

УДК 617.715-001:576.8.097.29

В.П. Пішак

Л.В. Івасюк

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

ЗМІНИ ВМІСТУ ЦИТОКІНІВ У СКЛОПОДІБНОМУ ТІЛІ З ПРОНИКНИМ ПОРАНЕННЯМ СКЛЕРИ: ВПЛИВ ЕНДОТОКСИНІВ ГРАМНЕГАТИВНОЇ І ГРАМПОЗИТИВНОЇ МІКРОФЛОРИ

Ключові слова: око, травма,
ендотоксини, цитокіни.

Резюме. Досліджено вплив ендотоксинів грамнегативної і грампозитивної мікрофлори на вміст у склоподібному тілі кроликів інтерлейкіну-1 β , фактора некрозу пухлин α , трансформувального фактора росту β 1 і γ -інтерферону при проникній травмі склери. Під впливом ендотоксину грамнегативної мікрофлори в склоподібному тілі різко зростає вміст прозапальних IL-1 β та TNF- α , що за відсутності змін γ -INF супроводжується майже триразовим збільшенням кількості TGF- β 1. Інтравітреальне введення ендотоксину грампозитивної мікрофлори при проникній травмі склери призводить до помірного підвищення вмісту у склоподібному тілі IL-1 β і TNF- α та суттєво збільшує рівень γ -INF на тлі сталого вмісту TGF- β 1.

Вступ

Відомо, що після введення ендотоксину розвивається клітинна інфільтрація тканин ока кролика [15], яка супроводжується значним збільшенням інтраокулярного вмісту простагландину E2. За результатами дослідження Naveh N. et al. [14], у кроликів після введення в око ендотоксину розвивається увеїт, що супроводжується підвищенням вмісту інтерлейкіну-1, інтраокулярного простагландину E2 і лейкотриєну B4 [10]. Проліферативна дія простагландину E2 доведена на культурі Мюлерових клітин людини, де він стимулює продукцію ендотеліального фактора росту і фактора росту фібробластів [11]. Це підтверджується даними Kahler C.M. et al. [13] про те, що інстиляції в око простагландину E2 при проліферативній вітродетинації викликають інтраокулярний фіброз, що може призвести до утворення мембран у склоподібному тілі і розвитку тракційного відшарування сітківки [12].

Водночас вищенаведені результати досліджень стосуються ліпополісахариду грамнегативної мікрофлори, тоді як ефекти ендотоксину грампозитивної мікрофлори, зокрема його вплив на вміст цитокінів у травмованому оці, практично не вивчені.

Мета дослідження

Обґрунтувати вплив ендотоксинів грамнегативної і грампозитивної мікрофлори на вміст у склоподібному тілі інтерлейкіну-1 β , фактора некрозу пухлин α , трансформувального фактору росту β 1 і γ -інтерферону при проникній травмі склери в кроликів.

Матеріал і методи

Дослідження виконані на 31 кролику породи Шиншила з масою тіла від 2,5 до 3,0 кг. Моделювання травми ока проводили під місцевою анестезією (ретробульбарне введення 1,5 мл 2% розчину новокаїну з дворазовою інстиляцією в кон'юнктивальну порожнину 0,25% розчину дікаїну). Проникну травму склери виконували за асептичних умов сколеним лезом бритви, що фіксувалось лезотримачем. Формували лінійний розріз довжиною 4 мм. У скловидне тіло вводили 10 нг ендотоксину *Salmonella typhimurium* або 10 нг ендотоксину грампозитивної мікрофлори - глюкозоамінілмураміді-пептиду. Проводили елементарну хірургічну обробку рани (ушивання рогівки) за асептичних умов. Через 24 години виконували енуклеацію травмованого ока. Перед початком операції виконували ретробульбарну анестезію 2% розчином новокаїну (2 мл) та інстилювали в кон'юнктивальну порожнину 0,25% розчин дікаїну. Видалені очні яблука негайно заморожували в рідкому азоті. Дослідження вмісту цитокінів проводили в склоподібному тілі.

