

УДК 616.411-089.87:612.017.1]-092.9:599.323.41

**О. В. Кузнєцова**

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

**РОЛЬ ЦИТОКІНОВОЇ ІМУНОРЕГУЛЯЦІЇ:  
IL-1<sub>B</sub> ПРИ СПЛЕНОЕКТОМІЇ В БІЛИХ  
ЩУРІВ****Ключові слова:** селезінка, білки, ліпіди, цитокіни, протеоліз.**Резюме.** Вивчено вплив білкової і ліпідної фракцій гомогенату аутоселезінки на вміст у плазмі крові цитокінів та інтенсивність необмеженого протеолізу в спленектомованих білих щурів. Встановлено, що спленектомія викликає значне підвищення концентрацій у плазмі крові інтерлейкіну-1 $\beta$  і фактора некрозу пухлин  $\alpha$ . Білкова і ліпідна фракції гомогенату аутоселезінки зменшують вміст у плазмі інтерлейкіну-1 $\beta$ , але не впливають на концентрацію в плазмі крові фактора некрозу пухлин  $\alpha$ . Збільшення інтенсивності лізису азоальбуміну позитивно корелює з вмістом у плазмі крові інтерлейкіну-1 $\beta$ . Зміна активності протеолітичних систем під впливом обох фракцій гомогенату селезінки мають однакову спрямованість зі змінами плазмової концентрації інтерлейкіну-1 $\beta$ .**Вступ**

Інтерлейкін-1 (ІЛ-1) синтезується фібробластами, епітеліальними та дендритними клітинами, кератиноцитами, Т- і В-лімфонитами, але основними клітинами-продуцентами та головним джерелом інтерлейкіну-1 в організмі є моноцити і тканинні макрофаги [3]. Відомі більш 50 біологічних ефектів ІЛ-1, серед яких - стимуляція клітин сполучної тканини до синтезу колагенази, а також нейтральних протеаз і металопротеїназ [10].

Фактор некрозу пухлин (ФНП) також продукується різними видами клітин: макрофагами, Т- і В-лімфоцитами та НК-клітинами, нейтрофілами, тучними клітинами, клітинами Купфера, фібробластами, астроцитами, остеобластами [7, 12]. Він посилює фагоцитоз і антитілозалежну цитотоксичність нейтрофілів, стимулює респіраторний "вибух" поліморфноядерних лейкоцитів, провокує звільнення лізосомальних ферментів, є хематрактантом для нейтрофілів, підвищує їх адгезію до ендотелію, стимулює прокоагулянтну активність ендотеліальних клітин і макрофагальну генерацію інтерлейкіну-1, який, у свою чергу сенсibiliзує організм до дії ФНП [1, 7].

ІЛ-1 неспецифічно зв'язуються  $\alpha_2$ -макроглобуліном, С3-компонентом компліменту, уромодуліном. Рецепторний антагоніст ІЛ-1 інгібує його ефекти на лімфоцити і фібробласти шляхом блокування клітинних рецепторів [6]. Дані щодо специфічних природних інгібіторів ФНП обмежені - в сечі людини виявлений білок, що зв'язує ФНП та інгібує його активність [13].

Відомо, що в селезінці продукуються тетрапептиди туфтеїн і опсонін - фактори, що сти-

мулюють макрофагальну реакцію, а маргінальна зона містить макрофаги, лімфоцити і моноцити - клітини, які здатні до генерації цитокінів. Еліпсоїдні макрофагально-лімфоїдні муфти розглядаються як один з ланцюгів імунного апарату селезінки, що здійснює контроль складу крові та інкретує фізіологічно активні медіатори, які безпосередньо впливають на функцію лімфоцитів [11].

Отже, значення селезінки в активації імунної відповіді організму на антигенну агресію сумнівів не викликає, проте відомості щодо ролі селезінки в негативній регуляції процесів генерації цитокінів у літературі відсутні.

**Мета дослідження**

Установити вплив білкової та ліпідної фракцій гомогенату аутоселезінки на вміст у плазмі крові цитокінів та інтенсивність необмеженого протеолізу в спленектомованих щурів.

