

ORIGINAL ARTICLE

Cellular Immunity State of Protein-deficient Rats with the Toxic Liver Injury

O.N. Voloshchuk, G.P. Kopylchuk

Institute of Biology, Chemistry and Bioresources of Chernovtsi national university named by Yurii Fedkovych, Biochemistry and biotechnology department, Chernovtsi, Ukraine

*E-Mail: o.voloshchuk@chnu.edu.ua

Received February 16, 2017

Studies on the role of immunity mechanisms in the emergence and maintenance of inflammatory and destructive processes in the liver under toxic hepatitis and nutrient deficiency are topical. The aim of research – to study the quantitative content and functional activity of leukocytes under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis on the background of nutritional protein deficiency.

The most pronounced changes in cell-mediated immunity are observed in protein-deficient animals with toxic hepatitis. The pronounced defects of both specific and non-specific cellular immunity were manifested by the leukocytosis, increase number of segmented neutrophils in blood serum against decrease their phagocytic index and phagocytic number, reduction of total lymphocyte number, and simultaneously lowering of T- and B-lymphocytes was established under the conditions of acetaminophen-induced hepatotoxicity on the background of protein deficiency. Installed changes indicate the defective formation of functional immunity state which can manifest by decrease the body's ability to carry out the reaction of cellular and humoral immunity.

Research results may be used for the rationale of therapeutic approaches to the elimination and correction of the consequences of immunological status disturbances under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis, aggravated by the alimentary protein deprivation.

Key words: alimentary deprivation of protein, immunity, leucocytes, toxic hepatitis

На сегодня в литературе рассматривается роль иммунных механизмов в возникновении и поддержании воспалительных и деструктивных процессов в печени при гепатопатологиях различного генезиса (Neuman *et al.*, 2015; Manns *et al.*, 2010). Показано, что при патологиях печени может наблюдаться уменьшение количества циркулирующих клеток иммунной системы, угнетение их роста, созревания и миграции, накопление избытка циркулирующих комплексов антиген-антитело в сыворотке крови вследствие нарушения процессов их элиминации (Liu *et al.*, 2013). В тоже время, интоксикация, формирующаяся при токсических повреждениях печени, может приводить к нарушению функционирования иммунной системы (Fisher *et al.*, 2015; Chughlay *et al.*, 2015). По количественно-качественной оценке изменений лейкоцитарной формулы формируются представления о адаптационных реакциях организма в условиях влияния стрессовых факторов различной этиологии (Dara *et al.*, 2016). Одним из критериев состояния иммунной системы является активность фагоцитоза, являющейся фундаментальной составляющей иммунной защиты организма (Liaskou *et al.*, 2012). В свою очередь исследование обмена иммунокомпетентных клеток раскрывает молекулярно-метаболические особенности патологических процессов, открывает возможность целенаправленного воздействия не только на иммунную систему, но и на метаболические сдвиги (MacIver *et al.*, 2008).

На сегодня остается открытым вопрос состояния клеточного звена иммунного ответа в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита, формирующегося в условиях алиментарного дефицита белка.

Цель исследований – определение количественного содержания и функциональной активности лейкоцитов в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина.

MATERIALS AND METHODS

Исследования проводили на 36 белых

нелинейных крысах массой 90-100 г и возрастом 2-2,5 месяца. Работу с животными осуществляли с учетом положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг.

Крыс содержали по одной в пластмассовых клетках с песчаной подстилкой, доступ к воде *ad libitum*. Нормирование суточного рациона проводили с учетом принципа парного питания.

Исследования проводили на 4 группах животных: 1 – крысы, содержащиеся на полноценном рационе (К); 2 – крысы, содержащиеся на низкопротеиновом рационе (НПР); 3 – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе (Г); 4 – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина (НПР+Г).

Животные 1-й и 3-й группы на протяжении 28 суток получали рацион, включающий 14 % протеина (в виде казеина), 10 % жиров и 76 % углеводов, сбалансированный по всем нутриентам (Reeves *et al.*, 1993). Животные 2-й и 4-й группы получали изоэнергетический рацион, содержащий 4,7 % белка, 10 % жиров, 85,3 % углеводов.

После четырехнедельного содержания крыс на экспериментальной диете моделирование ацетаминофен-индуцированного гепатита осуществляли путем введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2 % крахмальной взвеси на протяжении 2 дней с помощью специального зонда (Voloshchuk, Korylchuk, 2016).

Цервикальную дислокацию крыс под легким эфирным наркозом осуществляли на 31 сутки эксперимента.

