**СИНУСОИДАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ И ЦИТОКИНОВЫЙ ОТВЕТ ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ И СПОСОБ ЕЕ КОРРЕКЦИИ**

**Введение**

В общей структуре заболеваний значительную долю занимают патологии гепатобилиарной системы. Одной из наиболее распространенных причин данных заболеваний является воздействие гепатотоксических агентов. Несмотря на большое количество научных публикаций, до настоящего времени окончательно не выяснена роль иммунных механизмов в патогенезе развития диффузного токсического повреждения печени.

Метаболические нарушения при действии тетрахлорметана (CCl4) способны изменять продукцию про- и противовоспалительных цитокинов клетками иммунной системы. СК печени, большую часть которых составляют макрофаги, принадлежит важная роль, как в поддержке воспалительной реакции, так и в регуляции регенерации [4, 11].

Синусоидальные эндотелиальные клетки являются многочисленной непаренхиматозной клеточной популяцией печени и представлены 4 основными разновидностями, имеющими мезенхимальное происхождение: лейкоциты, эндотелиоциты, клетки Ито, клетки Купфера или фиксированные макрофаги [12]. СК выполняют роль «барьера» в печеночных синусоидах, обеспечивают фильтрацию, эндоцитоз, презентацию антигенов и привлечение лейкоцитов к месту повреждения [17].

Основными факторами, регулирующими воспалительный процесс и регенерацию, являются цитокины, локально выделяющиеся клетками моноцитарно-макрофагального ряда в очаг повреждения. Такие цитокины, как TNF-α, IL-1, IL-6, ростовые факторы HGF, вырабатываемые синусоидальными клетками печени запускают сигнальные пути трансдукции репликации ДНК (STAT3, MAPK) [8]. Ростовые факторы PDGF, IGF-1, HGF, TGF-β, синтезируемые синусоидальными клетками, снижают степень апоптоза гепатоцитов, уменьшают продукцию оксида азота и активных форм кислорода. Вышеперечисленные факторы способны усиливать межклеточные взаимодействия клеток печени, восстанавливать функциональную активность сохранившихся и вновь образованных гепатоцитов [9, 15]. Поиск новых подходов иммунокоррегирующей терапии, способной приводить к модификации регенераторного потенциала органа на сегодняшний день остается актуальной задачей.

**Цель исследования**

Оценить уровень значимых цитокинов и роль синусоидальных клеток при токсическом повреждении печени и на фоне его коррекции АФГ.

**Материалы и методы**

Эксперимент по моделированию диффузного токсического повреждения печени был выполнен на 65 крысах-самцах линии Wistar массой 180±10 г., одобрен локальным этическим комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (г. Екатеринбург, Россия) и соответствует принципам, сформулированным в Директиве 2010/63/EC Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.). Животные, используемые в исследовании, содержались в одинаковых условиях по 5 крыс в клетке на обычном рационе вивария со свободным доступом к пище и воде и температурным режимом 20 ± 2 С.

Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: интактная, CCl4 3 сутки, CCl4 7 сутки, CCl4, 14 сутки, CCl4 + АФГ 3 сутки, CCl4 + АФГ 7 сутки, CCl4 + АФГ 14 сутки. Для создания модели диффузного токсического повреждения печени использовали CCl4, который вводили животным экспериментальных групп однократно внутрибрюшинно в дозе 50 мг/100 г массы тела. Инъекции аминофталгидразида 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 [13]. К группам с CCl4-воздействием и с применением АФГ были сформированы контрольные группы животных, которым вводили аналогичные дозы масляного раствора и 0,85% раствора хлорида натрия соответственно. Интактную группу составляли здоровые животные. Животных опытных групп выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки передозировкой диэтилового эфира.

Образцы ткани печени погружали в 10% нейтральный формалин на 24 часа при комнатной температуре. Подготовку образцов для гистологического исследования осуществляли с использованием автоматического процессора Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин [10]. Со срезов толщиной 3-4 мкм удаляли парафин, для этого стекла помещались последовательно в ксилол, в 100% спирт и в растворы с постепенным снижением концентрации спирта до полностью водного раствора. Срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (V4). Подсчет количества СК осуществляли в единице площади в 20-ти полях зрения при увеличении микроскопа х400. Данный показатель позволяет охарактеризовать вклад СК в регенерацию печени при токсическом повреждении.

