

УДК 616092:616-002-008.953-092:577.151.6

*В.О. Срібна, Н.Г. Грушка, Т.В. Мартинова, Н.В. Макогон**Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ*

**ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН
УРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ ІНГІБУВАННІ
ПОЛІ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛІМЕРАЗИ
ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІМУНОКОМПЛЕКСНОЇ ПАТОЛОГІЇ**

Досліджували вплив інгібітора полі(АДФ-рибозо)полімерази (ПАРП) 4-гідрокси-квіназоліну (4-ГК) на перитонеальні макрофаги й нейтрофіли крові мишей при імунокомплексній патології. Гіперімунокомплексемію моделювали шляхом довготривалої імунізації мишей лінії СВА зростаючими дозами бичачого сироваткового альбуміну. Імунізація призводила до значної активації клітин: за фагоцитарним показником в 1,7 раза, за відсотком формазанпозитивних клітин та цитохімічним показником в НСТ-тесті в 2,8 та 3,1 раза, а також за лізосомально-катіонним тестом в 4,8 раза. Введення імунізованим мишам 4-ГК (100 мг/кг, двічі на тиждень протягом 6 тижнів) призводило до зменшення всіх досліджуваних показників функціонально-метаболічної активності клітин уродженого імунітету до рівня контролю, що може бути важливим механізмом встановленої нами протективної дії інгібітора ПАРП при імунокомплексному ушкодженні.

Ключові слова: *миші, імунокомплексна патологія, полі(АДФ-рибозо)полімераза, нейтрофіли, макрофаги.*

Найбільш розповсюджений представник родини полі(АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП) – ядерний фермент ПАРП-1 активується при ушкодженні ДНК, синтезує негативно заряджені ланцюги полімеру АДФ-рибози із НАД⁺ та приєднує їх до гістонів, білків репарації ДНК, транскрипційних факторів та ін. Така посттрансляційна модифікація білків задіяна в ремодельованні структури хроматину, репарації ДНК, регулюванні експресії генів, у поділі та загибелі клітин тощо [1, 2], що обумовлює фізіологічне значення ПАРП. Однак нині є експериментальні докази участі ферменту в патогенезі низки захворювань, у тому числі й пов'язаних із імунозапальними процесами [3, 4]. Основні ПАРП-опосередковані механізми в розвитку хвороб пов'язані: 1) з виснаженням клітинних ресурсів НАД⁺ і АТФ та збільшенням клітинної загибелі за прозапальним і імуногенним некротичним типом; 2) з посиленням активації прозапальних транскрипційних факторів, зокрема NF-κB та AP-1, оскільки ПАРП-1 є їх коактиватором. Активація ферменту значно посилює синтез залежних від даних транскрипційних факторів прозапаль-

них чинників [1, 3]. В результаті мають місце активація клітин уродженого й адаптивного імунітету, пролонгація і посилення імунного запалення. Переривання цих процесів шляхом генетичного або фармакологічного пригнічення ПАРП – малосуттєвий протективний ефект, що було доведено на моделях імуноопосередкованих хвороб, таких як експериментальний аутоімунний енцефаломієліт, аутоімунний гепатит, ревматоїдний артрит, діабет 1-го типу, розлади репродуктивної функції [2, 3, 5, 6, 7]. Однак патогенетичну роль ПАРП і можливість терапевтичного застосування інгібіторів ферменту при захворюваннях, пов'язаних з утворенням і відкладанням імунних комплексів, практично не визначено. Такі дослідження є актуальними, оскільки процеси, спричинені імунними комплексами, у тій чи іншій мірі задіяні в ушкодження тканин при більшості імунних патологій [8, 9]. Представляє інтерес встановити ефекти застосування інгібіторів ПАРП за умов гіперімунокомплексемії, а також дослідити клітинні механізми їх дії, зокрема пов'язані з функціями клітин-ефекторів запалення. Тому метою роботи

© В.О. Срібна, Н.Г. Грушка, Т.В. Мартинова, Н.В. Макогон, 2016

було дослідити функціонально-метаболический стан клітин уродженого імунітету (нейтрофілів і макрофагів) при застосуванні інгібітора ПАРП 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) на тлі системного імунокомплексного ушкодження.

