

УДК 615.276.03.015.4.076.9

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ И ИНТЕРЛЕЙКИНА В ТКАНИ ПЕЧЕНИ У ЖИВОТНЫХ, ДЛИТЕЛЬНО ПОЛУЧАВШИХ НИМЕСУЛИД

Л.В. Лазаренко^{1*}, П.В. Косарева², Е.И. Самodelкин², В.П. Хоринко²

¹Пермский институт Федеральных служб исполнения наказаний России,

²Пермский государственный медицинский университет им. академика. Е.А. Вагнера, Россия

STUDYING OF TUMOR NECROSIS FACTOR AND INTERLEUKIN RECEPTORS EXPRESSION IN HEPATIC TISSUE OF ANIMALS PROTRACTEDLY RECEIVING NIMESULIDE

L.V. Lazarenko^{1*}, P.V. Kosareva², E.I. Samodelkin², V.P. Khorinko²

¹Perm Institute of Federal Penitentiary Service of Russia,

²Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Цель. Изучение иммуногистохимической экспрессии TNF α R1 и IL-2R α в ткани печени у животных (крыс) с моделированным НПВП-ассоциированным гепатитом.

Материалы и методы. Исследование экспрессии TNF α R1 и IL-2R α в ткани печени экспериментальных животных проводили с использованием антител 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), антитела видоспецифичны к антигенам тканей крысы. Для выявления антител применяли системы детекции Uno Vue detection system, 100 tests, UMR 100PD, использовали стекла с полилизинным покрытием Menzel.

Исследования проводили, используя ткань печени у животных опытных групп, которым нимесулид (Найз®) вводили в течение 21 дня в следующих дозировках: 0,5 мг/кг (терапевтическая доза) ($n = 25$); 2,5 мг/кг ($n = 20$); 5 мг/кг ($n = 24$). В качестве контрольной группы использовали интактных животных ($n = 21$).

Антиген-позитивные клетки идентифицировали по появлению коричневого окрашивания при просмотре препаратов на светооптическом уровне. Результаты реакции оценивались полуколичественным методом – в «крестах» (в связи с локализацией маркеров на клеточной мембране) и по числу позитивно окрашенных клеток – в баллах. Выраженность экспрессии маркеров «в крестах» оценивали, просматривая подряд поля зрения под микроскопом (от 10 до 20 в каждом гистологическом срезе); в зависимости от интенсивности окрашивания поля зрения относили к четырем группам: с отрицательной реакцией (–), слаболожительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++). Оценка экспрессии маркеров проводилась по 6-балльной системе: 2 балла – до 20 % окрашенных клеток; 4 балла – от 20 до 40 % окрашенных клеток; 6 баллов – более 40 % окрашенных клеток.

© Лазаренко Л.В., Косарева П.В., Самodelкин Е.И., Хоринко В.П., 2017

тел. +7 (342) 228 65 04

e-mail: mail@pifsin.ru

[Лазаренко Л.В. (контактное лицо) – кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры зоотехнии; Косарева П.В. – доктор медицинских наук, заведующая отделом морфологических и патофизиологических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории; Самodelкин Е.И. – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической физиологии; Хоринко В.П. – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела морфологических и патофизиологических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории].

Результаты. При исследовании иммуногистохимической экспрессии TNF α R1 в ткани печени у крыс с моделированным НПВП-ассоциированным гепатитом во всех экспериментальных группах (различающихся дозировками нимесулида) наблюдалась иммунопозитивность паренхимы печени и единичных клеток эпителия желчных протоков портальных трактов. Таким образом, при длительном приеме нимесулида имеет место готовность эпителиоцитов паренхимы печени к апоптозу, обусловленному действием фактора некроза опухоли.

Выводы. Наблюдалась экспрессия IL-2R α в паренхиме печени и части желчных протоков портальных трактов у животных всех экспериментальных групп, что может объясняться наличием аутоиммунных процессов. Повышение экспрессии TNF α R1 и IL-2R α в ткани печени отмечалось у животных опытной группы, получавших пятикратную дозу нимесулида. Снижение экспрессии рецепторов у животных, получавших десятикратную дозу, может быть связано с наличием обширных некрозов в паренхиме печени.

Ключевые слова. Нестероидные противовоспалительные препараты, НПВП-гепатопатия, нимесулид, экспрессия TNF α R1, экспрессия IL-2R α .

