

УДК 614.876: 616.36–002: 617–091

## АУТОИММУННЫЙ ГЕПАТИТ КАК РЕЗУЛЬТАТ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ МАЛЫМИ ДОЗАМИ РАДИАЦИИ.

Ковалёв В.<sup>1</sup>, Круль Н.<sup>1</sup>, Жежера В.<sup>2</sup>, Сенюк О.<sup>1</sup>

*Аутоиммунный гепатит как результат хронического облучения малыми дозами радиации. — В. Ковалёв<sup>1</sup>, Н. Круль<sup>1</sup>, В. Жежера<sup>2</sup>, О. Сенюк<sup>1</sup>. — Известно, что ионизирующие излучения (ИИ) наряду с другими техногенными факторами могут приводить к изменению иммунного статуса организма, срыву иммунной толерантности и, как результат, к возникновению аутоиммунного гепатита (АИГ). На экспериментальной модели показан аутоиммунный характер поражения печени у мышей BALB/c, которые подвергались хроническому облучению малыми дозами радиации. Показано увеличение уровней аминотрансфераз и уровней аутоантител против печеночно специфического липопротеина (ПСП) в сыворотке крови. При патоморфологических исследованиях получена картина поражения печени характерная для АИГ, а также характерные поражения печени после введения здоровым животным сыворотки крови хронически облученных мышей.*

**Ключевые слова:** аутоиммунитет, иммунная толерантность, аутоиммунный гепатит, печеночный специфический липопротеин, экспериментальная модель.

**Адрес:** <sup>1</sup> – Институт проблем безопасности атомных электростанций НАН Украины, Отделение ядерной и радиационной безопасности, Ул. Кирова, 36–А, г. Чернобыль Киевской обл, 07270, Украина; <sup>2</sup> – Национальная детская специализированная больница "Охматдет", Ул. Чорновола, 28/1, г. Киев, 01135, Украина.

*Autoimmune hepatitis as a result of chronic irradiation the small doses of radiation. — V. Kovalov<sup>1</sup>, N. Krul<sup>1</sup>, V. Zhezhera<sup>2</sup>, O. Senyuk<sup>1</sup>. — It is known that ionizing radiation, along with other technogenic factors, can lead to change of the immune status of an organism, failure of immune tolerance and, as result, to occurrence autoimmune hepatitis (AIH). On experimental model it was shown the autoimmune character of liver lesions at BALB/c mice, which were exposed to a long-term irradiation in small doses. The increase in levels of aminotransferase and levels of autoantibody against liver specific lipoprotein (LSP) in blood serum was shown. The typical picture of liver lesions for AIH is received at pathomorphological researches, and also typical picture of liver lesions is received after administration blood serum from chronically irradiated mice to healthy animals.*

**Keywords:** autoimmunity, immune tolerance, autoimmune hepatitis, liver specific lipoprotein, experimental model.

**Address:** <sup>1</sup> – Institute for Safety Problems of Nuclear Power Plants National Academy Sciences of Ukraine (ISPNPP); 36–a, Kirova st., Chornobyl, Kyiv reg., 07270 Ukraine; e-mail: kovalev\_v@ua.fm; <sup>2</sup> – National specialized child's hospital "Okhmatdet", Chornovola street, 28/1, Kyiv, 01135, Ukraine.

### Вступлення

Комбинируемое влияние техногенных, ксенобиотических, а в некоторых случаях и радиоактивных факторов приводит к снижению иммунологической толерантности у населения и является пусковым моментом для развития целого ряда аутоиммунных состояний и заболеваний разных органов и систем. Значительное место в этой совокупности занимает аутоиммунный гепатит, который представляет собой сложное заболевание, как для изучения, так и для лечения. В его патогенезе важная роль отводится стимуляции аутоиммунных реакций против собственных мембранных белков печени [1] Считается, что печеночно-специфический липопротеин является высоко специфическим антигеном для печени [2]. Он представляет собой смесь антигенных детерминант субстрата из мембран гепатоцитов. В силу своей лабильности некоторые белки, входящие в состав ПСП, в частности асиалогликопротеиновый рецептор (АСГПР) [3], в определенных условиях, в том числе

под влиянием малых доз радиации, могут приобретать аутоантигенные свойства. При попадании в межклеточное пространство в случае клеточной деструкции они становятся доступными для иммунного распознавания и стимулируют наработку соответствующих аутоантител, опосредующих лизис интактных гепатоцитов.

