УДК 616.36-002:616-092

© Колектив авторів, 2012.

ВПЛИВ ІНГІБІТОРА АКТИВАЦІЇ NF-KB АНДРОГРАФОЛІДУ НА ЗАПАЛЬНІ ПРОЦЕСИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

Н.В. Макогон, Т.М. Бризгіна, С.І. Павлович, Т.В. Мартинова, 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.

THE EFFECTS OF NF-KB INHIBITOR ANDROGRAPHOLIDE ON INFLAMMATION UNNDER EXPERIMENTAL IMMUNE LIVER INJURY

N.V. Makogon, T.M.Bryzgina, S.I.Pavlovich, T.V.Martynova, V.S.Sukhina, N.G.Grushka, R.I Yanchiy

SUMMARY

The effects of andrographolide (And) on T-cell mediated concanavalin A (ConA)-induced hepatitis in mice were studied. And decreased ConA-induced NF-kB activation in the liver and the development of inflammation, but did not attenuate necrotic component of liver damage. Anti-inflammatory activity of And is mediated at least in part by the inhibition of NF-kB activation.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВАЦИИ NF-KB АНДРОГРАФОЛИДА НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

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

РЕЗЮМЕ

Введение андрографолида (Анд) в условиях конканавалин А - индуцированного гепатита Т-клеточного генеза у мышей снижало активацию NF-kB в печени и развитие воспаления, но не уменьшало некротический компонент повреждения печени. Противовоспалительное действие Анд при иммунном гепатите связано с угнетением активации NF-kB.

Ключові слова: імунне ушкодження печінки, андрографолід, конканавалін А, NF-kB.

На сьогодні встановлена ключова роль ядерного транскрипційного фактора NF-κB (nuclear factor kappa B) в патогенезі багатьох захворювань. Пригнічення активації NF-kB розглядають як багатообіцяючу стратегію для терапевтичних впливів. Одним з перспективних інгібіторів NF-kB вважають андрографолід (Анд), основний активний компонент рослини Andrographis paniculata. Анд модифікує цистеїн субодиниці p50, що блокує зв'язування NF-kB з ДНК [15]. Є дані, що Анд пригнічує фосфорилювання кінази інгібіторного білка IkB з наступним зменшенням транслокації NF-kB в ядра [4]. Інгібування активації NF-kB при дії Анд призводить до зменшення продукції прозапальних чинників: інтерлейкінів (ІЛ) 1 та 2, фактору некрозу пухлин (ФНП-α), гама-інтерферону (ІФН-γ), молекул міжклітинної адгезії тощо [4, 7, 12, 15]. Є й протилежні дані про посилення секреції ФНО-α, ІФН-γ та ІЛ-2 під впливом Анд [11, 12]. Встановлено протективну та антизапальну дію Анд на моделях ряду захворювань, в тому числі автоімунних (множинний склероз, астма, септичний шок, васкуліти, ураження печінки тощо), що пов'язують як з інгібуванням NF-kB, так і з антиоксидантною дією препарату [10, 13, 15]. Анд пригнічує гуморальну і клітинну імунну відповідь на автоантигени, а також посилює толерогенність антиген-специфічних Т-лімфоцитів [7]. Слід зазначити, що пригнічення NF-kB може як послаблювати запалення та імунні реакції, так і посилювати клітинну загибель, оскільки цей фактор призводить до експресії ряду молекул, що сприяють виживанню клітин, в тому числі гепатоцитів [9]. Тому необхідні детальні дослідження позитивних та негативних наслідків дії інгібіторів NF-kB за конкретної патології. Є поодинокі дані щодо протективної дії Анд при експериментальному гепатиті, викликаному конканаваліном А (КонА) [13]. Ця модель широко використовується для вивчення імунного ушкодження печінки Т-клітинного ґенезу. При введенні поліклонального активатора Т клітин КонА відтворюється ряд особливостей захворювань печінки людини. Зокрема, це стосується цитокінів та інших прозапальних молекул, експресія яких регулюється NF-kB [14]. Метою роботи було дослідження впливу Анд на запальні процеси та стан печінки мишей при КонА-індукованому гепатиті.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Статевозрілим самцям мишей лінії СВА вводили КонА ("Sigma", 25 мг/кг) в хвостову вену, Анд ("Sigma", 100 мг/кг в 5% диметилсульфоксиді) - внутрішньоочеревинно за 2 години до КонА, контрольним мишам - відповідні розчинники. Дослідження проводили через 20 годин. При роботі дотримувались положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують

з експериментальною метою (Страсбург, 1986). Для морфологічної оцінки зразки печінки після фіксації 10% нейтральним формаліном заливали в парафін за загальноприйнятою методикою. Зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином. Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) визначали в сироватці крові за [2]. Для оцінки транслокації NF-kB в ядра проводили гель-електрофорез (SDS-PAGE) ядерного екстракту печінки з наступним імуноблотингом за [8]. В якості перших застосовували антитіла до p65 субодиниці NF-kB ("Sigma", 1:1000), в якості других - кролячі антитіла до IgG мишей, мічені пероксидазою ("Sigma", 1:2000). Для візуалізації реакції використовували діамінобензидин, інтенсивність визначали за допомогою комп'ютерної денситометрії. Прозапальну активність сироватки крові визначали за її здатністю посилювати утворення супероксиду в інтактних нейтрофілах. Мишам в черевну порожнину вводили 3 мл 1% глікогену, через 4 години вилучали клітини та відмивали центрифугуванням. Кількість живих клітин була 97,7±0,6 %, сегментоядерні нейтрофіли складали біля 60 %. Клітини ($0,5x10^6$ в 50 мкл забуференого фізіологічного розчину з 0,2% глюкози) інкубували 1 годину при 37°С в присутності сироваток контрольних або дослідних тварин (в концентрації 12,5 %) та проводили тест відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) [3]. Результати виражали в умовних одиницях (У.О.): оптична густина х 1000.

Проводили однофакторний дисперсійний аналіз даних (ANOVA) з наступнимпорівнянням середніх значень за LSD-тестом. Дані НСТ аналізували за допомогою критерію Крускала-Уоллеса. Дані представлені як середнє (M) ± стандартне відхилення (SD).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Методом імуноблотингу встановлено, що через 20 годин після введення КонА посилювалася транслокація p65-субодиниці NF-kB в ядра клітин печінки, що свідчило про активацію фактору. Застосування Анд за умов дії КонА зменшувало кількість p65 в ядрах ($p<0,05$ за результатами денситометрії блотів), тобто Анд виявився ефективним інгібітором активації NF-kB при даній патології.