Aim. To study the immunohistochemical expression of TNF α R1 and IL-2R α in hepatic tissue of animals (rats) with modeled NSAID-associated hepatitis.

Materials and methods. The study of TNF α R1 and IL-2R α in the hepatic tissue of experimental animals was carried out using antibodies TNFR1 (poly) 100 μ l, bs-2941R, Rabbit Anti-TNF Receptor I Polyclonal Antibody (Bioss) and IL-2R α (poly) 1 ml (M-19), sc-666 (Santa Cruz Biotechnology, INC), antibodies species-specific to rat tissue antigens. To reveal the antibodies, Uno Vue detection system, 100 tests, UMR 100PD, object-plates with polylysine coating Menzel were applied. The study was performed using the hepatic tissue of animal of experimental groups, who were administered nimesulide (Naiz®) during 21 days in the following doses: 0,5 mg/kg (therapeutic dose) ($n = 25$); 2,5 mg/kg ($n = 20$); 5 mg/kg ($n = 24$). Intact animals ($n = 21$) were used as the control. Antigen-positive cells were identified by the appearance of brown staining while examining preparations at light-optic level. The results of this reaction were assessed with semiquantitative method – in “crosses” (in connection with markers localization on the cellular membrane) and by the number of positively stained cells – in scores. Manifestation of markers expression was evaluated “in crosses” when successively examining the fields of vision under the microscope (from 10 to 20 in each histological section); according to the intensity of staining, the fields of vision were attributed to 4 groups: with negative reaction (–), weakly positive (+), positive (++) and distinctly positive (+++). The markers expression was assessed by a six-score system: 2 scores – up to 20% of stained cells; 4 scores – from 20 to 40 % of stained cells; 6 scores – more than 40 % of stained cells.

Results. When studying immunohistochemical expression of TNF α R1 in the hepatic tissue of rats with modeled NSAID-associated hepatitis, in all experimental groups there was observed immunopositeness of the liver parenchyma and that of some cells of portal tract bile-ducts epithelium. Thus, when using nimesulide for a long time, the readiness of liver parenchyma epithelial cells to apoptosis, conditioned by the action of tumor necrosis factor, was stated.

Conclusions. There was observed IL-2R α expression in the liver parenchyma and in a part of bile-ducts of portal tracts among animals of all experimental groups that can be explained by the presence of autoimmune processes. Elevated TNF α R1 and IL-2R α expression in the liver tissue was noted in animals of experimental group, who received a fivefold dose of nimesulide. Decreased expression of receptors in animals, who took a tenfold dose, can be associated with extensive necroses in the liver parenchyma.

Key words. Nonsteroid anti-inflammatory drugs, NSAID-hepatopathy, nimesulide, TNF α R1 expression, IL-2R α expression.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день вопросы патогенеза поражений печени, связанные с применением нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), остаются малоизученными. В патогенезе НПВП-ассоциированного пора-

жения печени обсуждается роль блокады ферментных систем цикла Кребса и разобщения окислительного фосфорилирования (по типу синдрома Рейе) в митохондриях гепатоцитов [9, 13], блокады фосфодиэстеразы IV, нарушения экскреции желчи вследствие образования объемных комплексов метаболитов НПВП

с желчными кислотами, энтеропеченочной рециркуляции НПВП, а также иммунологических нарушений [8, 9] и некоторые другие патофизиологические аспекты.

Известно, что НПВП обладают токсическим влиянием на митохондрии гепатоцитов [12, 13, 22]. Экспериментальные исследования на крысах продемонстрировали, что салициловая кислота может вызвать дисфункцию митохондрий, существенное снижение внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ), что, в свою очередь, приводит к повреждению печени опосредованно – через нарушение перекисного окисления липидов [14]. В свою очередь, окислительный стресс сам вызывает повреждение митохондрий с изменением их функций [15, 23].

Развитию окислительного стресса и повреждению митохондрий, а также апоптозу гепатоцитов [15, 24] способствуют активные промежуточные метаболиты НПВП, образующиеся в печени [10, 11]. О наличии НПВП-индуцированного апоптоза свидетельствует экспрессия каспазы 8 и каспазы 9 в ткани печени, а также увеличение белка Bcl-X L, участвующих в регуляции апоптоза [23].