Цель работы – изучение поражений печени, связанных с аутоиммунными механизмами у экспериментальных животных под влиянием малых доз ионизирующих излучений низкой интенсивности.

### Материалы и методы

В эксперименте использовали половозрелых 2 – 3-х месячных мышей линии BALB/c, которые были разделены на две группы по 30 особей в каждой. I-я группа животных экспонировалась в течение 100 дней в гамма-полях, создаваемых "горячими частицами", полученными из модифицированного в процессе аварии 1986 г. ядерного топлива 4-го блока ЧАЭС [4]. Эти частицы предварительно бы-

ли иммобилизованы в бетоне, из которого изготовили 20 брикетов по размеру dna клеток для содержания мышей. На бетонные брикеты, помещенные в металлические футляры, ставили клетки с мышами. Мощность экспозиционной дозы колебалась от 25 до 40 мкЗв/час, обеспечивая получение общей дозы за указанный период экспозиции в диапазоне от 4,6 до 10,0 сЗв. Равномерное распределения дозы облучения достигалось за счет периодической смены (2 раза в неделю) брикетов под клетками с животными. II-я группа не была облучена и использовалась в качестве контроля. Параллельно проводили иммунизацию животных этой же линии с целью получения экспериментальной модели АИГ. Иммунизацию проводили препаратом ПСЛ, который выделили из печени сингенных мышей по McFarlane I.G [5]. Для этого тканевую суспензию, содержащую выделенный субстрат, центрифугировали при 105 000 g, затем обогащали переосаждением сульфатом аммония в диапазоне концентраций от 30 до 40 % насыщения. Конечная концентрация белков в препарате по Бредфорду [6] составляла 2,8 мг/мл. Схему иммунизации применяли согласно описанию [7]. Субстанцию вводили в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) в соотношении 1: 1. Белковую смесь предварительно доводили до концентрации 2мг/мл натриево-фосфатным буфером, pH 7,3. При первой инъекции одно животное получало по 200 мкг белка. Второе введение проводилось через 12 дней и содержало половинное количество белка. В последующем иммунизацию поддерживали путем введения половинного количества материала по отношению к первому введению каждые 2 недели. Контрольным животным вводили смесь физиологического раствора с ПАФ. Начиная с 3-его раза, вводили один только физиологический раствор. Биологический материал отбирали через 14, 28, 60 и 90 дней. Мышей умерщвляли путем декапитации под легким эфирным наркозом. Для исследования собирали пул крови и печени из 3 – 4-х животных. В сыворотке крови исследовали уровни аутоантител против ПСЛ и клеточной аланинаминотрансферазы (АЛТ). Ткань печени фиксировали в 10% растворе формалина на 0,1М натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) и подвергали патоморфологическому исследованию. Для исследования уровней и специфичности аутоантител в сыворотках крови использовали иммуноферментный анализ (ИФА) [8].

### Результаты и обсуждение

Воздействие ионизирующих излучений на живое вещество реализуется в структурных изменениях биологических молекул. Реакция организма зависит от величины МЭД, локализации биологической активности облучаемых молекул, состояния клеточных систем репарации и т.д. Масштабы этих процессов в клетке временами настолько велики, что осуществляются существенные изменения в ее метаболизме и физиологических функциях.