Цитокіни екстрагували на мікроколонках C₂ AmprepTM (Велика Британія). Аналіз вмісту цитокінів проводили на імуноферментному аналізаторі "Униплан-М" (Росія) наборами реагентів "ProCon IL-1" (ООО "Протеиновый контур") для визначення інтерлейкіну-1 (Росія), "ProCon TNF" (ООО "Протеиновый контур") для визначення фактора некрозу пухлин (Росія). Рівень у плазмі крові трансформувального фактору росту β 1 визначали методом імуноферментного аналізу реактивами фірми "R&D Systems. QuantikineTM -

TGF β , " (США), γ -інтерферону - " γ -INF, Diacclone Research" (Франція).

Результати досліджень опрацьовували методами статистичного аналізу за програмою "BioStat".

Обговорення результатів дослідження

Результати дослідження наведені у таблиці. При проникній травмі склери вміст інтерлейкіну-1 β (IL-1 β), фактора некрозу пухлин α (TNF- α), γ -інтерферону (γ -INF) і трансформувального фактора росту β 1 (TGF- β 1) вірогідних змін не зазнавав. За умов інтравітреального введення ендотоксину грамнегативної мікрофлори проникна травма склери характеризувалася різким підвищенням рівня у склоподібному тілі IL-1 β і вмісту TNF- α , які перевищували контрольні показники відповідно у 9,5 і 7,1 раза та були більшими за такі при не ускладненій проникній травмі склери відповідно у 7,0 і 5,9 раза. Водночас кількість γ -INF у склоподібному тілі травмованого ока не змінювалася, тоді як вміст TGF- β 1 суттєво зростав, перевищуючи контроль і показники у тварин з не ускладненою травмою ока відповідно у 2,7 і 2,8 раза.

При проникній травмі склери з введенням ендотоксину грампозитивної мікрофлори у склоподібне тіло вміст в останньому IL-1 β збільшувався відносно контролю на 79,8%, не відрізнявся від такого у тварин з не ускладненою травмою ока і був у 5,3 раза меншим, ніж у кроликів, яким за умов поранення склери в склоподібне тіло вводили ендотоксин грамнегативної мікрофлори.

Рівень TNF- α під впливом ендотоксину грампозитивної мікрофлори підвищувався на 45,1%, не відрізнявся від показників у тварин з не ускладненою травмою склери і був майже у 5 разів нижчим за такий у кроликів, яким у склоподібне тіло вводили ендотоксин грамнегативної мікрофлори.

Після інтравітреального введення ендотоксину грампозитивної мікрофлори у склоподібному тілі травмованого ока значно збільшувалася кількість γ -INF: його рівень перевищував контроль у 3,7 раза та був відповідно у 3,4 і 3,9 раза більшим, ніж у тварин з не ускладненою травмою склери й у кроликів, яким вводили ендотоксин грамнегативної мікрофлори.

TGF- β 1, навпаки, відносно контролю не змінювався, не відрізнявся від показників у кроликів з не ускладненою травмою склери і був на 57,1% меншим, ніж у тварин, що отримували інтравітреальну ін'єкцію ендотоксину грамнегативної мікрофлори (рис.).

Таким чином, зміни вмісту цитокінів у склоподібному тілі травмованого ока суттєво відрізняються: під впливом ендотоксину грамнегативної мікрофлори різко зростає вміст прозапальних IL-1 β та TNF- α , що за відсутності змін з боку γ -INF супроводжується майже триразовим збільшенням імуносупресивного TGF- β 1, тоді як інтравітреальне введення ендотоксину грампозитивної мікрофлори призводить лише до помірного підвищення вмісту в склоподібному тілі IL-1 β та TNF- α проте значно збільшує рівень γ -INF на тлі сталого вмісту TGF- β 1.

