

T hücre aktivasyonuna bağlı hepatik yıkım: Deneysel bir model(*)

Hepatic damage due to T cell activation: An experimental model

Nuray Gürel-Polat,¹ Suzan Adın-Çınar,² Aydın Çevik,² Mutlu Küçük,² Selim Badur¹

İstanbul Üniversitesi¹ İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD Viroloji ve Temel İmmünoloji BD, ²Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul

İletişim / Correspondence: Nuray Gürel-Polat Adres / Address: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji, Klinik Mikrobiyoloji AD, Çapa, İstanbul E-mail: nurayselecuk@hotmail.com

ÖZET

Birçok infeksiyon hastalığında olduğu gibi deneysel modeller oluşturularak önemli sağlık sorunlarından olan hepatitlerin immüno-patogenezi aydınlatılmaya çalışılmaktadır; bu amaçla ilk aşamada immünolojik etkili mitojen veya toksik madde injeksiyonu ile deney hayvanlarında hepatit tablosu oluşturulmaktadır.

Çalışmamızda T hücre aktivasyonuna bağlı hepatik hasarın gelişimi deneysel olarak araştırılmıştır. Bu amaçla BALB/c farelerde intravenöz (10µg/ml) endojen mediatör lipopolisakkarit (LPS) injeksiyonu ile akut inflamatuvar karaciğer hastalığı; lektinlerden Con-A'nın intravenöz (0.3mg/fare) injeksiyonu sonucu otoimmün kronik aktif hepatit gelişimi gözlenmiştir. Akut hepatik hasar 24 saat içinde plazma transaminazlarının artışı ile izlenmiştir. Periferik kan lenfosit alt grupları (CD4, CD8, CD3 ve CD25) flow sitometri ile araştırılmıştır. Histopatolojik olarak, kontrol gurubuna oranla deney grubunun karaciğer dokularında sentral venler çevresinde ve portal alanlarda mononükleer ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonu sonucu karaciğer hasarı tespit edilmiş olan çalışmada, Con-A ve LPS verilen gruplarda NK ve CD25 (sırasıyla p<0.01; p<0.005 ve p<0.0003; p<0.0001) ekspresyonunda belirgin artış gözlenmiştir.

Bu deneysel model, T hücre aktivasyonuna bağlı hepatit gelişiminin araştırılmasında rol oynayan hücrelerin gösterilmesi ve ayrıca immün sistemin diğer mekanizmalarının araştırılması için de uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: BALB/c fare, con-A, LPS, karaciğer hasarı, periferik lenfosit altgrupları

SUMMARY

This study attempts to have an insight into the immunopathogenesis of viral hepatitis, which are a major health problem throughout the whole world. For this purpose, hepatitis has intentionally been produced in laboratory animals by injecting them mitogenic or toxic substances know to have an immunologic effect the immune system.

In this study, development of hepatic damage due to T. cell activation was investigated in vitro. By injecting iv 10µg/ml endogenous mediator lipopolysaccharide (LPS), acute inflammatory liver disease was produced in BALB/c mice. Likewise, autoimmune chronic active hepatitis was observed to develop in the mice in which Con-A of the lectins was used (iv 0,3 mg/mice). Acute hepatic damage was evidenced by the increase of the transaminase levels followed up for 24h. A flow cytometer was used in measuring the peripheral blood lymphocyte subgroups of CD4, CD8, CD3, NK and CD25. In the Con-A and LPS groups, a significant increase in the expression of NK (p<0,01; p<0,005 respectively) and CD25 (p<0,003; p<0,0001 respectively) was observed. The histopathological examination of the liver tissues of both the control and experiment groups revealed that in the latter group, there was hepatic damage around the central veins and portal areas due to mononuclear and polymorphonuclear cell infiltration.

The results show that the experimental method employed in this study will make it possible to investigate cells that are responsible for the development of hepatitis due to T cell activation, various cytokines and apoptosis .

Key words: Balb/c mice, Con-A, LPS, liver damage, peripheral lymphocyte subgroups.

(*) Bu çalışma III. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumunda (Ankara, 1996) sunulmuştur.