Матеріал і методи. Досліди проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА масою 18–22 г. При роботі дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Тварин розділили на три групи: I-ша – миші, яким моделювали імунокомплексне ушкодження шляхом імунізації бичачим сироватковим альбуміном (БСА, Sigma, США) один раз на тиждень протягом шести тижнів за схемою: I – введення – 150 мг БСА/кг; II – 175; III – 200; IV – 225; V – 250; VI – 275 мг/кг маси миші; 2-га група – миші, імунізовані БСА за схемою і яким введено блокатор ПАРП 4-ГК (100 мг/кг, Sigma, США) внутрішньоочеревинно, двічі на тиждень, при співпадінні з днем імунізації, за 1 год до застосування БСА; 3-тя – контрольна – введення ізотонічного розчину натрію хлориду у відповідному об'ємі. На 7-му добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу і вилучали матеріал для дослідження.

Фагоцитарну активність оцінювали за поглинанням часток латексу («ПанЕко», Росія) макрофагами перитонеального ексудату, як описано нами в роботі [10]. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не менше ніж 98 %. Розраховували фагоцитарний показник (ФП) – відсоток макрофагів, які поглинули частки латексу, від загального їх числа, а також фагоцитарне число (ФЧ) – середнє число часток латексу, що поглинуто одним макрофагом. Киснезалежний метаболізм нейтрофілів вивчали в тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ), заснованому на здатності НСТ відновлюватися до темно-синього формазану під впливом активних форм кисню (АФК), продукованих активними фагоцитами. Оцінювали 100 нейтрофілів на препаратах крові мишей, із розрахунком відсотка формазанопозитивних клітин і цитохімічного показника (ЦХП) за формулою $ЦХП = (A \cdot 0 + B \cdot 1 + C \cdot 2 + D \cdot 3) / 100$, де А, В, С і Д – кількість нейтрофілів: А – без формазану або його дуже мало; В – площа відкладень формазану не перевищує 1/3 від ядра такої клітини; С – відкладення займають від 1/3 до усієї площі ядра клітини; Д – площа включень формазану більша за площу

ядра [11]. З метою оцінки функціонального стану нейтрофілів крові застосовували також напівкількісний лізосомально-катіонний тест із розрахунком середнього цитохімічного коефіцієнта [11].

Результати статистично обробили. Аналіз даних трьох груп проводили з використанням one-way ANOVA з подальшим множинним порівнянням за допомогою пост-хок тесту Newman–Keuls. Результати досліджень фагоцитозу, які не мали нормального розподілу, аналізували з використанням непараметричного аналога ANOVA – Kruskal–Wallis тесту з наступним порівнянням між групами за критерієм Данна. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати. Довготривала імунізація мишей за розробленою нами схемою спричиняє гіперімунокомплексемію [12], яка проявлялася в збільшенні вмісту циркулюючих імунних комплексів в крові, а також у відкладанні імунних комплексів в тканинах печінки, селезінки, аорти, нирок, матки [12–14]. За даних умов мали місце активація клітин уродженого та набутого імунітету, посилення їх апоптотичної та некротичної загибелі, а також системні патологічні зміни судин і паренхіми органів [13, 15]. Імунізація БСА призводила до значного посилення поглинальної здатності (фагоцитозу) макрофагів, виділених з черевної порожнини мишей: ФП збільшувався на 65 %, ФЧ – на 51 % від контрольних значень (таблиця). Таким чином, в даній роботі досліджували дію інгібітора ПАРП 4-ГК на тлі системного запалення імунокомплексного генезу з мультиорганною дисфункцією. Проведені раніше імуноцитохімічні дослідження [7] показали, що застосовані доза БСА і схема імунізації спричиняли виражену активацію ПАРП як в клітинах імунної системи, так і в тканинах організму мишей. Введення 4-ГК на тлі імунокомплексної патології в дозі 100 мкг/кг було ефективним і приводило до суттєвого пригнічення даного ферменту із встановленням значень імуноцитохімічних показників активності ПАРП, близьких до контрольних [7].