Даже незначительное изменение структуры белковой молекулы может быть значимым, если влечет за собой изменение ее антигенной структуры с проявлением у такого белка свойств "чужеродности" для собственной иммунной системы и с последующей выработкой тканеспецифических аутоантител. Совокупность всех этих изменений приводит к отмене иммунной толерантности и возникновению аутоиммунного состояния, которое в зависимости от специфики поражения биологических структур и степени поражения отдельных органов реализуется в виде определенных аутоиммунных заболеваний таких как аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунный гепатит и т.д. Было установлено, что уровни аутоантител к ПСЛ у персонала зоны отчуждения ЧАЭС со стажем работы не менее 10 лет значительно превышают таковые у доноров станции переливания крови г. Киева и приближаются к уровням больных хроническими гепатитами В, С, В+С [4].

Для подтверждения гипотезы о высокой вероятности отмены системной иммунной толерантности, в частности в отношении мембран ассоциированных антигенов печеночной ткани, в условиях длительного воздействия малых доз ИИ низкой мощности у хронически облучаемых мышей Balb/c в саниГреевом диапазоне доз, исследовали сывороточные уровни аутоантител к ПСЛ – I-e, 14-e, 28-e, 60-e и 90-e сутки после первого введения ПСЛ животным иммунизируемой группы. Одновременно этот показатель определяли у животных, которых иммунизировали наработанным препаратом ПСЛ. Материал забирали во всех группах в одно и то же время. Полученные данные представлены в таблице 1., результаты приведены в оптических единицах.

Как следует из приведенных данных, определенный исходный уровень аутоантител к ПСЛ является в сыворотках крови контрольных животных, причем проявляет тенденцию к повышению в процессе старения мышей. Априори понятно, что у иммунизируемых животных количество аутоантител против ПСЛ прогрессивно повышается и уже к концу первого месяца иммунизации достигает пика, затем несколько снижается и стабилизируется на протяжении последующих двух месяцев. В то же время у животных, которые находятся в условиях хронического облучения, также определяется положительная динамика сывороточных аутоантител к ПСЛ в процессе накопления дозы. В этой группе уровни аутоантител против ПСЛ возрастают постепенно, но тенденция к увеличению количества аутоантител сохраняется, по крайней мере, на протяжении всего периода наблюдения.

Общеизвестно, что ИИ вызывают активацию, ингибирование или прямое повреждение биохимических систем живого организма. На клеточном уровне одной из реакций на острое облучение является деструкция клетки с утратой специфиче-

ской морфологии и функциональной активности. На сегодняшний день известно несколько форм летального исхода у клеток, зависящих от продукции АТФ, – апоптоз, некроз и репродуктивная гибель. Пострадиационный апоптоз характеризуется сохранением целостности клеточной плазматической мембраны и отсутствием контакта внутриклеточного содержимого с клетками иммунной системы. В конечном итоге остатки апоптотических клеток в обновляющихся тканях удаляются путем экфолиации во внутриорганный пространство и в дальнейшем экскретируются из организма. Но при недостатке АТФ, в частности в связи с воздействием ИИ, энергозависимые механизмы апоптоза могут отключаться, и клетка некротизируется с утратой целостности клеточной мембраны

и выделением высокомолекулярных компонентов (например, АЛТ, АСТ и др.) в межклеточное пространство. Некроз вызывает ответную реакцию в форме воспаления – инфильтрацию лейкоцитами пораженной ткани, накопление межклеточной жидкости с последующей индукцией специфического ИО на демаскированные и распознанные лимфоцитами внутриклеточные компоненты. Таким образом, в результате интенсивного радиационного облучения закономерно происходит гибель чувствительных к ИИ воздействию клеточных популяций в обновляющихся тканях – эпителии желудочно-кишечного и урогенитального тракта, дыхательных путей, с последующим выходом внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство и кровь.