GİRİŞ

Viral hepatitler tüm dünya ülkelerinde önemli bir sağlık sorunudur ve konu ile ilgili olarak çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bir bölümünde, hayvan modelleri oluşturularak viral hepatitlerin immünopatogenezi aydınlatılmaya çalışılmakta, bu amaçla ya virus transferi ya da immünolojik etkili mitojen veya toksik madde enjeksiyonu ile deney hayvanlarında hepatit tablosu oluşturulmaktadır. Biyolojik olaylarda endojen mediatör olan Gram negatif bakterilerden elde edilen lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu ile akut inflamatuvar karaciğer hastalığı, ayrıca T hücrelerinin aktivasyonunu sağlayan lektinlerden concavalin A'nın (con-A) enjeksiyonu ile otoimmün kronik aktif hepatit gelişimi mümkündür. Con-A ile indüklenen hepatitin oluşumu T hücre aktivasyonu ve çeşitli sitokinlerin üretimi ile bağlantılıdır. Lenfositler ve mononükleer hücrelerden lenfokinlerin salınımı *in vitro* stimülasyonda patofizyolojik bulgular hakkında bilgi verir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, 7-10 haftalık BALB/c farelerden oluşan üç deney hayvanı gurubu kullanılmıştır. T hücre aktivasyonunu sağlayan con-A (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, ABD) patojenden arındırılmış PBS içinde (0.3 mg/fare), LPS ise (*Escherichia coli*, 0.11: B4; Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, ABD) intravenöz (10µg/ml) yoldan injekte edilmiştir. Kontrol grubuna aynı şartlarda PBS enjeksiyonu uygulanmıştır. İnjeksiyon sonunda aktif hepatik hasar oluşumunu takip etmek için serum alanin aminotransferaz (ALT), serum aspartat amino transferaz (AST) 24 saat içinde plazma transferazların artışı ile takip edilmiştir. Plazma transaminazlar kuru sistem (spotchem, HESKA, ABD) ile değerlendirilmiştir. Plazma transaminaz değerlerinin artışı sonucu periferik kan lenfosit yüzey antijenleri Flow sitometri ile çalışılmıştır.

Flow sitometri çalışması. Periferik kan lenfosit alt gruplarının değerlendirilmesinde CD4⁺ (Yardımcı T lenfositleri; Pharmigen, San Diego, CA,

ABD), CD8a (Sitotoksik T; Pharmigen, San Diego, CA), Natural Killer (NK; Pharmigen, San Diego, CA), CD25 (IL-2 reseptörü; Pharmigen, San Diego, CA) ve CD3 (Total T, Serotec, İngiltere) monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Nonspesifik bağlanma uygun izotipte işaretli antikorlar ile belirlenmiştir. 100µl heparinli kan uygun konsantrasyonda monoklonal antikor ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 2 ml lysing solüsyonu (Becton Dickinson, ABD) eklenerek 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında PBS ile 5 dakika 850 rpm'de santrifüj edildikten sonra, üst sıvı uzaklaştırılmış ve 1 ml PBS %0.2 paraformaldehit eklendikten sonra Flow sitometri (FACScan, Becton Dickinson, ABD) cihazında Lysis II yazılımı ile analiz edilmiştir.

Histolojik değerlendirme. Hayvanlar serum transaminazlarının yükselmesi sonucu 24 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Karaciğer dokuları %10 formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüştür. Histolojik değerlendirme için 5µm kesitler hazırlanarak ve hematoksilin-eosin ile boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

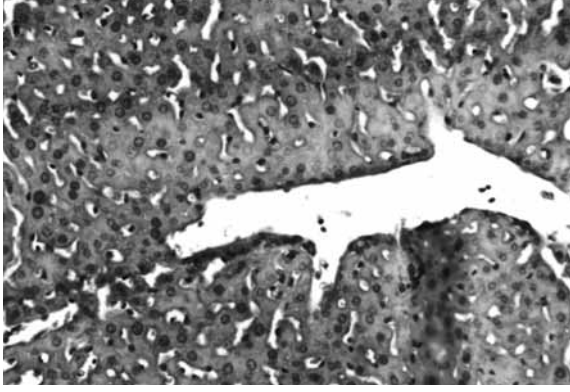
İstatistiksel değerlendirme. Mann Whitney-U testi kullanılmış, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

BALB/c farelere yapılan uyarı enjeksiyonları sonucunda, plazma transaminaz seviyelerinin 24 saat içinde en yüksek düzeye ulaştığı saptanmıştır (Tablo 1).