Клинические и экспериментальные исследования показывают, что как иммунологические, так и идиосинкратические реакции могут участвовать в патогенезе вызываемых селективными НПВП поражений печени [6, 16, 20]. Кроме известных на сегодняшний день опасных для жизни побочных эффектов НПВП, растет число доказательств того, что НПВП оказывают иммуносупрессивное действие, вмешиваясь в функции моноцитов и активацию Т-лимфоцитов, пролиферацию и синтез цитокинов [17, 18, 21]. Возможно, что в процессе дезорганизации цитолемма гепатоцита приобретает антигенные свойства, что приводит к индукции

аутоиммунного ответа, который морфологически проявляется появлением перипортального отека и мононуклеарной инфильтрации перипортальных областей [2].

Недавние лабораторные исследования с использованием животных способствовали определенному прогрессу в понимании механизмов НПВП-гепатотоксичности, но в настоящее время требуется проведение дальнейших исследований для полного представления патогенеза этого явления, что обеспечит лучшее понимание факторов риска и патофизиологии [20].

Цель исследования – изучение иммуногистохимической экспрессии TNF α R1 и IL-2R α в ткани печени у животных (крыс) с моделированным НПВП-ассоциированным гепатитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование экспрессии TNF α R1 и IL-2R α в ткани печени экспериментальных животных проводили с использованием антител 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), антитела видоспецифичны к антигенам тканей крысы. Для выявления антител применяли системы детекции Uno Vue detection system, 100 tests, UMR 100PD, использовали стекла с полилизинным покрытием Menzel.

Проводили исследования ткани печени у животных опытных групп, которым нимесулид (Найз®) вводили в течение 21 дня в следующих дозировках: 0,5 мг/кг (терапевтическая доза) ($n = 25$); 2,5 мг/кг ($n = 20$); 5 мг/кг ($n = 24$). В качестве контрольной группы использовали интактных животных ($n = 21$).

Антиген-позитивные клетки идентифицировали по появлению коричневого окрашивания при просмотре препаратов на светооптическом уровне. Результаты реакции оценивались полуколичественным методом – в «крестах» (в связи с локализацией маркеров на клеточной мембране) и по числу позитивно окрашенных клеток – в баллах. Выраженность экспрессии маркеров «в крестах» оценивали, просматривая подряд поля зрения под микроскопом (от 10 до 20 в каждом гистологическом срезе), в зависимости от интенсивности окрашивания поля зрения относили к четырем группам: с отрицательной реакцией (-), слабоположительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++) [3]. Оценка экспрессии маркеров проводилась по 6-балльной системе: 2 балла – до 20 % окрашенных клеток; 4 балла – от 20 до 40 % окрашенных клеток; 6 баллов – более 40 % окрашенных клеток [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия TNF α R1 в ткани печени.

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО, Tumor necrosis factor – TNF) – многофункциональный провоспалительный цитокин, играет важную роль во многих клеточных и биологических процессах, в том числе в дифференцировке и пролиферации клеток, апоптозе, воспалении, поддержании состава и структуры лимфатической системы, иммунных функций, а также в защите организма от различных патогенов. Доказана его роль в развитии различных патологий: онкологических, сердечно-сосудистых, неврологических, легочных, аутоиммунных и метаболических [1]. Рецептор из надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли – TNF α R1 – мембранный белок, активирует фактор

транскрипции NF-kB, опосредует апоптоз и регулирует воспаление, является одним из основных рецепторов ФНО.

При просмотре препаратов у животных контрольной группы (гистологическая норма образцов паренхимы печени) TNF- α R1-позитивные клетки в гепатоцитах и эпителии желчных протоков портальных трактов были единичными (мембранная экспрессия), что соответствовало $1,79 \pm 0,14$ балла (таблица).