Таблиця

Вплив ендотоксинів грамнегативної (ГН) і грампозитивної (ГП) мікрофлори (МФ) на вміст цитокінів у склоподібному тілі при проникній травмі склери ($\bar{x} \pm Sx$)

Показники	Контроль, n=10	Травма склери, n=7 <i>1 група</i>	Травма склери + ендотоксин ГНМФ, n=7 <i>2 група</i>	Травма склери + ендотоксин ГПМФ, n=7 <i>3 група</i>
Інтерлейкін-1 β , пг/1 г тканини	41,26 \pm 5,84	55,71 \pm 8,30 p>0,1	392,16 \pm 41,53 p<0,001 p ₁ <0,001	74,20 \pm 7,96 p<0,01 p ₁ >0,1 p ₂ <0,001
Фактор некрозу пухлин α , пг/1 г тканини	39,24 \pm 4,90	47,60 \pm 6,38 p>0,3	280,55 \pm 30,84 p<0,001 p ₁ <0,001	56,94 \pm 6,25 p<0,05 p ₁ >0,3 p ₂ <0,001
γ -інтерферон, пг/1 г тканини	112,93 \pm 7,62	123,85 \pm 10,71 p>0,4	106,38 \pm 11,98 p>0,6 p ₁ >0,2	419,08 \pm 30,72 p<0,001 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001
Трансформувальний фактор росту β 1, нг/1 г тканини	204,50 \pm 12,09	196,17 \pm 11,43 p>0,6	549,82 \pm 53,21 p<0,001 p ₁ <0,001	236,11 \pm 25,61 p>0,2 p ₁ >0,1 p ₂ <0,001

Примітка. p - ступінь вірогідності різниць показників відносно контролю;

p₁-2, 1-3, 2-3 - ступінь вірогідності різниць показників у відповідних групах тварин;

n - число спостережень

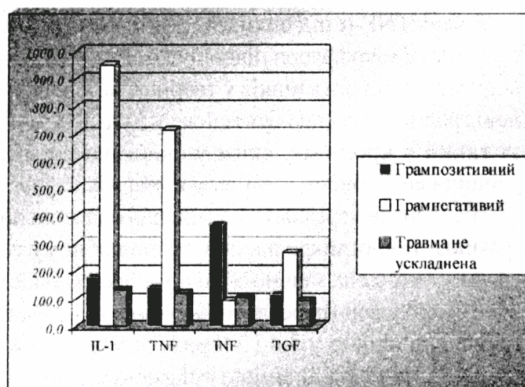


Рис. Вплив ендотоксинів грамнегативної і грампозитивної мікрофлори на вміст цитокінів у склоподібному тілі при проникній травмі склери (у % від контролю)

Відомо, що IL-1 β володіє різноманітними біологічними ефектами, що спрямовані не тільки на еферентні клітини імунної системи, але й на клітини практично всіх органів і тканин. Хоча синтез IL-1 β відбувається у фібробластах, епітеліальних і дендритних клітинах, кератиноцитах, T- і B-лімфоцитах, головним джерелом IL-1 β в організмі людини є моноцити і макрофаги. У зоні після травматичного запалення IL-1 β індукує низку місцевих захисних реакцій, спрямованих на активацію T- і B-лімфоцитів, макрофагів, натуральних кілерів і лейкоцитів, стимуляцію функцій сполучної тканини та ендотелія. У свою чергу, TNF- α підсилює міграцію у вогнище запалення, фагоцитоз і антитілозалежну цитотоксичність поліморфноядерних лейкоцитів, стимулює респіраторний "вибух" і генерацію супероксидних радикалів, призводить до вивільнення лізосомальних ферментів. Крім того, у вогнищі запалення TNF- α підвищує адгезивні властивості ендотелія для поліморфноядерних лейкоцитів, стимулює прокоагулянтну активність ендотеліальних клітин та пригнічує їх проліферацію [3, 7].