**Матеріали і методи**

Дослідження проведені на 32 самцях білих щурів з масою тіла 0,15-0,17 кг. За асептичних умов під нембуталовим наркозом (40 мг/кг маси тіла) проводили серединну лапаротомію, перев'язували судинну ніжку селезінки шовком і виконували спленектомію. Білкову та ліпідну фракції 10% гомогенату селезінки отримували на мікроколонках Amprep™ (Велика Британія) з відповідною елюацією етанолом та діетиловим ефіром. Елюати відновлювали у 2,0 мл фосфатного буферу (рН 7.4). На 14-ту добу після спленектомії тваринам внутрішньоочередово вводили білкову (6 щурів) або ліпідну (6 щурів) фракції гомогенату

аутоселезінки в об'ємі 5,0 мл/кг маси тіла. Контрольну групу склали 11 інтактних тварин, групу внутрішнього контролю - 9 спленектомованих щурів, яким внутрішньоочередово вводили еквівалентний об'єм фосфатного буфера. Евтоназію тварин проводили через 2 год під нембуталовим наркозом. Для стабілізації крові застосовували 3,8% розчин цитрата натрію (1:9).

Дослідження вмісту цитокінів у плазмі крові проводили на імуноферментному аналізаторі "Униплан-М" (Росія) за допомогою наборів реагентів "ProCon IL-1 $\beta$ " (ООО "Протеиновый контур") для визначення інтерлейкіну- $\beta$  (Росія) та "ProCon TNF $\alpha$ " (ООО "Протеиновый контур") для визначення фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (Росія).

Протеолітичну активність плазми крові визначали за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколу ("Simko Ltd.", Україна). Принцип методу полягає в тому, що при інкубації білкових азос-

полук у присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться в плазмі крові, відбувається лізис азоальбуміну (деградація низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (протеоліз високомолекулярних білків) та азоколу (колагеноліз), інтенсивність якого оцінюється за ступенем забарвлення інкубаційного розчину в лужному середовищі [2].

Статистична обробка отриманих даних проведена на РС IBM 586 за допомогою "Excel-7" ("Microsoft", США). У таблицях значення "p" наведені лише для достовірних ( $p=0,05$  або менше) різниць показників, що вивчалися.

### Обговорення результатів дослідження

Дані щодо змін вмісту цитокінів у плазмі крові наведені в таблиці 1. У спленектомованих щурів концентрація в плазмі крові інтерлейкіну-1 $\beta$  підвищувалася на 156,1%, фактору некрозу пухлин  $\alpha$

Таблиця 1

Вплив компонентів гомогенату селезінки на вміст цитокінів в плазмі крові спленектомованих щурів ( $x \pm Sx$ )

Серія досліджень	Інтерлейкін-1 $\beta$ пг/мл	Фактор некрозу пухлин $\alpha$ пг/мл
Контроль, n = 11	37,45 $\pm$ 2,87	17,91 $\pm$ 1,82
1 група Спленектомія, n = 9	95,89 $\pm$ 12,91 p<0,001	60,11 $\pm$ 3,92 p<0,001
2 група Спленектомія + протеїнова фракція гомогенату селезінки, n=6	29,50 $\pm$ 2,96 p <sub>1-2</sub> <0,01	64,50 $\pm$ 4,45 p<0,001
3 група Спленектомія + ліпідна фракція гомогенату селезінки, n = 6	23,89 $\pm$ 3,42 p<0,05 p <sub>1-3</sub> <0,001	58,50 $\pm$ 5,35 p<0,001

Примітка. p - ступінь достовірності різниць показників відносно контролю

p<sub>n-n'</sub> - ступінь достовірності різниць показників у відповідних групах тварин

n - число спостережень

- на 235,6%. Білкова фракція гомогенату селезінки зменшувала рівень інтерлейкіну-1 $\beta$  в 3,3 рази і не впливала на концентрацію в плазмі крові фактору некрозу пухлин  $\alpha$ . Уміст останнього в крові не змінювався й після введення щурам ліпідної фракції гомогенату селезінки, тоді як плазмова концентрація інтерлейкіну-1 $\beta$  зменшувалася більш, ніж у 4 рази і сягала величин, нижчих за контрольний рівень.

Збільшення вмісту цитокінів у крові спленектомованих щурів супроводжувалося зростанням інтенсивності плазмового протеолізу (табл. 2): лізис низькомолекулярних протеїнів підвищувався на 69,3%, деградація високомолекулярних білків -

на 106,7%, інтенсивність колагенолізу - на 70,0%. Зазначимо, що лізис азоальбуміну позитивно корелював із концентрацією в плазмі крові інтерлейкіну-1 $\beta$  ( $r=0,498$ ;  $p<0,05$ ;  $n=9$ ), але не фактору некрозу пухлин  $\alpha$  ( $r=0,032$ ;  $p>0,05$ ;  $n=9$ ).