**Таблица 1.** Уровни аутоантител против ПСЛ в сыворотках крови хронически облучаемых и иммунизируемых ПСЛ Balb/c мышей

**Table 1.** Levels of autoantibodies against the PSL in the blood serum of chronically irradiated and PSL-immunized Balb/c mouses

Дни отбора биоматериала в связи с иммунизацией	Группы экспериментальных мышей (Balb/c)		
	Контрольная группа	Иммунизированные ПСЛ	Экспонированные в гамма-полях
1-й день	0,165 ± 0,035	0,165 ± 0,085	0,165 ± 0,077
14-й день	0,207 ± 0,088	0,441 ± 0,021	0,242 ± 0,037
28-й день	0,254 ± 0,019	0,534 ± 0,043	0,349 ± 0,068
60-й день	0,228 ± 0,034	0,443 ± 0,052	0,342 ± 0,031
90-й день	0,227 ± 0,017	0,485 ± 0,046	0,373 ± 0,031

**Таблица 2.** Сывороточные уровни аланинаминотрансферазы у интактных, облученных и иммунизированных ПСЛ мышей (см. табл. 1), (мЛМ/мл)

**Table 2.** Serum levels of alaninaminottransferaze in intact, irradiated and PSL-immunized mouses (see Table 1), (mLM/ml)

Дни отбора биоматериала в связи с иммунизацией	Группы экспериментальных мышей (Balb/c)		
	Контрольная группа	Иммунизированные ПСЛ	Экспонированные в гамма-полях
1-й день	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,04
14-й день	0,31 ± 0,04	0,43 ± 0,04*	0,34 ± 0,01
28-й день	0,34 ± 0,07	0,79 ± 0,06*	0,57 ± 0,07*
60-й день	0,82 ± 0,07*	1,43 ± 0,05 *	0,95 ± 0,08*
90-й день	1,17 ± 0,08*	2,28 ± 0,08 *	1,64 ± 0,07*

Примечание:  $p < 0,05$

Учитывая сказанное выше, авторы дополнительно определяли уровень в периферической крови внутриклеточного фермента – аланинаминотрансферазы (АЛТ). Увеличение сывороточных уровней этого фермента считается признаком воспалительного процесса в печени – гепатита, ибо большое количество АЛТ высвобождается из разрушенных клеток этого органа. Полученные данные приведены в таблице 2.

Анализ полученных результатов позволяет сделать заключение о наличии ассоциаций между сывороточными уровнями АЛТ и возрастом. У стареющих мышей этот показатель закономерно повышается, достигая достоверных отличий на четвертом месяце жизни, что отражает усиление клеточной деструкции в тканях старых животных. Более значимое повышение показателя АЛТ в крови отмечается у облучаемых мышей (достоверное повышение АЛТ наблюдается уже в кон-

це первого месяца наблюдения), и особенно у мышей, иммунизируемых против мембранассоциированных антигенов печени, содержащихся в используемом препарате ПСЛ. У этой группы экспериментальных мышей сывороточные уровни АЛТ возрастают уже в конце второй недели после начала иммунизации.

Зарегистрированное нами увеличение содержания внутриклеточного фермента АЛТ в крови у всех групп наблюдаемых мышей может быть косвенным подтверждением гибели печеночных клеток *in vivo*.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что 100-дневное низкоинтенсивное облучение гамма-полями от "горячих частиц" топливного происхождения в отношении сывороточных уровней АЛТ проявляет достаточную эффективность. Иммунизированные мыши лишь на одну неделю опережают облучаемых мышей по достижению достоверно значимых

уровней повышения этого показателя по сравнению с исходным уровнем.

Следует подчеркнуть, что уже после первой инъекции активность многих животных падает, у них появляются неестественные движения. У некоторых нарушается координация, появляются круговые движения по направлению нос-хвост. Изменяется гладкость и блеск шерсти. Но к концу третьей недели мышцы приобретают нормальный вид, а еще через какое то время они внешне не отличаются от животных контрольной группы. Аутоиммунный процесс приобретает вялотекущий характер без внешних проявлений.