Для морфологического исследования использовали мазки крови, окраску препаратов осуществляли по Романовскому-Гимзе стандартным методом. Для оценки иммунологического статуса в периферической кров животных подсчитывали общее количество лейкоцитов и лимфоцитов. Показатели клеточного иммунитета (Т, В-лимфоциты)

изучали с помощью реакции розеткообразования. Результаты фагоцитарной активности учитывали микроскопически. Рассчитывали комплекс показателей: фагоцитарное число – среднее число микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом (у.е.); фагоцитарный индекс – процент фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов. Статистическую значимость полученных результатов биохимических анализов оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни с применением программы обработки статистических данных «Statistica 6.0».

RESULTS AND DISCUSSION

На первом этапе оценки иммунного статуса определяют первичные дефекты иммунитета с помощью ориентировочных тестов, в первую очередь количество лейкоцитов в сыворотке крови. Результаты исследований показали, что у белок-дефицитных животных наблюдается снижение общего содержания лейкоцитов в сыворотке крови (рис. 1), при этом установленная лейкопения может стать причиной снижения иммунологической реактивности организма. В тоже время у животных с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени наблюдается лейкоцитоз (рис. 1), что указывает на развитие воспалительной реакции в организме животных указанной группы.

Кроме того, изменение количественного содержания лейкоцитов в крови сопровождается нарушением соотношения между отдельными субпопуляциями лейкоцитов, в частности сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. Установлено, что наиболее выраженное увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов наблюдается у белок-дефицитных крыс с токсическим гепатитом (рис. 2), что указывает на усиление воспалительных процессов в печени (You *et al.*, 2006). Одним из основных критериев эффективности иммунного надзора является фагоцитарная активность нейтрофилов. Оценка фагоцитарного звена системы иммунитета является неотъемлемым элементом оценки иммунологического статуса, изменяющегося при многих заболеваниях (Adams *et al.*, 2010).

Нарушение фагоцитарных функций существенным образом ослабляет всю систему защитных механизмов. Результаты исследований показали, что в условиях алиментарной депривации протеина наблюдаются незначительные изменения фагоцитарной активности, что проявлялось снижением фагоцитарного индекса (рис. 3) на фоне сохранения на уровне контроля фагоцитарного числа (рис. 4). Фагоцитарный индекс отражает количество активных нейтрофилов, способных поглощать ту или иную тестовую микробную культуру. Сниженный фагоцитарный индекс говорит о неэффективности протекающих иммунных реакций с участием нейтрофилов.

Наиболее выраженные изменения фагоцитарной активности наблюдаются у животных с токсическим повреждением печени на фоне алиментарной белковой недостаточности, у которых выявлено снижение фагоцитарного числа (рис. 4) на фоне снижения фагоцитарного индекса (рис. 3). Установленное снижение показателей активности фагоцитоза свидетельствует о нарушениях в системе неспецифического клеточного иммунитета и формировании иммунодефицита.

Лейкоцитарный состав крови и интенсивность лейкоцитарной реакции рассматривается как общий показатель состояния организма и отображает течение патологического процесса. По количественно-качественной оценке изменения лейкоцитарной формулы периферической крови формируются представления о адаптационных реакциях организма. Интегральные гематологические показатели, в основе которых лежит соотношение клеток формулы крови, позволяют оценить состояние специфического и неспецифического звена иммунитета, определить степень интоксикации организма или эффективность терапии ряда заболеваний (Holt, Ju, 2006). Поскольку изменение лейкоцитарной формулы указывает на выраженность воспалительного процесса и степень дисбаланса иммунного надзора, далее нами определялось содержание Т- и В-лимфоцитов, что позволяет оценить состояние специфического иммунитета.

Результаты исследований показали выраженный сдвиг показателей клеточного звена иммунитета. Установлено, что наиболее выраженные изменения наблюдаются у животных с токсическим повреждением печени, индуцированным на фоне белковой недостаточности. У животных данной группы наблюдается достоверное уменьшение общего количества лимфоцитов (рис. 2), следствием чего, вероятно, будет снижение эффективности иммунной защиты организма. В тоже время снижение содержания лимфоцитов сопровождается количественным перераспределением Т- и В-лимфоцитов, опосредующих реакции специфического клеточного и гуморального

иммунитета (Foureau *et al.*, 2014). Результаты исследований показали, что наиболее выраженные изменения клеточного звена иммунитета характерны для животных с токсическим повреждением печени на фоне алиментарной депривации протеина. У животных указанной группы наблюдается резкое снижение содержания В-лимфоцитов (рис. 5) и Т-лимфоцитов (рис. 6), являющихся интегральным показателем клеточного звена иммунитета. Установленные изменения указывают на формирование дефекта функционального состояния иммунитета, что может проявляться снижением способности организма осуществлять реакции клеточного и гуморального иммунитета.