Результаты полуколичественной оценки экспрессии TNF- α R1 и IL-2Ra в ткани печени экспериментальных животных

Клиническая группа	Интенсивность окрашивания	Число позитивно окрашенных клеток, баллы
<i>Экспрессия TNF-αR1</i>		
Группа контроля (гистологическая норма), n = 21	-	$1,79 \pm 0,14$
0,5 мг/кг (терапевтическая доза), n = 25	+++	$5,8 \pm 0,43^*$ (p = 0,000)
2,5 мг/кг, n = 20	++++	$5,9 \pm 0,57^*$ (p = 0,000)
5 мг/кг, n = 24	++	$5,7 \pm 0,65^*$ (p = 0,000)
<i>Экспрессия IL-2Ra</i>		
Группа контроля (гистологическая норма), n = 21	-	$1,82 \pm 0,11$
0,5 мг/кг (терапевтическая доза), n = 25	+++	$4,90 \pm 0,51^*$ (p = 0,000)
2,5 мг/кг, n = 20	++++	$5,60 \pm 0,83^*$ (p = 0,000)
5 мг/кг, n = 24	++	$3,71 \pm 0,54^*$ (p = 0,002)

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к количеству TNF- α R1-позитивных клеток (определяемому полуколичественным методом) в ткани печени у животных контрольной группы. Для проведения статистического анализа использован критерий Стьюдента

У животных, получавших нимесулид в течение 21 дня (при всех дозах), наблюдали значительное увеличение количества

TNF- α R1-позитивных клеток, особенно в паренхиме печени. При этом интенсивность окрашивания паренхимы в опытных группах не была сопоставима – при максимальной дозе она существенно снижалась. Наибольшая интенсивность окраски (++++) отмечалась у животных, получавших пятикратную дозу нимесулида (2,5 мг/кг), наименьшая окраска (++) – у животных, получавших десятикратную дозировку (5 мг/кг), при этом число позитивно окрашенных клеток было равнозначным, соответственно $5,9 \pm 0,57$ и $5,7 \pm 0,65$ балла.

Опираясь на полученные данные, можно говорить о том, что при длительном приеме нимесулида, начиная с терапевтических доз, имеет место готовность к апоптозу эпителиоцитов паренхимы печени, обусловленному действием на гепатоциты провоспалительных цитокинов (TNF- α). Вместе с тем при терапевтических дозах ткань печени была морфологически более сохранна, а при максимальной дозе отмечались массивные некрозы. Этим, на наш взгляд, объясняется уменьшение интенсивности окрашивания клеток при максимальной дозе, поскольку при этой дозировке гибель клеток печени происходит по типу некроза под непосредственным воздействием повреждающих факторов, а не по типу апоптоза.

Экспрессия IL-2R α в ткани печени.

Интерлейкин-2 – цитокин – является медиатором воспаления и иммунитета, продуцируется Т-клетками в ответ на антигенную и митогенную стимуляцию. Комплекс рецептора интерлейкина-2 (IL-2R) существует в трех альтернативных формах: CD25, CD122 и CD132. CD25 – протеин из группы дифференцировочных антигенов лейкоцитов, является α (альфа) субъединицей рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α), он экспрессируется на

развивающихся и активированных Т-клетках, активированных В-клетках, НК-клетках и моноцитах, а также на предшественниках миелоидных клеток в костном мозге.

При исследовании препаратов в контрольной группе отмечалась слабая экспрессия IL-2R α в гепатоцитах, которая оценивалась в $1,82 \pm 0,11$ балла (см. таблицу). Во всех экспериментальных группах паренхима печени иммунопозитивна к IL-2R α , также иммунопозитивны клетки части желчных протоков портальных трактов. Интенсивность экспрессии IL-2R α различалась (как и при экспрессии TNF α R1), наиболее интенсивная окраска (++++) отмечалась у животных, получавших дозу нимесулида 2,5 мг/кг, наименьшая окраска (++) – у животных, получавших дозу 5 мг/кг. Число позитивно окрашенных клеток составило соответственно $5,60 \pm 0,83$ и $3,71 \pm 0,54$ балла.

По-видимому, экспрессия IL-2R α в паренхиме печени при НПВП-гепатопатии может быть объяснена наличием аутоиммунных механизмов. Снижение экспрессии IL-2R α у животных, получавших десятикратную дозировку препарата, вероятно, связано с преобладанием некротических процессов в ткани печени.

Выводы

1. При исследовании иммуногистохимической экспрессии TNF α R1 в ткани печени у крыс с моделированным НПВП-ассоциированным гепатитом во всех экспериментальных группах (различающихся дозировками нимесулида) наблюдалась иммунопозитивность паренхимы печени и единичных клеток эпителия желчных протоков портальных трактов. Таким образом, при длительном приеме нимесулида имеет место

готовность эпителиоцитов паренхимы печени к апоптозу, обусловленному действием фактора некроза опухоли.

