

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ВМІСТУ ЦИТОКІНІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ СТАРИХ ЩУРІВ У ВІДПОВІДЬ НА ПОРАНЕННЯ ТОВСТОЇ КИШКИ

Кафедра госпітальної хірургії (зав.-проф.А.Г.Іфтодій)
Буковинського державного медичного університету

Резюме. З'ясовано динаміку змін вмісту в плазмі крові інтерлейкіну-1 β (IL-1 β), фактору некрозу пухлин α (TNF- α) і трансформувального фактору росту β_1 (TGF- β_1) у старих щурів з пораненням товстої кишки. Встановлено, що в статевозрілих щурів у відповідь на травмування товстої кишки відбувається прогресивне зростання вмісту в плазмі крові прозапальних цитокінів - IL-1 β і TNF- α , що супроводжується

паралельним підвищенням плазматичного рівня TGF- β_1 . У старих тварин із пораненням товстої кишки концентрації в крові IL-1 β і TNF- α також зростають, проте в значно меншій мірі. Якісною відмінністю є динаміка змін плазматичного рівня TGF- β_1 , який у старих щурів після незначного підвищення зазнає зниження до висхідного рівня.

Ключові слова: травма, кишка, цитокіни.

Вступ. Відомо, що цитокіни відіграють ключову роль у механізмах розвитку адаптаційних і патофізіологічних реакцій системи нейтрофілів, особливо на ранніх етапах імунної відповіді, яка супроводжується лейкоцитозом, збільшенням числа клітин мієлоїдного ростка в селезінці та складними змінами нейтрофілів у тимусі [13]. Водночас механізми вікових особливостей змін неспецифічної резистентності вивчені не в повному обсязі, особливо на початкових етапах розвитку патологічного процесу в черевній порожнині, який зумовлений пораненням товстої кишки.

Мета дослідження. З'ясувати динаміку змін вмісту в плазмі крові інтерлейкіну-1 β (IL-1 β), фактору некрозу пухлин α (TNF- α) і трансформувального фактору росту β_1 (TGF- β_1) у старих щурів з пораненням товстої кишки.

Матеріал і методи. У роботі використано 75 статевозрілих і 75 старих самців білих щурів з масою тіла 0,14-0,16 кг (статевозрілі тварини віком 4-6 міс.) та 0,49-0,55 кг (старі тварини віком 20-22 міс.).

Усі операційні втручання проводилися відповідно до основних вимог Ванкуверських конференцій (1979, 1994) про біомедичні експерименти щодо гуманного відношення до лабораторних тварин, в асептичних умовах, під уретановим наркозом (1000 мг на 1 кг маси тіла). Після середньої лапаротомії вздовж білої лінії живота стандартизоване поранення товстої кишки в

статевозрілих і старих щурів виконували очними ножицями, розсікаючи попереки кишкову стінку. Довжина розрізу складала 2 мм. У всіх випадках після поранення товстої кишки на розріз черевної порожнини накладали 5 швів, що запобігало тепловим втратам. Дослідження змін плазматичного вмісту цитокінів виконувалося серійно (по 15 тварин у серії) через 30, 60, 120 і 180 хв після поранення товстої кишки.

Аналіз вмісту цитокінів у плазмі крові проводили на імуноферментному аналізаторі "Униплан-М" (Росія) наборами реагентів "Rat IL-1 β " ("Biosource International") для визначення інтерлейкіну-1 β (США), "Rat TNF α " ("Diaclone Research") для визначення фактору некрозу пухлин α (США). Рівень у плазмі крові трансформувального фактору росту β_1 визначали методом імуноферментного аналізу реактивами "TGF- β_1 ELISA" фірми "DRG Diagnostics" (Німеччина). Екстракцію цитокінів виконували на мікроколонках C₂ AmprepTM (Велика Британія).

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом варіаційного аналізу на РС IBM 586 з визначенням критерію Стьюдента за допомогою програми "BioStat" [3].

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження наведені в таблиці.

Таблиця

Динаміка змін вмісту цитокінів у плазмі крові шурів із пораненням товстої кишки ($M \pm m$)

Періоди спостереження	Статевозрілі шури n=15			Старі шури n=15		
	IL-1 β , пг/мл	TNF- α , пг/мл	TGF- β_1 , пг/мл	IL-1 β , пг/мл	TNF- α , пг/мл	TGF- β_1 , пг/мл
Контроль (вихідні показники)	36,94 \pm 4,07	17,83 \pm 1,71	51,32 \pm 6,55	34,39 \pm 3,97 $p_1 > 0,6$	17,04 \pm 1,82 $p_1 > 0,7$	52,22 \pm 5,09 $p_1 > 0,9$
Через 30 хв після поранення	59,17 \pm 6,05 $p < 0,01$	31,88 \pm 3,79 $p < 0,01$	68,52 \pm 4,95 $p < 0,05$	51,07 \pm 5,02 $p < 0,02$ $p_1 > 0,3$	25,75 \pm 2,86 $p < 0,02$ $p_1 > 0,2$	62,52 \pm 5,27 $p > 0,1$ $p_1 > 0,4$
Через 60 хв після поранення	86,15 \pm 6,47 $p < 0,001$	66,43 \pm 5,13 $p < 0,001$	79,72 \pm 6,71 $p < 0,01$	53,71 \pm 5,05 $p < 0,01$ $p_1 < 0,001$	33,18 \pm 3,81 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	77,19 \pm 5,65 $p < 0,01$ $p_1 > 0,7$
Через 120 хв після поранення	105,60 \pm 6,01 $p < 0,001$	88,98 \pm 6,77 $p < 0,001$	103,40 \pm 8,75 $p < 0,001$	70,00 \pm 6,39 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	38,71 \pm 3,95 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	70,80 \pm 5,58 $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$
Через 180 хв після поранення	157,10 \pm 13,96 $p < 0,001$	130,80 \pm 12,33 $p < 0,001$	136,50 \pm 11,06 $p < 0,001$	84,05 \pm 6,02 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	38,37 \pm 4,43 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	62,71 \pm 5,16 $p > 0,1$ $p_1 < 0,001$

p – ступінь вірогідності різниці показників відносно висхідного рівня;

p_1 – ступінь вірогідності різниці показників у статевозрілих і старих шурів у відповідні періоди спостереження;

n – число спостережень.