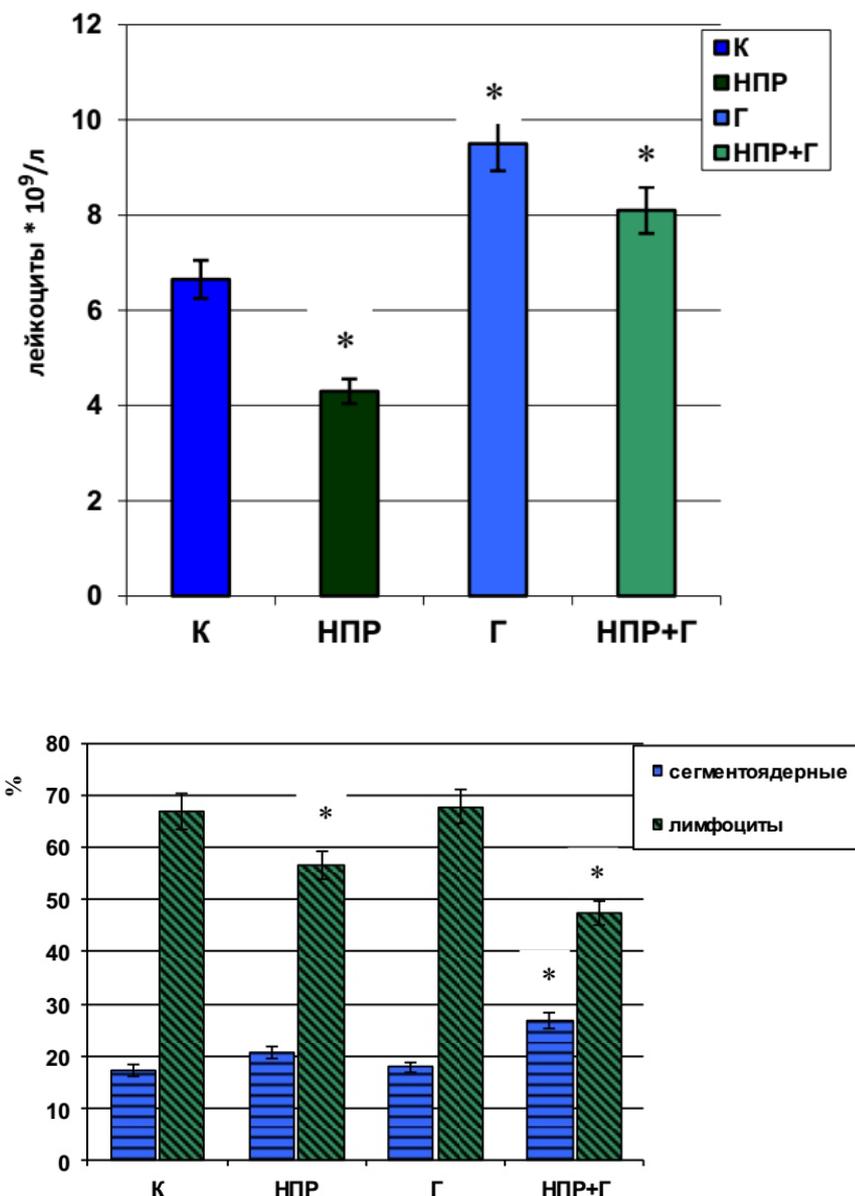


Figure 1. Количество лейкоцитов в сыворотке крови крыс в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности

Примечание (тут и далее):

* - статистическая значимость различий между опытной и контрольной группой ($P < 0,05$)

К – крысы, содержащиеся на полноценном рационе;

НПР – крысы, содержащиеся на низкопротеиновом рационе;

Г – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе;

НПР+Г – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина.

Figure 2. Содержание сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в сыворотке крови крыс в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности.