Для анализа содержания цитокинов в плазме крови экспериментальных животных производили забор периферической крови, центрифугировали при 3000 об/мин на холоде в течение 15 мин. Подготовка гомогената печени крыс включала гомогенизацию образцов, ресуспендирование с физиологическим раствором (0,85% р-р хлорида натрия) и центрифугирование при 5000 об/мин на холоде в течение 30 мин [1, 18].

Содержание цитокинов в плазме крови и гомогенатах печени крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием прибора Lazurite Automated ELISA System. Для оценки уровня цитокинов в плазме крови использовали наборы для ИФА (иммуноферментный анализ) фирмы Thermo Scientific: Rat TNF-alpha Platinum ELISA BMS622 TWO/BMS622TEN, Rat IL-6 ELISA Kit BMS625/ BMS625 TWO / BMS625 TEN, Rat IL-10 Platinum ELISA BMS629/BMS629 TEN, Rat IL-18 ELISA Kit KRC2341, а для гомогенатов печени, кроме вышеперечисленных, – Rat TGF-β1 Platinum ELISA BMS623/3/BMS623/3TEN, Rat IFN gamma Platinum ELISA BMS621 TWO/BMS621TEN, Rat IL-1 alpha Platinum ELISA BMS627/ BMS627TEN.

Статистическая обработка результатов эксперимента выполнена с применением Statistica 10.0. Для сравнения двух независимых групп использован непараметрический критерий Манна-Уитни. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% (Р < 0.05).

**Результаты**

В связи с тем, что в ходе морфометрического анализа и ИФА различий между интактной и контрольными группами животных не было установлено, в дальнейшем представлены результаты только интактной группы.

В соответствии с морфометрическими данными на 3 сутки после введения токсиканта отмечается достоверное увеличение количества СК с 9,69±0,48 кл\*10/мм2 (интактная группа) до 13,0±0,28 кл\*10/мм2 (см. рисунок 1).

На 7 и 14 сутки после воздействия CCl4 наблюдается снижение числа СК не только относительно интактной группы, но и относительно группы CCl4, 3 сутки до значения 5,8±0,37 кл\*10/мм2 и 5,3±1,25 кл\*10/мм2 соответственно (см. рисунок 1).

Модуляция активности макрофагов АФГ приводит к увеличению количества СК в печени на 3 сутки токсического воздействия, а на 7 и 14 сутки после терапии данный показатель снижается относительно 3 суток, но остается выше, чем в группах без лечения. Следовательно, есть основания полагать, что направленное воздействие на синусоидальные клетки посредством АФГ, способно изменить продукцию регуляторных факторов и компенсировать недостаточную скорость восстановительных процессов после токсического повреждения.

Изменение количества синусоидальных клеток печени при токсическом повреждении отражается на продукции цитокинов. Так при экспериментальном диффузном токсическом повреждении печени на 3 сутки отмечается резкое увеличение плазменной концентрации TNF-α до 922,16±192,20 пг/мл по сравнению с показателем интактной группы (16,14±3,09 пг/мл) (см. таблицу 1).

Повышение уровня TNF-α в плазме крови коррелирует с увеличением числа синусоидальных клеток печени на 3 сутки после введения CCl4. На 7 сутки токсического воздействия уровень TNF-α снижается как относительно показателей интактной группы, так и относительно группы CCl4 3 сутки. На 14 суткам после введения токсиканта количество TNF-α увеличивается по сравнению с интактной группой и существенно снижается по сравнению с показателями группы CCl4 3 сутки (см. таблицу 1). Применение АФГ при токсическом повреждении печени приводит к плавному снижению концентрации TNF-α и достигает минимального значения на 14 сутки (см. таблицу 1).

При оценке концентрации IL-6 в плазме крови после воздействия токсиканта во все сроки эксперимента достоверных различий с показателями интактной группы не установлено (см. таблицу 1). Введение АФГ на 3 сутки не приводит к изменению уровня IL-6 в плазме крови, однако в более поздние сроки исследования отмечается увеличение плазменной концентрации IL-6 относительно показателей групп CCl4 7 и 14 сутки (см. таблицу 1).