Введення щурам білкової фракції гомогенату селезінки зменшувало лізис низькомолекулярних білків плазми крові у 8,8 рази, тоді як лізис азоказеїну знижувався лише на 43,3%, колагеназна активність крові достовірно від контрольних даних не відрізнялася в обох групах піддослідних тварин. Ліпідна фракція гомогенату селезінки в 14,2 рази зменшувала інтенсивність деградації низькомолекулярних білків у спленектомованих

Таблиця 2

Вплив компонентів гомогенату селезінки на протеолітичну активність плазми крові спленектомованих тварин ( $\bar{x} \pm Sx$ )

Серія досліджень	Лізіс азоальбуміну E <sub>440</sub> /г тканини за год	Лізіс азоказеїну E <sub>440</sub> /г тканини за год	Лізіс азоколу E <sub>440</sub> /г тканини за год
Контроль, n=11	3,13±0,28	2,08±0,06	0,20±0,03
1 група Спленектомія, n=9	5,30±0,35 p<0,001	4,30±0,2 p<0,001	0,34±0,04 p<0,05
2 група Спленектомія + протеїнова фракція гомогенату селезінки, n=6	0,355±0,01 p<0,001 p <sub>1-2</sub> <0,001	1,24±0,15 p<0,01 p <sub>1-2</sub> <0,001	0,20±0,05 p <sub>1-2</sub> <0,01
3 група С спленектомія + ліпідна фракція гомогенату селезінки, n=6	0,22±0,014 p<0,001 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,01	0,37±0,05 p<0,001 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001	0,25±0,1

Примітка. p - ступінь достовірності різниць показників відносно контролю  
p<sub>n-n'</sub> - ступінь достовірності різниць показників у відповідних групах тварин  
n - число спостережень

щурів і в 17,4 - в інтактних щурів, в 6,78 раза знижувала протеолітичний розпад високомолекулярних білків у спленектомованих щурів і майже в 4 рази в інтактних, і не впливала на лізіс азоколу.

Інтенсивність тканинного протеолізу в печінці у спленектомованих щурів збільшувалася за всіма параметрами: лізіс азоальбуміну зростав на 35,9%, азоказеїну - на 55,5%, азоколу - на 76,1%. Білкова фракція гомогенату селезінки знижувала деградацію низькомолекулярних протеїнів майже в 3 рази, високомолекулярних білків у 5 разів, колагену - в 3,4 рази. У меншому ступені тканинний протеоліз змінювався під впливом ліпідної фракції гомогенату селезінки: інтенсивність лізису азоальбуміну знижувалася в 2,1 рази, лізису азоказеїну майже не змінювався, колагеназна активність крові - в 1,44 рази.

У літературі є дані про здатність безбілкового екстракту селезінки стабілізувати клітинні мембрани за рахунок впливу на третинну структуру білкових молекул клітинної поверхні [5], що може бути й наслідком його протицитокінової. Показано, що супресорний фактор селезінки мишей, який пригнічує Т-залежну імунну відповідь, має імуноглобулінову природу [11, 12], а тканина інтактної селезінки є джерелом ряду речовин, що володіють імуносупресорною активністю, яка проявляється *in vivo* та *in vitro*, зокрема, пригнічує включення ЗН-тимідину у ФГА-трансформовані спленоцити [11]. Усі ефекти, що наведені вище можуть бути наслідком пригнічення біологічних ефектів ІЛ-1β.

## Висновок

Як білкова, так і ліпідна фракції гомогенату селезінки знижують вміст у крові спленектомованих щурів інтерлейкіну-1β, що корелює із значним зниженням інтенсивності протеолітичної деградації низькомолекулярних білків у плазмі крові.

## Перспективи подальших досліджень

Будуть продовжені дослідження у вибраному науковому напрямку.