Одним із важливих механізмів ушкодження різних тканин за умов імунокомплексної патології є збільшення продукції біологічно активних речовин (включаючи АФК) в результаті надмірної неадекватної активації клітин-ефекторів запалення [8, 9]. Дослідження їх функціонально-метаболического стану показало наступне.

Імунізація БСА призводила до значного посилення поглинальної здатності макрофагів, виділених з черевної порожнини мишей: ФП збільшувався на 65 %, а ФЧ – на 51 % від контрольних значень (таблиця). За умов імунотоксичної патології також посилювалася

рольних мишей та при введенні 4-ГК на тлі гіперімунокомплексемії. Інгібітор ПАРП суттєво зменшував відсоток формазанпозитивних клітин ($p < 0,001$) у порівнянні з імунованими мишами, однак даний показник залишався більшим від контрольного ($p < 0,05$).

Показники функціонально-метаболическої активності клітин уродженого імунітету за умов гіперімунокомплексемії, викликані імунізацією мишей БСА (Імунізація), та при введенні 4-ГК на тлі імунізації (Імун+4-ГК)

Параметр	Показник	Контроль	Імунізація	Імун+4-ГК
Поглиняльна здатність	Фагоцитарний показник, %	52,1±3,2 n=7	85,9±5,5* n=7	40,0±6,3## n=8
	Фагоцитарне число	6,5±0,1 n=7	9,8±0,8* n=7	6,0±0,4## n=8
НСТ-тест	% формазанпозитивних клітин	24,9±2,9 n=7	69,2±4,0*** n=7	39,6±5,3*### n=8
	Цитохімічний показник	0,30±0,03 n=7	0,92±0,08*** n=7	0,42±0,05*### n=8
Катіонні білки	Середній цитохімічний коефіцієнт	0,068±0,003 n=7	0,33±0,05*** n=7	0,11±0,01*### n=8
Нейтрофіли в крові, %	Загальна кількість	12,8±3,4 n=8	33,0±6,3** n=8	14,3±2,7## n=9
	Паличкоядерні нейтрофіли	4,8±1,5 n=8	9,3±1,2** n=8	2,9±0,7## n=9

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – по відношенню до контрольної групи; # $p < 0,01$; ## $p < 0,001$ – по відношенню до групи Імунізація.

генерація АФК, таких як супероксид-радикал, на що вказує значне зростання відсотка формазанпозитивних клітин при проведенні НСТ-тесту і цитохімічного показника (який відображає активність процесів в окремій клітині) у 2,8 та 3,1 раза відповідно (таблиця). Паралельно підвищувалося значення середнього цитохімічного коефіцієнта реакції на вміст катіонних білків – лізосомально-катіонний тест. Як відомо, неферментативні катіонні білки лізосом, окрім антимікробної дії, мають властивості медіатора запалення й фактора вторинної альтерації, призводячи до збільшення проникності судин, хемотаксису та активації лейкоцитів. Подібна до виявленої нами інтенсифікація утворення АФК і збільшення показників лізосомально-катіонного тесту спостерігалися при моделюванні хронічного гіперімунокомплексного синдрому у щурів [8]. Застосований нами на тлі імунотоксичної патології інгібітор ПАРП мав виражений нормалізуючий ефект, зменшуючи відсоток нейтрофілів в крові, а також показники функціональних тестів (таблиця). Так, не було виявлено статистично значущих відмінностей значень показників фагоцитозу, лізосомально-катіонного тесту та цитохімічного показника (за НСТ-тестом) у конт-

Обговорення результатів. За даними літератури, інгібування ПАРП має виражений протективний ефект при деяких імунозапальних процесах, що свідчить про участь ферменту в патогенезі даних захворювань [2, 3, 5, 6]. Наші дослідження на моделі гіперімунокомплексемії також показали, що блокування ПАРП за допомогою 4-ГК мало цитопротективну дію, зменшувало утворення і відкладання імунних комплексів в кліренсних органах і аорті та покращувало морфофункціональний стан організму [7, 14]. Нині визнається наступна схема ПАРП-опосередкованого ушкодження із встановленням позитивних зворотних зв'язків самопідсилення. Розриви ДНК, спричинені, зокрема, активними формами азоту та кисню, активують ПАРП, що є необхідним для процесів репарації. Однак при значному ушкодженні ДНК надмірна активація ПАРП може призводити до низки патологічних подій, таких як значне збільшення синтезу прозапальних чинників (цитокінів, молекул адгезії, iNOS тощо) та посилення загибелі клітин по некротичному типу із розривом плазматичної мембрани. Вихід клітинного вмісту назовні, у свою чергу, сильно активує клітини-ефектори запалення, наслідком чого є синтез прозапальних цито-