Таким чином, підвищення вмісту в склоподібному тілі прозапальних цитокінів є наслідком запальної реакції і спрямоване на знешкодження інфекційного компоненту захворювання. Проте рівень у травмованому оці IL-1 β і TNF- α зростає паралельно з підвищенням вмісту в склоподібному тілі TGF- β 1. Одним з біологічних ефектів IL-1 β є активуючий вплив на метаболізм сполучної тканини: IL-1 β стимулює проліферацію фібробластів і збільшує продукцію ними простагландинів та факторів росту. За дії IL-1 β клітини сполучної тканини підсилюють як синтез колагену, так і активність матричних колагеназ. Лізис і видалення ушкоджених ділянок сполучної тканини з метою відновлення на їх місці попередньої нор-

мальної структури є найважливішим елементом механізму загоєння ран. У координації цих двох процесів роль IL-1 β полягає у стимуляції загальної перебудови сполучної тканини, що необхідно для регенерації тканин і відновлення їх цілісності. Водночас фундаментальним ефектом TGF- β 1 є, окрім супресії клітинної проліферації та імуносупресивної дії, депозиція позаклітинного матриксу через промоцію синтезу та інгібіцію його деградації [4,8,9].

Оскільки підвищення вмісту в склоподібному тілі TGF- β 1 поєднується зі збільшенням IL-1 β і TNF- α , можна припустити, що це створює потужний потенціал фіброзогенезу, який спричиняє утворення після травматичних інтравітреальних шварт. Крім того, прозапальні цитокіни, які сприяють міграції лейкоцитів у зону запалення, здатні провокувати ішемічні і деструктивні ушкодження при проникній травмі склери.

Під впливом ендотоксину грамнегативної мікрофлори у травмованому оці значно підвищується рівень γ -INF, який утворюється головним чином T-лімфоцитами та природними кілерними клітинами у відповідь на вірусні інфекції, пухлини, а також антигенну стимуляцію, підсилюючи активність NK-клітин та експресію молекул головного комплексу гістосумісності [1,2,4-6]. Не виключено, що при грампозитивно інфікованій травмі ока саме підвищення рівня γ -INF може провокувати в подальшому розвиток симпатичної офтальмії.

Висновки

1. У кроликів з проникною травмою склери під впливом ендотоксину грамнегативної мікрофлори у склоподібному тілі різко зростає вміст прозапальних IL-1 β та TNF- α , що за відсутності змін γ -INF супроводжується майже триразовим збільшенням кількості TGF- β 1.

2. Інтравітреальне введення ендотоксину грампозитивної мікрофлори при проникній травмі склери призводить до помірного підвищення вмісту в склоподібному тілі IL-1 β і TNF- β та значно збільшує рівень γ -INF на тлі сталого вмісту TGF- β 1.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження необхідні для вивчення можливих засобів корекції виявлених порушень.

Література. 1. Бабініна Л.Я., Бенца Т.М. Порушення функціонування системи інтерферону при ревматоїдному артриті // Лікарська справа. - 1999. - № 3. - С.17-20. 2. Василенко А.М., Захарова Л.А. Цитокіни в сочетанній регуляції болю і імунітета // Успехи соврем. биол. - 2000. - Т. 120, №2. - С.174-189. 3. Ветра Я.Я., Іванова Л.В., Крейле И.Э. Цитокіни // Гематол. и трансфузиол. - 2000. - Т. 45, №4. - С.45-49. 4. Возианов А.Ф., Бутенко А.К.,

Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые средства. - К.: Наукова думка, 1998. - 313с. 5. Караулов А.В. Клиническая иммунология. - М.: Медицинское информационное агенство, 1999. - 604 с. 6. Коган А.Х. Фагоцитоз-зависимые кислородносвободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней // Вестн. РАМН. - 1999. - № 2. - С.3-15. 7. Кузнецова С.А., Косицкая Л.С., Фрейдлин И.С., Тихомиров И.И. Влияние иммунных комплексов, выделенных из плазмы больных ревматоидным артритом, на секрецию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками крови доноров // Иммунология. - 2000. - № 4. - С.48-53. 8. Фрейдлин И.С., Назаров П.Г. Регуляторные функции провоспалительных цитокинов и острофазных белков // Вестн. РАМН. - 1999. - № 5. - С.28-32. 9. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии // Иммунология. - 1998. - № 5. - С.9-12. 10. Bellot J.L., Palmero M., Alcoriza N. Concomitant treatment with a 5-lipoxygenase inhibitor improves the antiinflammatory effect of the inhibition of nitric oxide synthase during the early phase of endotoxin-induced uveitis in the rabbit // Ophthalmic Res. - 1997. - V.29, №4. - P. 227-236. 11. Cheng T., Cao W., Wen R. et al. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 1998. - V.39, №3. - P.581-591. 12. Inoue M., Shirabe H., Yamamoto M. Blood-aqueous barrier disruption in experimental anterior segment ischemia in rabbit eyes // Ophthalmic Res. - 1999. - V.31, №3. - P.213-219. 13. Kahler C.M., Herold M., Kaufmann G. Induction of arachidonic acid metabolite release by human fibroblasts in proliferative vitreoretinopathy // Eur. J. Pharmacol. - 1998. - V.341, №1. - P.111-117. 14. Naveh N., Nussbaum A., Desatnik H., Bartov E. Angiogenic activity of vitreous extract obtained from rabbit eyes with endotoxin-induced uveitis // Ophthalmic Res. - 1999. - V.27, №1. - P.23-31. 15. Tsuji F., Sawa K., Ikuse T., Shirasawa E. The effects of betamethasone derivatives on endotoxin-induced uveitis in guinea pigs // Inflamm. Res. - 1997. - V.46, №12. - P.486-490.

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ С ПРОНИКАЮЩИМ РАНЕНИЕМ СКЛЕРЫ: ВЛИЯНИЕ ЭНДОТОКСИНОВ ГРАМНЕГАТИВНОЙ И ГРАМПЗИТИВНОЙ МИКРОФЛОРЫ

В.П.Пишак, Л.В.Ивасюк

Резюме. Исследовано влияние эндотоксинов грамотрицательной и грампозитивной микрофлоры на содержание в

стекловидном теле кроликов интерлейкина-1 β , фактора некроза опухолей α , трансформирующего фактора роста β 1 и γ -интерферона при проникающей травме склеры. Под воздействием эндотоксина грамотрицательной микрофлоры в стекловидном теле резко возрастает содержание провоспалительных IL-1 β и TNF- α , что при отсутствии изменений γ -INF сопровождается почти трехкратным увеличением количества TGF- β 1. Интравитреальное введение эндотоксина грампозитивной микрофлоры при проникающей травме склеры приводит к умеренному повышению содержания в стекловидном теле IL-1 β и TNF- α и существенно увеличивает уровень γ -INF на фоне стабильного содержания TGF- β 1.

Ключевые слова: глаз, травма, эндотоксины, цитокины.

CHANGES OF THE CYTOKINE CONTENT IN THE VITREOUS BODY WITH A PENETRATING INJURY OF THE SCLERA: THE EFFECT OF ENDOTOXINS OF GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE MICROFLORA

V.P.Pishak, L.V.Ivasiuk,

Abstract. The influence of the endotoxins of gram-negative and gram-positive microflora on the content of interleukine-1 β , tumor necrosis factor α , transforming growth factor β 1 and γ -interferon in case of a penetrating injury of the sclera of rabbits has been investigated. Under the influence of the endotoxin of gram-negative microflora in the vitreous body the content of proinflammatory IL-1 β and TNF- α sharply increases and that is accompanied with an almost three fold increase of the amount of TGF- β 1 in the absence of changes on the part of γ -INF. An intravitreal injection of the endotoxine of gram-positive microflora in case of a penetrating injury of the sclera results in a moderate elevation of the IL-1 β and TNF- α content in the vitreous body and considerably increases the level of γ -INF against a background of a permanent content of TGF- β 1.

Key words: eye, injury, endotoxines, cytokines.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2007. - Vol.6, №1. -P.80-83.

Надійшла до редакції 23.01.2007

Рецензент - доц. Н.М. Голубовська