Воздействие CCl4 не оказывает влияния на концентрацию IL-18 в плазме крови. На фоне введения АФГ на 3 и 14 сутки концентрация IL-18 заметно снижается до значений 4,25±0,33 пг/мл и 3,68±0,71 пг/мл соответственно (см. таблицу 1).

Токсическое действие CCl4 вызывает резкое снижение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 в плазме крови на 7 и 14 сутки по сравнению с интактной группой и группой CCl4 3 сутки. На фоне применения АФГ на 7 сутки отмечается характерное для токсического повреждения снижение уровня IL-10 (см. таблицу 1).

В ходе исследования уровня цитокинов в гомогенатах печени у крыс после внутрибрюшинного введения CCl4, в зависимости от продолжительности действия токсиканта, обнаружено увеличение концентрации провоспалительных цитокинов IL-1α, IL-6 и TNF-α, противовоспалительного медиатора IL-10 и снижение содержания TGF-β. (см. таблицу 2).

Модуляция активности макрофагов приводит к увеличению концентрации IL-1α, TGF-β и способствует снижению продукции провоспалительных цитокинов IL-6, IFN-γ на локальном уровне. При этом применение АФГ не оказывает существенного влияния на локальную концентрацию IL-18, TNF-α и IL-10.

**Обсуждение**

В работах, опубликованных нами ранее, показано, что CCl4 вызывает повреждение не только органа-мишени (печени), но и других органов, что приводит к развитию системного воспалительного ответа, который выражается в активации макрофагального звена иммунной системы и выработке цитокинов [3,4].

Изменения функционального состояния иммунокомпетентных клеток, к числу которых относятся синусоидальные клетки, оказывают существенное влияние на развитие патологических процессов в печени [16, 17]. Результаты проведенного нами исследования подтверждают тот факт, что в ранние сроки токсического воздействия в ткани печени возрастает количество синусоидальных клеток, в том числе за счет притока моноцитов крови или за счет зрелых макрофагов перитонеальной полости, поступающих через мезотелий непосредственно к месту повреждения [14].

Синусоидальные клетки печени способны продуцировать такие провоспалительные цитокины, как IL-1, IL-6 и TNF-a. Доказано, что данные медиаторы отвечают за стимуляцию системного ответа в острой фазе воспаления [5, 7]. В нормальных физиологических условиях в печени цитокины продуцируются в минимальных концентрациях. Однако различные патофизиологические стимулы, такие как накопление в клетках печени липидов, свободных радикалов, а также поступление в печень токсинов, способствуют увеличению содержания провоспалительных молекул [5, 6].

В данном исследовании показано, что в ответ на диффузное токсическое повреждение печени на системном уровне наблюдается усиленная выработка провоспалительного цитокина TNF-α и подавление продукции IL-10, при этом концентрация провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-18 остается неизменной.

При действии токсиканта на локальном уровне отмечается увеличение концентрации IL-1α, IL-18, TNF-α, IL-10 и снижение IL-6, IFN-γ, TGF-β. Повышенная продукция IL-1α и IL-18 в гомогенатах печени, по-видимому запускает локальное воспаление, повышая уровни таких цитокинов, как TNF-α, IL-6. Повышение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10, подтверждает ключевую роль данного медиатора в регуляции иммунного ответа и способность подавлять секрецию провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-6 [2].

Воздействие на синусоидальные клетки АФГ способствует увеличению уровня IL-10, IL-6 и снижению IL-18, TNF-α в плазме крови, а на локальном приводит к росту концентрации IL-1α, TGF-β и снижению уровня IL-6, IFN-γ.

Таким образом, уточнение механизмов биологических эффектов аминофталгидразида на синусоидальные клетки и продукцию цитокинов, а также поиск эффективных стимуляторов регенерации печени среди других модуляторов функции макрофагов является перспективным направлением исследования.

Исследование проведено в рамках бюджетной программы «Изучение механизмов регенераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм», № Гос. регистрации – АААА-А18-118020590107-0, «Иммунная система в регуляции физиологических функций в норме и при патологических процессах» № Гос. регистрации – АААА-А18-118020590108-7

**Благодарности**

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.