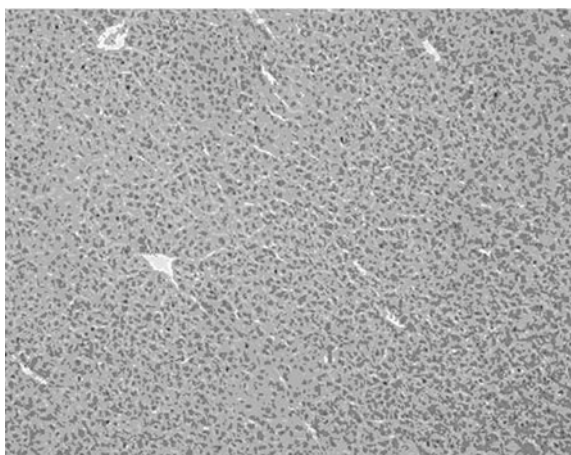


Рис. 1. Печень здоровой мыши

Fig. 1 Liver of healthy mouse

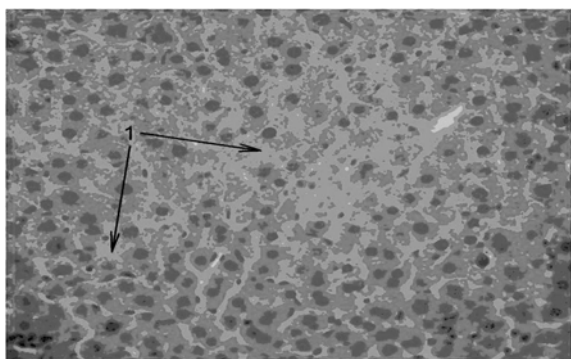


Рис. 2. Дистрофия гепатоцитов с нарушением архитектоники органа и деструкцией части ядер: 1 – нарушение архитектоники долек, размытые границы

Fig. 2. Dystrophy of hepatocytes with violation of the architectonics of the organ and the destruction of the part nuclei: 1 – a violation of the architectonics of the lobules, blurred contours

Зарегистрированная динамика протекания аутоиммунного состояния коррелирует с патоморфологической картиной печеночной ткани. На рис. 1 представлена морфологическая картина печени здорового 2-х месячного животного из контрольной группы. На рисунке четко видна глобулярная структура органа с хорошо различаемыми трабекулами, радиально распространяющимися от портальной вены. По всей пло-

щади среза хорошо различимы границы клеток и ядра. На рис. 2 представлен срез ткани печени с начинающимся воспалительным процессом, который еще нельзя дифференцировать как аутоиммунный процесс.