2. Наблюдалась экспрессия IL-2R α в паренхиме печени и части желчных протоков портальных трактов у животных всех экспериментальных групп, что может объясняться наличием аутоиммунных процессов.

3. Повышение экспрессии TNF α R1 и IL-2R α в ткани печени отмечалось у животных опытной группы, получавших пятикратную дозу нимесулида. Снижение экспрессии рецепторов у животных, получавших десятикратную дозу, может быть связано с наличием обширных некрозов в паренхиме печени.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. 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): 15–19.
2. Жолобова Е.С., Конопелько О.Ю., Гешева З.В. Гепатотоксичность нестероидных противовоспалительных препаратов, применяемых в детской ревматологии. Педиатрия 2009; 88 (5): 155–160.
3. 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: 47–53.
4. Ключарева А.А. Лекарственный гепатит. Медицинские новости 2012; 12: 25–32.
5. Коган Е.А., Низяева Н.В., Демура Т.А. Автономность роста очагов аденомиоза: иммуногистохимические особенности экспрессии маркеров. Иммунология 2011; 12: 311–325.
6. Муравьев Ю.В. Гепатотоксичны ли НПВП? Научно-практическая ревматология 2002; 4: 36–41.
7. Полунина Т.Е., Маев И.В. Клиника, диагностика и коррекция острого лекарственно-го гепатита. Лечащий врач 2007; 1: 48–52.
8. Федотова А.П., Чибыева Л.П., Васильев Н.Н. Гастродуоденальные эрозивно-язвенные повреждения, индуцированные приемом нестероидных противовоспалительных препаратов, в условиях Республики Саха. Якутский медицинский журнал 2010; 31 (3): 24–27.
9. Циммерман Я.С. Клиническая гастроэнтерология: избранные разделы. М.: ГЭОТАР-Медиа 2009; 416.
10. Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? World J Gastroenterol. 2010; 16 (45): 5651–5661.
11. Boelsterli U.A. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. Drug Saf 2002; 25: 633–648.
12. Bort R., Ponsoda X., Jover R. Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. Pharmacol Exp Ther 1999; 288: 65–72.
13. Cantoni L., Valaperta R., Ponsoda X. Induction of hepatic heme oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity. Hepatol 2003; 238 (6): 776–783.
14. Doi H., Horie T. Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress. Chem Biol Interact 2010; 183: 363–368.
15. Gomez-Lechon M.J., Ponsoda X., O'Connor E., Donato T., Castell J.V., Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by

alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 2155–2167.

16. *Greaves R.R., Agarwal A., Patch D.* Inadvertent diclofenac rechallenge from generic and non-generic prescribing, leading to liver transplantation for fulminant liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 71–73.

17. *Hartel C., von Puttkamer J., Gallner F., Strunk T., Schultz C.* Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: potential role of cyclooxygenase-2 inhibition. *Scand J Immunol* 2004; 60: 412–420.

18. *Inigues M., Punzon C., Fresno M.* Induction of Cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Immunol* 1999; 163: 111–119.

19. *Modi C.M., Mody S.K., Patel H.B., Dudhatra G.B., Kumar A., Avale M.* Toxicopathological overview of analgesic and anti-inflammatory drugs in animals. *Journal of*

Applied Pharmaceutical Science 2012; 02 (01): 149–157.

20. *O'Connor N., Dargan P.I., Jones A.L.* Hepatocellular damage from non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Q J Med* 2003; 96: 787–791.

21. *Paccani S.R., Boncristiano M., Ulivieri C., D'Elia M.M., Del Prete G., Baldari C.T.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress T-cell activation by inhibiting p38 MAPK induction. *J Biol Chem* 2002; 277:1509–1513.

22. *Scully L.J., Clarke D., Barr R.J.* Diclofenac induced hepatitis. 3 cases with features of autoimmune chronic active hepatitis. *Dig Dis Sci* 1993; 38 (4): 744–751.

23. *Tang W.* The metabolism of diclofenac-enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab* 2003; 4: 319–329.

24. *Tian G., Yu J.P., Luo H.S., Yu B.P., Yue H., Li J.Y.* Effect of Nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 483–487.

Материал поступил в редакцию 14.04.2017