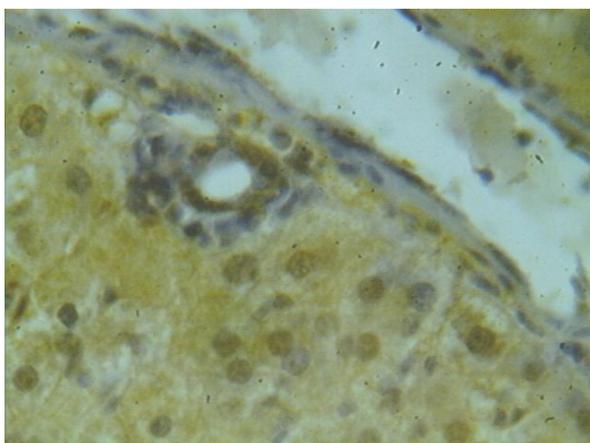


Рис. 3. Экспрессия TNF α R1 в паренхиме печени животного, получавшего карпрофен в дозе 8,0 мг/кг массы тела, x150

Выявленное нами повышение экспрессии рецепторов цитокинов в печени у экспериментальных животных демонстрирует участие интерлейкина-2 (ИЛ-2) и фактора некроза опухоли (ФНО α) в развитии НПВП-гепатопатии, индуцированной длительным приемом карпрофена.

Данные исследований, представленные в научной литературе, показывают, что болезни печени развиваются при участии ряда цитокинов, таких как ФНО α , ИЛ-2, ИЛ-6, при этом ФНО α играет ключевую роль [11, 12]. В исследованиях на экспериментальных моделях мышей было продемонстрировано участие ФНО α в индукции развития аутоиммунного гепатита, причем применение ингибиторов ФНО α препятствовало его развитию [6].

ФНО α синтезируется несколькими типами клеток (преимущественно макрофагами), он участвует во многих клеточных процессах (плейотропное действие). Действие ФНО α на клеточные реакции осуществляется через специфические рецепторы, локализующиеся на мембране клетки.

В литературе описаны пять сигнальных путей, через которые ФНО α реализует свое действие на клетку [6, 7]. Активация апоптоза происходит, когда ФНО α воздействует на клетку-мишень через рецептор TNF α R1, экспрессирующийся на ее поверхности. В структуре рецептора имеется внутриклеточный домен смерти (DD). При взаимодействии ФНО α с рецептором активируется TNFR-ассоциированный белок домена смерти (TRADD), затем сигнал переходит на Fas-ассоциированный с доменом смерти белок (FADD), который в свою очередь активирует внутриклеточные каспазы-8 и каспазы-3, это приводит к апоптозу клетки [6].

Проявляющаяся экспрессия TNF α R1 свидетельствует о готовности гепатоцитов к апоптозу, обусловленному действием цитокина. В представленных нами результатах исследований показано, что проявления экспрессии TNF α R1 обнаруживались у животных, получавших препарат начиная с терапевтической дозы.

Предполагается, что иммунные реакции при лекарственных гепатопатиях могут быть обусловлены продуктами метаболизма, которые образуются в результате соединения лекарственного препарата с гемсодержащим цитохромом P450, а затем в виде везикул мигрируют к клеточной оболочке; эти соединения могут вызывать иммунный ответ в виде воздействия на клетку цитолитических Т-лимфоцитов и цитокинов [5].

По-видимому, экспрессия IL-2R α в паренхиме печени при длительном приеме карпрофена может быть объяснена наличием аутоиммунных механизмов. ИЛ-2

синтезируется Т-лимфоцитами в ответ на стимуляцию антигенами. Он усиливает пролиферацию регуляторных Т-лимфоцитов (Т-reg клеток) и экспрессию соответствующих для ИЛ-2 рецепторов [13]. Таким образом, ИЛ-2 играет основную роль в регуляции Т-клеточного ответа и является медиатором иммунитета.

Действие ИЛ-2 осуществляется через гетеротримерный комплекс рецептора, состоящий из трех субъединиц: рецептор интерлейкина-2 α (CD25), рецептор интерлейкина-2 β (CD122) и рецептор интерлейкина-2 γ (CD132). ИЛ-2R α (CD25, α -цепь рецептора) конститутивно экспрессируется на Т-reg клетках, которые ассоциированы с различными аутоиммунными заболеваниями [14].

Анализ полученных результатов исследований показал, что экспрессия TNF α R1 и ИЛ-2R α в печени повышалась у животных, получавших карпрофен уже в терапевтической дозировке, но наиболее выраженной она была в группе у животных, получавших двукратную дозу препарата. Таким образом, проявления экспрессии TNF α R1 и ИЛ-2R α имели дозозависимый характер.

У животных в группах, которым вводили пяти- и десятикратную дозу карпрофена, степень экспрессии рецепторов снижалась. Аналогичная закономерность иммуногистохимических изменений в печени наблюдалась нами ранее, при моделировании НПВП-гепатопатии, индуцированной приемом нимесулида [15]. Такая ситуация может быть обусловлена большей морфологической сохранностью печени у животных, получавших невысокие дозы препарата, тогда как низкая степень экспрессии TNF α R1 у животных, получавших пяти- и десятикратную дозу препарата, может быть связана с повреждением клеточной мембраны гепатоцитов и наличием обширных некрозов, развитие которых может происходить из-за прямого токсического действия карпрофена на печень.