Periferik kan lenfosit yüzey antijenlerinden CD3, CD4, CD8, CD25 ve NK ekspresyonlarındaki değişim Flow sitometri ile çalışılmıştır. CD3, CD4, CD8 ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmamasına karşılık, con-A ve LPS grubunda NK (p<0.01; p<0.005), CD25 (p<0.0003; p<0.0001) ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Tablo 2, 3). Histopatolojik olarak, kontrol grubuna göre deney grubunun karaciğer dokularında, santral venler çevresinde ve portal alanlarda mononükleer ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonu sonucu karaciğer hasarı tespit edilmiştir (Şekil 1).

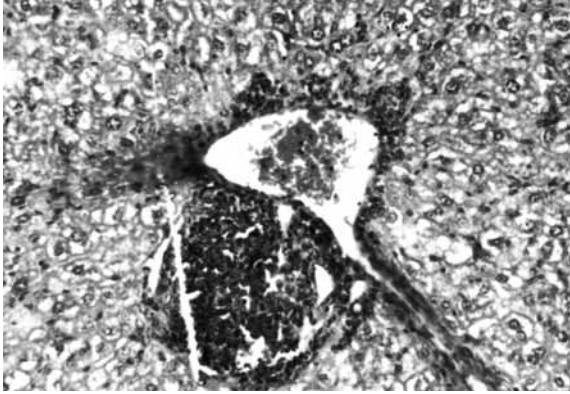
Şekil 1. con-A ve LPS injeksiyonundan 24 saat sonra karaciğer dokusunda görülen değişikliklerin ışık mikroskobu görüntüleri A: Kontrol grubu, B,B',C: LPS grubu, D: con-A grubu (Hematoksilen-eosin A,B,B',D x20, C x40 büyütme).



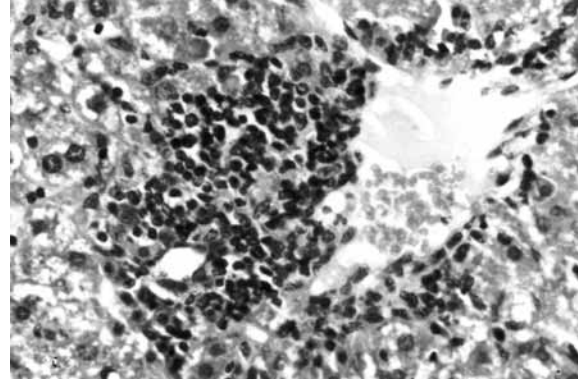
A:KONTROLx20



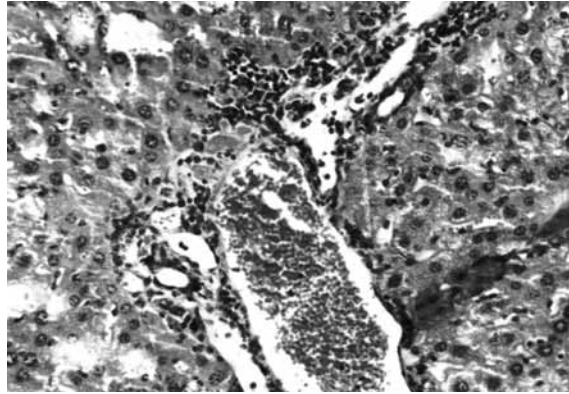
B:LPSx20



B':LPSx20



C:LPSx40



D:Con-Ax20

Tablo 1. con-A ve LPS injeksiyonu sonrasında plazma transaminaz değerleri (24 saat).

	con-A	LPS	Normal Değer (IU/ml)
SGOT (AST)	407.3 ± 224	499.3±224	20 - 48
SGPT (ALT)	49.3 ± 53.3	39.1±47.8	20 - 45

Tablo 2. con-A injeksiyonu sonucu lenfosit yüzey antijenleri ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması.

	Con-A	Kontrol	p
CD4	38.28 ±11.9	29.1 ± 8.7	0.100
CD8	18.42 ± 6	20 ± 7.2	0.550
CD3	49.2 ± 13.6	52.1±19.9	0.730
CD25	30.7 ± 9.8	5.2 ± 2	0.0003*
NK	4.14 ± 3.5	1.6 ± 0.8	0.010

Tablo 3. LPS injeksiyonu sonucu lenfosit yüzey antijenleri ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması.