КонА викликав виражене ураження печінки мишей. Визначалась білкова дистрофія, цитоліз і некробіоз окремих гепатоцитів, лейкоцитарна інфільтрація з наявністю нейтрофілів, макрофагів і поодиноких плазмоцитів. Виявлялася проліферація і гіпертрофія клітин Купфера. Зменшувалось ядерно-цитоплазматичне відношення в гепатоцитах, що свідчило про пригнічення метаболічних процесів. Розкид розмірів ядер досягав 1:6, кількість ядерець в деяких гепатоцитах зростала до 8. Порушення мікроциркуляції проявлялося периваскулярними набряками, ушкодженням судинних стінок з набуханням ендотеліоцитів і десквамацією окремих клітин в просвіт судин. Реєструвалися локальне розширення і повнокрів'я судин із стазом еритроцитів, а також змішані тромби з присутністю паличко- і сегментоядерних нейтрофілів, лімфоцитів і плазмоцитів. Таким чином, встановлено розвиток КонА-опосередкованого імунного гепатиту з вираженим цитолітичним компонентом. При введенні Анд на тлі КонА зміни гістоструктури печінки були меншими порівняно з дією одного КонА, проте зменшення некротичного компоненту ураження печінки не було виявлено. Це підтверджується даними активності АЛТ в сироватці крові, що характеризує цитоліз гепатоцитів. Анд не впливав на активність АЛТ, підвищену при КонА-гепатиті: контроль 3,5±1,1; КонА - 9,6±3,0 ($P<0,01$ до контролю); Анд + КонА-9,8±1,4 ммоль/л за годину. Слід зазначити, що за умов дії Анд порівняно з дією тільки КонА спостерігалась менша лейкоцитарна інфільтрація некротичних локусів, в яких були майже відсутні плазмоцити, малі і середні лімфоцити. Зменшення кількості клітин Купфера свідчило про зниження активації ретикулоендотеліальної системи печінки. Зростало ядерно-цитоплазматичне відношення гепатоцитів та кількість клітин з базофілією ядер, що характеризує підвищення внутрішньоклітинних регенераторних процесів. Деякий нормалізуючий ефект Анд проявлявся у зменшенні розкиду розмірів ядер гепатоцитів до 1:4-5, що наближалося до контрольних показників. Меншим було і порушення мікроциркуляції, послаблювалися набряк паренхіми та ураження судинних стінок, ступінь десквамації ендотеліоцитів та тромбоутворення. Наведені дані свідчать про певне послаблення запалення в тканині печінки при дії Анд за умов КонА-індукованого гепатиту. Суттєвий антизапальний ефект Анд на системному рівні проявлявся в послабленні нейтрофілії, викликаної КонА. За даними лейкограми крові нейтрофіли складали у контролі 21,0±7,2 %; у мишей з КонА -55,6±8,5% ($P<0,001$ до контролю); Анд + КонА - 37,6±12,1% ($P<0,001$ до дії КонА). Анд зменшував у 1,9 рази відсоток паличкоядерних нейтрофілів: контроль - 3,5±1,7%; КонА -24,1±2,4% ($P<0,001$ до контролю); Анд + КонА - 12,4±3,3% ($P<0,001$ до дії КонА). За нашими даними, антизапальна та протективна дія Анд проявлялася також в зменшенні клітинної загибелі за некротичним та апоптотичним шляхами [1].

На інтенсивність імунозапальних процесів впливає велика кількість факторів, які наявні в ураженій тканині, а також надходять в системний кровообіг. Підвищується вміст як прозапальних, так і протизапальних чинників: цитокінів, ейкозаноїдів, факторів росту тощо. Баланс між двома опозитними групами медіаторів у великій мірі визначає перебіг та кінцевий результат захворювань. Ми оцінювали інтегральний вплив сироваток дослідних мишей на

нейтрофіли від інтактних тварин за їх здатністю змінювати генерацію супероксиду в цих клітинах. Показники НСТ-тесту для сироваток контрольних мишей становили 28,9±4,2 У.О., КонА - 42,8±14,1 У.О. (P<0,05 до контролю), Анд + КонА- 25,8±12,6 У.О. (P<0,05 до КонА). Ці дані свідчать, що сукупність регуляторних молекул в сироватці крові мишей з КонА - гепатитом викликала запальну активацію нейтрофілів, тоді як Анд зміщував баланс про- та антизапальних факторів в системному кровообігу в бік останніх.

Таким чином, застосування Анд за умов КонА-гепатиту призводило до значного послаблення запальних процесів як в тканині печінки, так і на рівні організму. За нашими та літературними даними, цей ефект пов'язаний із здатністю даної речовини пригнічувати активацію NF-kB. Однак ми не виявили вираженого протективного впливу Анд на паренхімні клітини ні за оцінкою гістоструктури печінки, ні за показниками активності АЛТ в сироватці. Дані, отримані за наших експериментальних умов, не співпадають з результатами досліджень на інших моделях ураження печінки (токсичного ураження чотирихлористим вуглецем, Д-галактозаміном, парацетамолом), де були встановлені гепатопротективні ефекти Анд: послаблення ушкоження тканини печінки, зменшення перекисного окиснення в ній та цитолізу гепатоцитів [10]. Відомо, що активація NF-kB з одного боку, провокує й посилює запалення, а з іншого - призводить до експресії факторів виживання гепатоцитів [9], тобто інгібування активації NF-kB Анд може мати як позитивні (послаблення запалення, що було нами встановлено), так і негативні наслідки (погіршення життєздатності гепатоцитів). Кінцевий ефект застосування Анд буде визначатися балансом цих впливів та ключовою ланкою патогенезу захворювання. Якщо провідним механізмом є запалення, то застосування Анд буде протективним, як це було показано на моделях ряду імунних патологій [4, 7, 15]. Однак є дані, що ефекти Анд за умов токсичного ураження печінки сильно залежать від ступеню її ушкодження, дози та кратності введення препарату [5]. Було виявлено in vitro цитотоксичну дію Анд і запропоновано використовувати для терапії алергічного запалення легень його більш безпечний аналог [6]. Наведені дані і наші результати свідчать про необхідність детального вивчення дії інгібіторів NF-kB, в тому числі Анд, за конкретних патологічних умов, зокрема при автоімунних гепатитах.