**Література.** 1. Баранов А.В. Цитокиновый профиль провоспалительных ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8 и противовоспалительного ІЛ-4 у больных хроническим вирусным гепатитом С // Успехи современного естествознания. - 2007. - № 12 - С. 130-131. 2. Веремеенко Н.К. Биохимические основы системной энзимотерапии // Труды симпозиума "Системная энзимотерапия. Биохимические основы. Применение в кардиологии". - Киев, 1998. - С. 10-29. 3. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. - К.: Наукова думка, 1998. - 313 с. 4. Галкина О.В. Иммуноглобулиновые профили биологических гиджкостей организма в норме и патологии: Автореф. дисс. канд. биол. н., 2002. - 21 с. 5. Дорошенко Н.М., Корпачев В.В. Сравнительная характеристика специфичности действия биологически активных факторов селезенки / Н.М. Дорошенко, В.В. Корпачев // Эндокринология. - 1989. - Вып. 19. - С. 113-114. 6. Мошин О.П. Интерлейкин-1 при острых кишечных инфекциях у детей / О. П. Мошин, С.О. Крамаров, О.В., Корбут [та ін.] // Інф. хвороби. - 2004, №1. - С. 77-78. 7. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - Т.3, № 2. - С. 16-22. 8. Спивак Н.Я. Интерферон и система мононуклеарных фагоцитов / Н.Я. Спивак, Л.Н. Лазаренко, О.Н. Михайленко. - К.: Фитосоциентр, 2002. - 163 с. 9. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции / И.С. Фрейдлин // Иммунология. 2001. - №5. - С. 4-7. 10. Щокіна К. Г. Органотропні ефекти рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (експериментальне дослідження): автореф. дис. ... д-ра фармац. наук: 14.03.05 / К. Г. Щокіна; Нац. фармац. ун-т. - Х., 2011. - 38 с. 11. Шапкин Ю.Г. Селезенка и иммунный статус

организма / Ю.Г.Шапкин, В.В. Масляков // Вестник хирургии.- 2009, №2.- 110-113. 12.Якобияк М. Имунологія / пер. З польської за ред. В.В. Чоп'як.- Вінниця: Нова книга, 2004.-672 с. 13.Ovsyannikova I.G. Cytokine production patterns and antibody response to measles vaccine / I.G. Ovsyannikova, K.C. Reid, R.M. Jacobson // Vaccine.-2003.- №21.-P.3949-3953.

#### РОЛЬ ЦИТОКИНОВОЙ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ: IL-1В ПРИ СПЛЕНЭКТОМИИ В БЕЛЫХ КРЫС

*А.В. Кузнецова*

**Резюме.** Изучено влияние белковой и липидной фракций гомогената ауто селезенки на содержание в плазме крови цитокинов и интенсивность неограниченного протеолиза у спленэктомированных белых крыс. Установлено, что спленэктомия вызывает значительное повышение концентраций в плазме крови интерлейкина-1 $\beta$  и фактора некроза опухолей  $\alpha$ . Белковая и липидная фракции гомогената ауто селезенки уменьшают содержание в плазме интерлейкина-1 $\beta$ , но не влияют на концентрацию в плазме крови фактора некроза опухолей  $\alpha$ . Увеличение интенсивности лизиса азоальбумина позитивно коррелирует с содержанием в плазме крови интерлейкина-1 $\beta$ . Изменение активности протеолитических систем под влиянием обеих фракций гомогената селезенки имеют одинаковую направленность с изменениями плазменной концентрации интерлейкина 1 $\beta$ .

**Ключевые слова:** селезенка, белков, липидов, цитокины, протеолиз.

#### THE ROLE OF IMMUNE CYTOKINE: IL-1B OF SPLENECTOMY IN WHITE RATS

*A. V. Kuznetsova*

**Abstract.** We have studied the effect of the protein and lipid fractions of the autosplenic homogenate on the blood plasma cytokine content and intensity of unlimited proteolysis in splenectomized rats. It has been established that splenectomy results in a considerable elevation of the blood plasma interleukin-1 $\beta$  concentrations and the tumor necrosis factor  $\alpha$ . The protein and lipid fractions of the autosplenic homogenate reduce the plasma content of interleukin-1 $\beta$ , but do not influence on the blood plasma concentration of the tumor necrosis factor. An increase of the intensity of azoalbumine lysis positively correlates with the blood plasma interleukin-1 $\beta$  content. Changes of the activity of the proteolytic systems have a similar character with the changes of the plasma concentration of interleukin-1 $\beta$  under the influence of both fractions of the splenic homogenate.

**Key words:** spleen, proteins, lipids, cytokines, proteolysis.

**Higher State Education Establishment of Ukraine  
"Bukovinian State Medical University" (Chernivtsi)**

*Clin. and experim. pathol.- 2015.- Vol.14, №4 (54).-P.78-81.*

*Надійшла до редакції 01.12.2015  
Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький  
© О.В. Кузнецова, 2015*