кінів, генерація активних форм кисню та азоту, посилення генотоксичного стресу та активація ПАРП [2, 3]. В даній роботі встановлено, що інгібування ПАРП при дії 4-ГК супроводжувалося зменшенням функціональної активності клітин-ефекторів запалення, зокрема генерації АФК, до рівня інтактних тварин. Це може бути одним із механізмів протективної дії інгібіторів ПАРП, які здатні переривати порочне коло ПАРП-опосередкованого посилення імунозапальних процесів.

Висновки

Встановлено значне підвищення функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету (нейтрофілів і макрофагів) за умов експериментальної системної імунотоксичної патології. Введення інгібітора ПАРП 4-ГК на тлі гіперімунотоксичності сприяло зменшенню показників фагоцитозу, нітросинього тетразолію та лізо-

сомально-катіонного тесту до рівня контролю. Нормалізація активності клітин-ефекторів запалення, зокрема зменшення генерації активних форм кисню, може бути важливим механізмом протективної дії інгібітора ПАРП за умов імунотоксичного ушкодження.

Перспективність подальших досліджень. Нині активно вивчається можливість профілактичного і терапевтичного застосування інгібіторів ПАРП за різних патологічних умов. Зважаючи на фізіологічну роль ПАРП, перспективним і більш безпечним лікувальним підходом вважають часткове інгібування ферменту природними, натуральними модуляторами його активності, серед яких флавоноїди, активні форми вітаміну Д, поліфеноли червоного вина тощо, що потребує подальших досліджень на моделях імунотоксичних хвороб, зокрема імунотоксичного ушкодження.

Література

1. Роль PARP та процесу полі-ADP-рибозилування протеїнів у регулюванні клітинних функцій / В.Р. Дрель, І.О. Шиманський, Н.О. Сибірна, М.М. Великий // Укр. біохімічний журнал. – 2011. – Т.83, № 6. – С. 5–34.
2. Bai P. Biology of poly(ADP-Ribose) polymerases: The factotums of cell maintenance / P. Bai // Molecular cell. – 2015. – Vol. 58, № 6. – P. 947–958.
3. Макогон Н.В. Полі(АДФ-рибозо)полімераза-1: фізіологічна і патологічна роль / Н.В. Макогон, І.М. Алексеєва // Фізіологічний журнал. – 2012. – Т. 58, № 3. – С. 95–112.
4. Banasik M. Natural inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 / M. Banasik, T. Stedeford, R.P. Strosznajder // Molecular Neurobiology. – 2012. – Vol. 46, № 1. – P. 55–63.
5. Патогенетическая роль поли(АДФ-рибозо)полимеразы в развитии экспериментального иммунного повреждения яичников у мышей / Е.А. Шепель, Т.Ю. Вознесенка, Н.В.Макогон и др. // Проблемы репродукции. – 2013. – Т. 19, № 5. – С. 35–42.
6. Poly (ADP-ribose)polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline exerts a protective effect against concanavalin A-induced hepatitis in mice / N. Grushka, N. Makogon, S. Pavlovych, et al. // J. Health Sciences. – 2013. –Vol. 3, № 11. – P. 463–468.
7. Lytvynenko A. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline exerts a protective effect on myometrial contractile activity in immune-complex mediated damage in mice / A. Lytvynenko // J. Health Sciences. – 2014. – Vol. 4, № 11. – P. 156–168.
8. Гіперімунотоксичний синдром в експерименті та клініці / В.В. Чоп'як, І.В. Вальчук, І.Г. Гайдучок та ін. // Вісник наук. досліджень. – 2007. – № 1. – С. 5–8.
9. Шмагель К.В. Молекулярные основы иммунотоксичной патологии / К.В. Шмагель, В.А.Черешнев // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 5. – С. 581–592.
10. Мартинова Т.В. Функціональна активність перитонеальних макрофагів при ураженні печінки мишей конканаваліном А / Т.В. Мартинова, Л.І. Алексюк // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 5. – С. 47–52.
11. Кауров А.В. Клиническая иммунология и аллергология / под ред. А.В. Караулова. – М.: Мед. информ. агентство, 2002. – С. 651.
12. Пат. на корисну модель № 93351. Спосіб моделювання імунотоксичного ушкодження у мишей / Н.В. Макогон, Т.Ю. Вознесенська, С.І. Павлович та ін. Заявл. 25.09.2014. Бюл. № 18. – С. 4.
13. Імуноморфологічна характеристика моделі системної патології імунотоксичного генезу у мишей / С.І. Павлович, А.П. Литвиненко, Н.В. Макогон та ін. // Вісник морфології. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 496–500.