ВИСНОВКИ

1. Введення мишам Анд за умов КонА - індукованого гепатиту значно послаблювало запальні процеси в печінці та на рівні організму, однак не призводило до зменшення некротичного компоненту ушкодження печінки.

2. При розвитку експериментального імунного гепатиту відбувається активація NF-kB в тканині печінки. Введення Анд за цих умов зменшувало активацію цього фактора. Таким чином, антизапальна дія Анд за умов КонА-індукованого ураження печінки в значній мірі опосередкована пригніченням активації транскрипційного фактора NF-kB.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бризгіна Т.М. Шляхи та механізми загибелі імунокомпетентних клітин у динаміці експериментального імунного ушкодження печінки / Т.М. Бризгіна, Н.В. Макогон, Л.І. Алексюк [та інші] / / Патологія. – 2011. – Т.8. – С.108-110.

2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. - М.: МЕДпресс-информ, 2004. - 912 с.

3. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред.А.В.Караулова. – М.: Мед. Информ. Агентство. - 2002. – 651с.

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

5. Choudhury B.R. Andrographolide and kalmegh (Andrographis paniculata) extract: in vivo and in vitro effect on hepatic lipid peroxidation / B.R. Choudhury, M.K. Poddar // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. – 1984. – Vol. 6. – P.481-485.

6. Guan S. Protective role of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, a noncytotoxic analogue of andrographolide, in allergic airway inflammation / S. Guan, L. Kong, C. Cheng [et al.] // J. Nat. Prod. – 2011. – Vol. 74. – P.1484-1490

7. Iruretagoyena M.I. Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis / M.I. Iruretagoyena, S.E. Sepъlveda, J.P. Lezana [et al.] //J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 318. – P.59-67.

8. Lu H. Hepatic preconditioning of doxorubicin in stop-flow chemotherapy: NF-kB/IkB-a pathway and expression of HSP72 / H. Lu, Z. Zhu, X. Yao [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11. – P.2136-2141.

9. Luedde T., Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver / T. Luedde, C. Trautwein // Liver International. – 2006. – Vol. 25. – P.1163-1174.

10. Meenatchisundaram S. Medicinal and pharmacological activities of Andrographis paniculata / S. Meenatchisundaram, G. Parameswari, T. Subbraj [et al.] //Ethnobotanical Leaflets. – 2009. – Vol. 13. – P.55-58.

11. Panossian A. Effect of andrographolide and Kan Jang—fixed combination of extract SHA-10 and extract SHE-3 on proliferation of human lymphocytes, production of cytokines and immune activation markers

in the whole blood cells culture / A. Panossian, T. Davtyan, N. Gukassyan [et al.] // Phytomedicine. – 2002. – Vol. 9. – P.598-605.

12. Sheeja K. Protective effect of Andrographis paniculata and andrographolide on cyclophosphamide-induced urothelial toxicity / K. Sheeja, G. Kuttan // Integr. Cancer. Ther. – 2006. – Vol. 5. – P.244-251.

13. Shi G. Protective effect of andrographolide against ConA-induced liver injury / G. Shi, Z. Zhang, R. Zhang [et al.] //Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. – 2012.– Vol.385.– P.69–79.

14. Tiegs G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury / G. Tiegs // Z Gastroenterol. - 2007. – Vol. 45. – P.63 -70.

15. Xia Y-F. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF-kB activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50 / Y-F. Xia, B. Ye, Y. Li [et al] // J. Immunol. - 2004. – Vol. 173. - P.4207-4217.