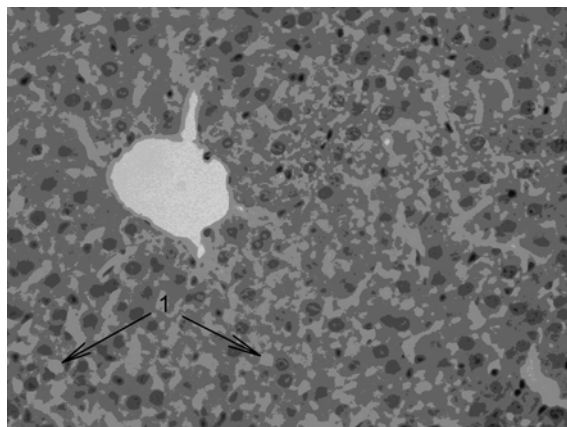


Рис. 3. Обозначены пустоты, как результат жировой дистрофии

Fig. 3. Expressed the emptiness, as a result of fatty degeneration

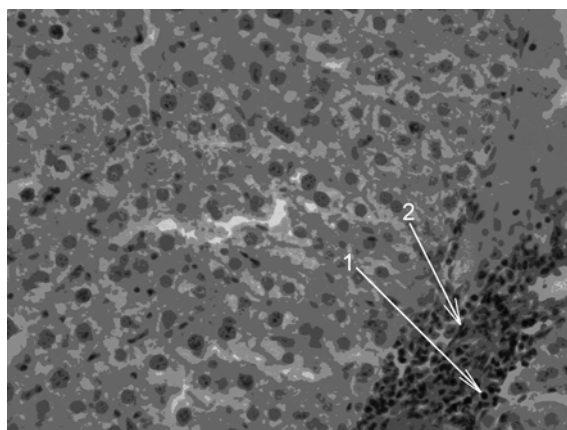


Рис. 4. Инфильтрат в области портального тракта: 1 – лимфоциты, 2 – гистиоциты

Fig. 4. Infiltrate in the portal tract: 1 – lymphocytes, 2 – histiocytes

На рисунках 3 и 4 показаны более глубокие дистрофические процессы в паренхиме. В местах инфильтрации наряду с лимфоцитами появляются гистиоциты, свидетельствующие о начинающемся коллагеновом замещении пораженной паренхимы. Для подтверждения аутоиммунной гипотезы наблюдаемого процесса группе здоровых мышшей вводили сыворотку хронически облученных животных, а второй группе – сыворотку иммунизированных животных. Через 10 дней животных умерщвляли. Печень подвергали гистологическому исследованию. На рисунках 5 и 6 видны глубокие дистрофические и некротические поражения паренхимы печени идентичные для обеих групп животных. Образование гранулем и появление участков дистрофии и некроза после введения здоровым мышшам сыворотки крови иммунизированных и находящихся в условиях хронического облучения свидетельствует

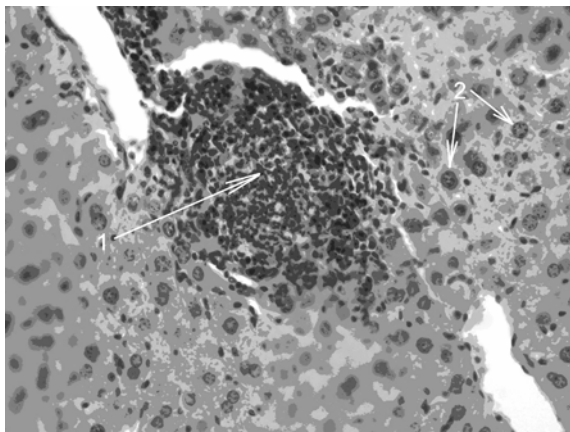


Рис. 5. Образование гранул в перипортальных участках паренхимы: 1 – формирование грануломы на месте инфильтрата; 2 – параллельно идет восстановление утраченных гепатоцитами функций, происходит регенерация и репарация гепатоцитов, ядра их увеличены, "сочные"

Fig. 5. Formation of granulomes in the periportal areas of the parenchyma: 1 – formation granulomes on infiltrate site; 2 – along comes the restoration of the lost functions of hepatocytes, regeneration occurs and the repair of hepatocytes, the nuclei enlarged, "mellow"