14. Вплив інгібування полі(АДФ-рибозо) полімерази на відкладання імунних комплексів та скоротливість матки у мишей за умов системного імунотоксичного ушкодження / А.П. Литвиненко, С.І. Павлович, Н.В. Макогон, Р.І. Янчій // Медична гідрологія та реабілітація. – 2014. – Т.12, № 1–4. – С. 15–21.

15. Генотоксичний стрес і шляхи загибелі клітин тимуса та лімфовузлів мишей за умов системної імунотоксичної патології / Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна та ін. // Фізіол. журнал. – 2015. – Т. 61, № 1. – С. 28–34.

В.О. Срібна, Н.Г. Грушка, Т.В. Мартынова, Н.В. Макогон

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО) ПОЛИМЕРАЗЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ ПАТОЛОГИИ

Исследовали влияние ингибитора поли(АДФ-рибозо)полимераза (ПАРП) 4-гидроксиквиназолина (4-ГК) на перитонеальные макрофаги и нейтрофилы крови мышей при иммунокомплексной патологии. Гипериммунокомплексемия моделировалась путем длительной иммунизации мышей линии СВА возрастающими дозами бычьего сывороточного альбумина. Иммунизация приводила к сильной активации клеток: по фагоцитарному показателю в 1,7 раза, по проценту формазан-положительных клеток и цитохимическому показателю НСТ-теста в 2,8 и 3,1 раза, а также по лизосомально-катионному тесту в 4,8 раза. Введение иммунизированным мышам 4-ГК (100 мг/кг, дважды в неделю в течение 6 недель) приводило к уменьшению всех исследованных показателей функционально-метаболической активности клеток врожденного иммунитета до уровня контроля, что может быть важным механизмом выявленного нами протективного действия ингибитора ПАРП при иммунокомплексном повреждении.

Ключевые слова: мыши, иммунокомплексная патология, поли(АДФ-рибозо)полимераза, нейтрофилы, макрофаги.

V.O. Sribna, N.G.Grushka, T.V. Martynova, N.V. Makogon

FUNCTIONAL ACTIVITY OF INNATE IMMUNITY CELLS UNDER POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE INHIBITION IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL IMMUNE COMPLEX-MEDIATED PATHOLOGY

The influence of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 4-hydroxyquinazoline (4-HQ) on mice peritoneal macrophages and blood neutrophils under immune complex mediated injury was investigated. Hyperimmunocomplexemia was induced by a long-term immunization of CBA mice with increasing doses of bovine serum albumin. This immunization caused significant activation of cells: the percent phagocytosis was increased by 1.8-fold, the percentage of formazan-positive neutrophils and cytochemical index in NBT test by 2.8 and 3.1-fold, and cytochemical index of lysosomal-cationic test by 4.8 fold. Treatment of immunized mice with 4-HQ (100 mg/kg, twice a week during 6 weeks) resulted in decrease of all studied parameters of functional-metabolic activity of innate immunity cells to levels of control mice, that may be an important mechanism of protective action of PARP inhibitor on immune complex mediated injury.

Key words: mice, immune complex-mediated damage, poly(ADP-ribose) polymerase, neutrophils, macrophages.

Поступила 03.03.16