Заключение. Результаты проведенных исследований продемонстрировали участие интерлейкина-2 и фактора некроза опухоли α (иммунных компонентов) в патогенезе НПВП-гепатопатии, индуцированной длительным приемом карпрофена. Повышение экспрессии TNF α R1 свидетельствует о готовности гепатоцитов к апоптозу, обусловленному действием фактора некроза опухоли α . Экспрессия ИЛ-2R α в паренхиме печени может быть объяснена наличием аутоиммунных механизмов при НПВП-гепатопатии.

При анализе результатов обнаружено, что степень проявления экспрессии ИЛ-2R α и TNF α R1 имеет дозозависимый характер. Наибольшая экспрессия отмечалась у животных, получавших двукратную дозу карпрофена, что может быть связано с большей морфологической сохранностью печени. У животных, получавших высокие дозы препарата, снижение экспрессии может быть обусловлено повреждением мембраны гепатоцитов и развитием некрозов.

Список литературы

1. Молочкова О.В., Ковалев О.Б., Учайкин В.Ф., Конев В.А., Снеткова Ю.С. Лекарственный гепатит у детей // Детские инфекции. 2017. № 1. С. 42-50.
2. Donati M., Conforti A., Lenti M.C., Capuano A., Bortolami O., Motola D., Moretti U., Vannacci A., Rafaniello C., Vaccheri A., Arzenton E., Bonaiuti R., Sportiello L., Leone R. Risk of acute and serious liver injury associated to nimesulide and other NSAIDs: data from drug-induced liver injury case-control study in Italy. Br. J. Clin. Pharmacol. 2016. Vol. 82 (1). P. 238-248.
3. Schmeltzer P.A., Kosinski A.S., Kleiner D.E., Hoofnagle J.H., Stolz A., Fontana R.J., Russo M.W. Liver injury from nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the United States. Liver Int. 2016. Vol. 36 (4). P. 603-609.
4. Кемельман Е.Л., Варенов К.С., Архипова А.А. Оценка частоты возникновения гастроэнтерологических осложнений при назначении собакам карпрофена в комбинации с омепразолом // Российский ветеринарный журнал. 2015. № 1. С. 16-19.
5. Полунина Т.Е., Маев И.В. Лекарственные поражения печени // Гастроэнтерология. Приложение к журналу Consilium medicum. 2011. № 2. С. 54-60.
6. Барановский А.Ю., Марченко Н.В., Мительглик У.А., Райхельсон К.Л. Роль фактора некроза опухоли альфа в развитии аутоиммунной патологии печени: нерешенная проблема // Практическая медицина. 2014. № 1 (77). С. 15-19.
7. Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А. Роль фактора некроза опухолей альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональными антителами // Медицинская иммунология. 2018. № 20 (6). С. 797-806.
8. Козлова И.В., Липатова Т.Е., Афонина Н.Г., Кветной И.М. Гастропатия, индуцированная нестероидными противовоспалительными препаратами, у больных остеоартрозом: роль некоторых факторов диффузной эндокринной системы желудка в ее возникновении // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии. 2006. № 1. С. 47-53.
9. Коган Е.А., Низяева Н.В., Демура Т.А., Ежова Л.С., Унанян А.Л. Автономность роста очагов аденомиоза: иммуногистохимические особенности экспрессии маркеров // Иммунология. 2011. № 12. С. 311-325.
10. Лазаренко Л.В., Косарева П.В. Гистологическая характеристика ткани печени у крыс, длительно получавших карпрофен // Здоровье и образование в XXI веке. 2017. Т. 19. № 12. С. 257-263.
11. Куликов В.Е., Тонеева М. А., Корнилова В.А., Антонова Э.Р., Емелина Т.А.

Концентрация и динамика интерлейкина-2, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли альфа в крови при хронических заболеваниях печени // Медицинские науки. Клиническая медицина. 2015. № 3 (35). С. 71-77.

12. Скуратов А.Г., Лызиков А.Н., Воропаев Е.В., Осипкина О.В. Уровень интерлейкина-6 как показатель тяжести цирроза печени и портальной гипертензии // Проблемы здоровья и экологии. 2016. № 4 (50). С. 110-114.

13. Smith K.A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. Science. 1988. Vol. 240 (4856). P. 1169-1176.

14. Belot M.-P., Fradin D., Mai N., Le Fur S., Zelenika D., Kerr-Conte J., Pattou F., Lucas B., Bougneres P. CpG Methylation Changes within the IL2RA Promoter in Type 1 Diabetes of Childhood Onset. PLOS ONE. 2013. Vol. 8 (7). e68093. P. 1-7.

15. Лазаренко Л.В., Косарева П.В., Самоделкин Е.И., Хоринко В.П. Фактор некроза опухоли в патогенезе НПВП-ассоциированной гепатопатии // Журнал анатомии и гистопатологии. 2017. Т. 6. № 3. С 50-55.