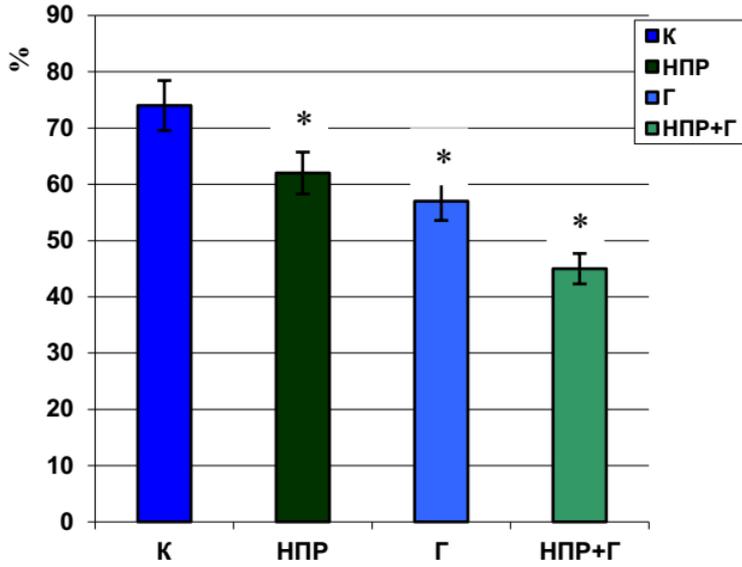


Figure 3. Фагоцитарный индекс нейтрофилов сыворотки крови крыс в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности

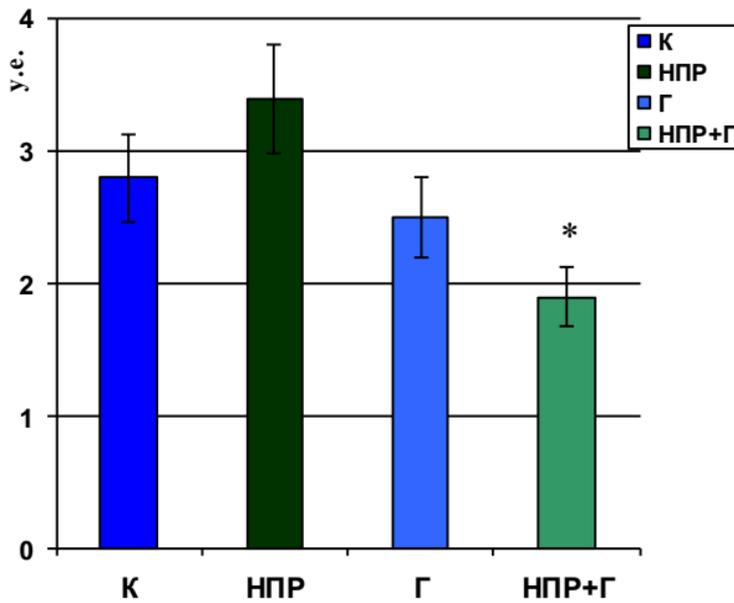


Figure 4. Фагоцитарное число нейтрофилов сыворотки крови крыс в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности

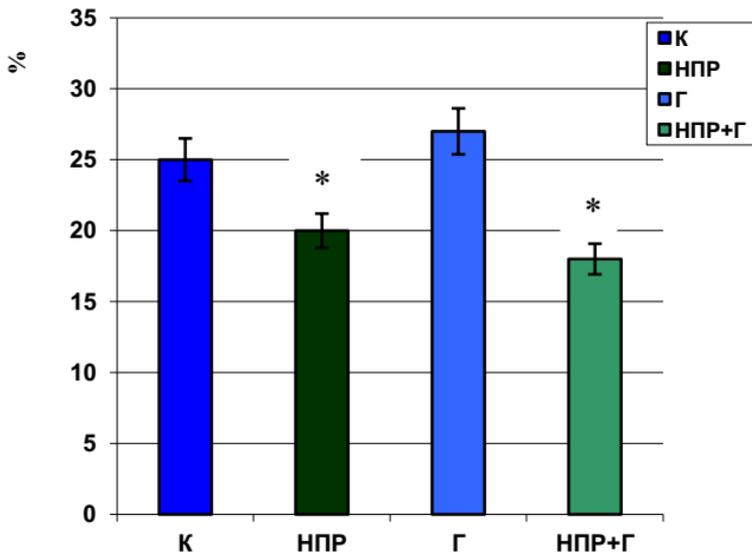


Figure 5. Содержание В-лимфоцитов в сыворотке крови крыс в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности

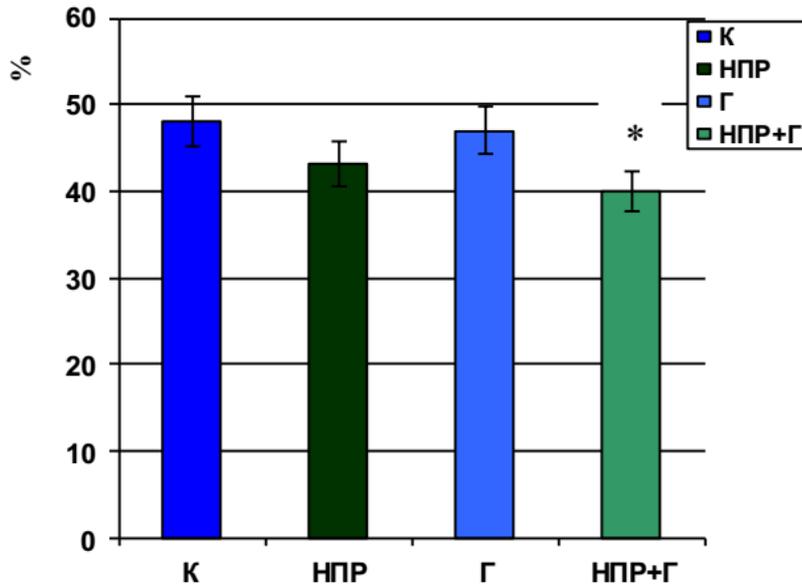


Figure 6. Содержание Т-лимфоцитов в сыворотке крови крыс в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности

Итак, в условиях ацетаминофен-индуцированного токсического гепатита на фоне белковой недостаточности наблюдаются выраженные дефекты как специфического, так и неспецифического клеточного иммунитета, что проявлялось повышением количества нейтрофилов в сыворотке крови на фоне снижения их фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа, а также уменьшением общего количества лимфоцитов при одновременном снижении содержания Т- и В-лимфоцитов.

REFERENCES

- Adams D.H., Ju C., Ramaiah S.K., Uetrecht J., Jaeschke H. (2010) Mechanisms of Immune-Mediated Liver Injury, *Toxicol Sci*, **115**(2), 307-321.
- Chughlay M., Blockman K., Cohen A. (2015) Clinical approach to drug-induced liver injury. *Current Allergy & Clinical Immunology*. **28**(4), 252-256.
- Dara L., Liu Z.-X., Kaplowitz N. (2016) Mechanisms of adaptation and progression in idiosyncratic drug induced liver injury, clinical implications. *Liver International*, 36(2), 158-165.
- Fisher K., Vuppalandhi R., Saxena R. (2015) Drug-Induced Liver Injury. *Arch Pathol Lab Med*, **139**, 876-887.
- Foureau D.M., Walling T.L., Maddukuri V., Anderson W., Culbreath K., Kleiner D.E., Ahrens W.A., Jacobs C., Watkins P.B., Fontana R.J., Chalasani N., Talwalkar J., Lee W.M., Stolz A., Serrano J., Bonkovsky H.L. (2014) Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, **180**, 40-511.
- Holt M.P., Ju C. (2006) Mechanisms of Drug-Induced Liver Injury Submitted. *The AAPS Journal*. **8**(1), E48-E54.
- Liaskou E., Wilson D.V., Ye H. (2012) Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediators of Inflammation*, ID 949157.
- Liu Y., Meyer C., Xu C., Weng H., Hellerbrand C., Dijke P., Doole S. (2013) Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **304**, G449-G468.
- MacIver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L., Wofford J.A., Coloff J.L., Rathmell J.C. (2008) Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J. Leukocyte Biol.*, **84** (4), 949-957.
- Manns M.P., Czaja A.J., Gorham J.D., Krawitt E.L., Mieli-Vergani G., Vergani D., Vierling J.M. (2010) Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis. *Hepatology*, **51**(6), 1-31.
- Neuman M.G., Maor Y., Nanau R.M., Melzer E., Mell H.,

- Opris M., Cohen L., Malnick S. (2015) Alcoholic Liver Disease: Role of Cytokines. *Biomolecules*, **5**, 2023-2034.
- Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. (1993) AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.*, **5**, 1939-1951.
- Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. (2016) Activity of liver mitochondrial Krebs cycle NAD⁺-dependent dehydrogenases in rats with hepatitis induced by acetaminophen under conditions of alimentary protein deficiency. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **10(3)**, 283-286.
- You Q., Cheng L., Reilly T.P., Wegmann D., Ju C. (2006) Role of Neutrophils in a Mouse Model of Halothane Induced Liver Injury, *Hepatology*, **44(6)**, 1421-1431.