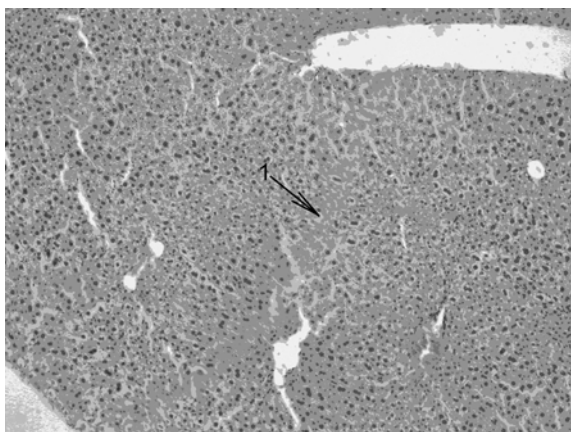


Рис. 6. Образование "мостовых" (балочных) междольковых участков некроза

Fig. 6. The formation of "bridge" (beam) interlobular areas of necrosis

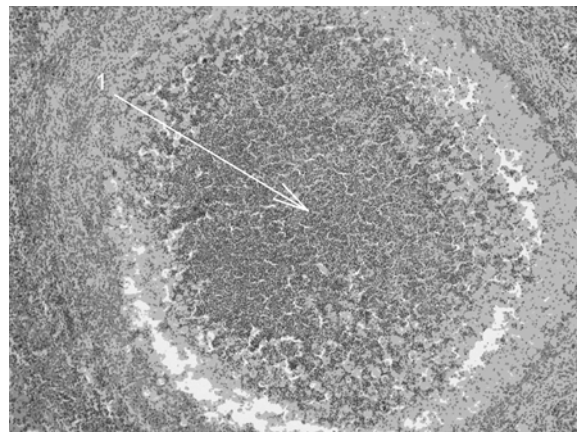


Рис. 7. Инкапсуляция грануломы с явлениями некроза

Fig. 7. Encapsulation of granulomes with the phenomena of necrosis

об агрессивности привнесенных антител направленной против гепатоцитов, а, следовательно, и против паренхимы печени. При высокой интенсивности процесса, изменения в тканях могут носить необратимый характер. На рис. 7 показана инкапсуляция гранулированного участка и начало его некроза. При более благоприятном протекании процесса рядом с участками поражения появляются участки регенерации (рис. 5).

#### Выводы

1. У мышей, которые более трех месяцев находятся в условиях хронического облучения малыми дозами радиации, создаются условия для развития процессов поражения печени аутоиммунного характера.
2. Компенсаторные механизмы организма позволяют животным сохранять внешнее здоровье при достаточно серьезных патоморфологических изменениях в паренхиме печени.
3. Ионизирующие излучения, даже при низкой интенсивности, нужно рассматривать как источник неблагоприятных воздействий на живые организмы и как фактор риска для персонала группы А и населения, проживающего на радиационно загрязненных территориях.

1. Krawitt E. L. Autoimmune Hepatitis // *The New England Journal of Medicine*. – 1996. – 334, №14. – P. 897 – 903
2. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Büschenfelde K-H. Characterization of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen // *Lancet*. – 1987. – P. 292 – 294.
3. Treichel U., Schreiter T, Zumbuschfeld K.H.M., Stockert High-Yield R.J. Purification and Characterization of Human Asialoglycoprotein Receptor // *Protein Expression and Purification* – 1995. – 6, № 3. – P. 251 – 255.
4. Kovalov V. A., Senyuk O. F. Of tolerance state in conditions of influence of the effect radiations of "the chernobyl spectrum" // *Ecologicheskii vestnik* – Minsk, 2008. – 5, №2. – P.36 – 43.
5. McFarlane I. G., Wojcicka B. M., Zucker G. M., Eddleston A. L., Williams R. Purification and Characterization of human liver-

- specific membrane lipoprotein (LSP) // *Clin. Exp. Immunol.* – 1977. – 27, №3. – P. 381 – 390.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.* – 1977 – 86. – P. 193 – 200.
7. Ryabenko D. V., Sidorik L. L., Sergienko O. V., Trunina I. V., Bobyk V. I., Fedorkova O. M., Kovenia T. V., Matsuka G. Kh. Myosin-induced myocardial damage: experimental study // *Ukrainian Rheumatology Journal* – 2001. – 3, №1. – P. 58 – 61
8. Patela S., McLauchlina J., Casemoreb D. P. A simple SDS-PAGE immunoblotting technique using an enhanced chemiluminescence detection system to identify polyclonal antibody responses to complex cryptosporidial antigen preparations following a monoclonal antibody retest and image overlay technique // *J. Immunol. Meth.* – 1997 – 205, №2. – P.157 – 161.

Отримано: 30 листопада 2009 р.  
Прийнято до друку: 10 грудня 2009 р.