	LPS	Kontrol	p
CD4	31.7 ± 11	29.1±8.7	0.480
CD8	30.1 ± 17	20±7.2	0.130
CD3	40.2 ± 22.5	52.1±19.9	0.230
CD25	33 ± 15.7	5.2±2	0.0001*
NK	3.2 ± 1.4	1.6±0.8	0.005*

Tablo 4. con-A ve LPS'nin lenfosit yüzey antijenleri ekspresyonuna etkisinin karşılaştırılması.

	Con-A	LPS	p
CD4	38.3 ± 11.9	31.7 ± 11	0.180
CD8	18.4 ± 6	30.1 ± 17	0.260
CD3	49.2 ± 13.6	40.2 ± 22.5	0.590
CD25	30.7 ± 9.8	33 ± 15.7	0.840
NK	4.1 ± 3.5	3.2 ± 1.4	0.830

Con-A injeksiyonu sonucunda karaciğer dokusunda morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre doku bütünlüğünün bozulduğu ve vakuolleşmenin olduğu saptanmıştır. Hepatositlerde de sitoplazmanın azaldığı ve vakuolleşmenin arttığı görülmüştür. Portal alanlara kan yoluyla hücre göçü ve damar etrafında hücre birikimi olmuştur. Bu hücrelerin kan yoluyla gelen lökositler ve mononükleer hücreler olduğu düşünülmektedir. Çünkü con-A genel olarak T hücre aktivasyonuna neden olur. Bundan dolayı con-A'ya bağlı doku hasarlanması mekanizması, karaciğerde makrofajlar ve aktive olan yardımcı T lenfositlerinin olduğunu düşündürmektedir. Mitojen ile aktive edilmiş CD4 lenfositlerinde CD25 ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak artması bunun göstergesidir (Tablo 2).

LPS injeksiyonu sonucunda ise, con-A tablosunda görülen değişiklikler gözlenmekle beraber daha fazla nekrotik alanlar gözlenmiştir. Karaciğer dokusunda görülen hücreler arası etkileşimin azalması ve vakuolleşmenin arttığı saptanmıştır. İnflamatuar hücrelerin sentral venler ve portal alanlara yoğun göçü gözlenmiştir. Periferik kanda NK hücrelerinin artışında bunun göstergesidir (Tablo 3). Kan yoluyla bu hücrelerin dokuya göçü artmıştır. LPS' in injeksiyonu ile karaciğerdeki makrofajlardan salgılanan inflamatuvar sitokinlerin de doku hasarında rol oynadığı düşünülmektedir (Tablo 3).

TARTIŞMA

Deneysel modellerin azlığı nedeniyle hepatit ve hepatosellüler bozulmanın gelişimi hücrel ve moleküler düzeyde tam çalışılmamaktadır. Bu yüzden uygun hayvan modelleri ile otoimmün hepatit gibi immünolojik bazlı hepatik hastalıkların patofizyolojisinin araştırılmasına olanak sağlar. Bu amaçla çalışmamızda Con-A ve LPS kullanılmıştır. LPS, Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan kompleks bir glikolipiddir, kanda bulunan soluble CD14 molekülü ile oluşturduğu kompleks ile endotelial ve epitel hücreleri aktive etmektedir. Kanda bulunan pikomolar konsantras-

yonda bile etkili, makrofaj ve polimorfonükleer hücrelerin aktivasyonuna neden olmakta böylece immün, inflamatuvar ve vasküler sistemi etkilemektedir(1).

Uyguladığımız deneysel modelde, LPS'in kuyruk veninden enjeksiyonu ile kan tablosunda IL-2 reseptörü CD25 ekspresyonunda da anlamlı oranda artış saptanmıştır.

NK hücrelerinde de kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Histopatolojik incelemede ise, portal alanlarda hücre birikimi görülmüş, bu hücre grubunun kan yolu ile göç eden PMN ve NK hücreleri olduğu kanısına varılmıştır. Portal alanlar ve sentral venler çevresinde meydana gelen nekrotik alanların kontrol grubuna göre fazlalığı dikkat çekicidir. Karaciğer dokusundaki genel hasar görünümü ve büyük nukleuslu hücreler ışık mikroskopunda görülmektedir. Bu hasarı karaciğer makrofajlarının aktive olması ve bu aktivasyon sonucunda inflamatuvar sitokinleri salgıladıkları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. (2,3,9)

Galaktozamin (GalN)'e duyarlı farelerde LPS uyarısı ile monosit makrofaj hücre grubundan sitokin salınımının gerçekleştiği, karaciğerde nekrotik alanların oluştuğu gösterilmiştir (4). Tümör nekroz faktör α (TNF α) karaciğer hücrelerinde in vivo ve in vitro apoptosise neden olmaktadır (4). Mizuhara ve arkadaşlarının (5) oluşturdukları deneysel modelde ise, con-A enjeksiyonu ile çeşitli saat aralıklarında karaciğer, dalak, böbrek, akciğer ve kalp gibi organları sakrifiye etmişlerdir. Bu organların hemotoksilen-eosin boyası ile ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda yalnızca karaciğerde çeşitli etkilerin olduğunu gözlemlemişlerdir. İnjektasyondan 8 saat sonra hepatositlerde hafif dejeneratif değişiklikler olmasına rağmen, nekroz ve hücre infiltrasyon görülmemiştir. Oysaki, 24 saat sonra mononükleer ve polimorfonükleer hücrelerin portal alanlara ve santral venler çevresine göçünü gözlemişlerdir. İmmünohistokimyasal boyanmalar sonucu bu göç eden hücrelerin CD4 T ve CD8 T hücreleri olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda, con-A enjeksiyonu

sonucunda karaciğer dokusu histopatolojisinde benzer bulguları gözledik.

Con-A'nın artan dozu ile (>1,5 mg/kg) transminazlar 8 saat içinde salınma başladığı ve karaciğer hasarlanmasının elektron mikroskopik incelenmesi sonucunda, hepatositlerde vakuol ve endotelial hücrelerde lökosit birikimi gözlemişlerdir (6). Con-A ile oluşturulan hepatit modelinde serumda IL-2 salınımını 2 saat sonra ölçmeye başlanabilmesine rağmen 4 saat sonra maksimum düzeye ulaşır. Bizde çalışmamızda IL-2 reseptörü olan CD25 reseptör artışını kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde (p <0.003) artmış olduğunu saptadık.

LPS enjeksiyonu yapılan deney grubunda da anlamlı artış olması (p<0.0001) bu reseptörün makrofajlar ve monosit yüzeyinde de bulunmasından kaynaklanmaktadır (6).

Ayrıca LPS ile indüklenen monosit-makrofaj hücre grubundan TNF- α salınımı gerçekleşeceğinden karaciğerde nekrotik alanların oluşmasını tetiklemektedir. TNF- α karaciğer hücrelerinde in vivo ve in vitro olarak apoptosise de neden olmaktadır (4,11). T hücre mitojenik bitki lektini olan con-A'nın enjeksiyonu da TNF- α gibi hepatik apoptosise de neden olmaktadır (2,1,7). Con-A ile oluşturulan modelde, T hücre aktivasyonu sonucu salgılanan interferon γ (IFN- γ)'nin otoimmünite, viral hepatitler ve karaciğer allograft rejeksiyonu gibi rolleri olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (2,7). LPS ve con-A ile uyarılma sonucu oluşturmaya çalıştığımız deneysel model karaciğer patolojisinde rol oynayan immünojik, metabolik ve inflamatuvar araştırmalar için uygun bir model olduğunu ve ayrıntılı çalışmalara zemin oluşturacağını göstermiştir.

Kaynaklar

1. Ulevitch RJ ve Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu Rev Immunol. 1995; 13: 437.
2. Kusters S, Gantner F, Küntle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. Gastroenterology 1996; 111: 462.
3. Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA ve

arkadaşları. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176: 261.

4. Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Matteo FMD, Sidoni A, Migliorati G. ve Morelli A. Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 1996; 111: 736.

5. Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusuroki C, Otsuka K. ve arkadaşları. T cell activation associated hepatic injury:mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 1994; 179: 1529.

6. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A.A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90: 196.

7. Seino K-I, Kayagaki N, Takeda K, Fukao K, Okumura K, Yagita H. Contribution of fas ligand to T cell-mediated hepatic injury in mice. *Gastroenterology* (1997) 113: 1315.

8. Vicari AP, Zlotnik A. Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. *Immunol Today* 1996; 17(2):71.

9. Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW ve Gajewski TF. Differential regulation of murine T lymphocytes subsets. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 29.

10. Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, Moss B, Pinkert CA, Palmiter RD, Brister RL, Kanagawa O, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990; 248: 361.

11. Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang S-n, Chisari FV. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A Transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993; 178: 1541.

12. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin -6- deficient mice. *Science* 1996; 274: 1379.