Реакція на травмування товстої кишки в статевозрілих шурів характеризувалася прогресивним збільшенням вмісту в плазмі крові IL-1 β , рівень якого перевищував вихідні показники через 30 хв на 60,2%, через 60 хв – у 2,3 раза, через 120 хв – у 2,9 раза, через 180 хв – у 4,3 раза. У старих тварин плазмова концентрація IL-1 β також зростала – у відповідні строки дослідження концентрація даного цитокіну була більшою за контроль на 48,5, 56,2, 103,2 і 144,4%. Порівняльний аналіз показав, що в старих шурів рівень у крові IL-1 β впродовж всього експерименту був меншим за такий у статевозрілих тварин: на 30-ту хв – на 13,6%, на 60-ту хв – на 37,7%, на 120-ту хв – на 33,7%, на 180-ту хв. – на 46,5%.

Концентрація у плазмі крові TNF- α у статевозрілих шурів з травмою товстої кишки зростала в більшій мірі, ніж рівень IL-1 β : її приріст на 30-ту хв дослідження становив 78,8%, на 60-ту хв – 372,6%, на 120-ту хв – 499,0%, на 180-ту хв – 733,6%. У старих тварин плазмовий вміст TNF- α через 30 хв після поранення товстої кишки перевищував висхідний рівень в 1,5 раза, через 60 хв – в 1,9 раза, через 120 і 180 хв – у 2,3 раза. Тобто, на 120-ту хв експерименту збільшення вмісту в крові TNF- α припинялось. Якщо через 30 хв концентрація в плазмі крові TNF- α у статевозрілих і старих шурів вірогідно не відрізнялася, то на 60-ту хв спостереження рівень TNF- α у старих тварин був вдвічі, на 120-ту хв – у 2,3 раза, на 180-ту хв – у 3,4 раза меншим, ніж у статевозрілих шурів. В останніх спостерігалось поступове підвищення вмісту в плазмі крові TGF- β_1 : на 33,5% - через 30 хв, на 55,3% - через 60 хв, на 101,5% - через 120 хв і на 166,0% - через 180 хв після поранення товстої кишки. Водночас у старих тварин плазмова концентрація TGF- β_1 на 30-ту хв дослідження вірогідних змін не зазнавала, збільшувалася на 60-ту і 120-ту хв відповідно на 47,8 і 35,6%, однак надалі знову знижувалася і не

відрізнялася від висхідного рівня. Вірогідні міжгрупові зміни вмісту в плазмі крові TGF- β_1 виявлялися на 120-ту і 180-ту хв експерименту, коли рівень зазначеного цитокіну був на 31,5% й у 2,2 раза меншим у старих тварин.

Одним з перших встановлених ефектів IL-1 була стимуляція проліферації тимоцитів у відповідь на антигени: IL-1 діє на молекулярні структури клітин тимуса, викликаючи в них секрецію IL-2, що і зумовлює проліферацію тимічних лімфоцитів. Надалі були встановлені такі імунобіологічні ефекти IL-1, як індукція Т-клітин-кілерів у клітинно-опосередкованій цитологічній відповіді, підвищення активності клітин-кілерів і НК-клітин, збільшення числа й афінності антигензв'язувальних рецепторів на Т-клітинах, стимуляція проліферації В-лімфоцитів та генерація плазматичних клітин, індукція рецепторів для імуноглобулінів, комплементу, стимуляція гемопоетичних стовбурових клітин, активація нейтрофілів і фібробластів, збільшення секреції IL-2. Є повідомлення, що IL-1 стимулює утворення в тимусі Т-хелперів, які сприяють проліферації В-лімфоцитів та збільшенню продукції антитіл завдяки інтерлейкінзалежному зменшенню чутливості CD4-лімфоцитів до інгібуючого впливу стероїдів. IL-1 є необхідним на ранній стадії В-клітинної активації (перетворення незрілих попередників у В-лімфоцити) для підготовки кооперації В-клітин з Т-лімфоцитами, оскільки IL-1 та Т-клітинний ростовий фактор є коstimуляторами В-лімфоцитарної активності [2]. Отже, інтерлейкін-1 стимулює неспецифічні захисні реакції та активує імунокомпетентні клітини [6].

ФНП- α продукується моноцитами-макрофагами та клітинами-кілерами. Цитотоксичний ефект ФНП- α реалізується при міжклітинних контактах [7]. Вивільнення ФНП- α макрофагами та лімфоцитами в зоні запалення призводить до збільшення адгезії

нейтрофілів до ендотелію і підвищення функціональної активності адгезованих нейтрофілів [15,16]. Крім того, ФНП α активує антитілозалежну клітинну цитотоксичність нейтрофілів [12,14]. Крім того, ФНП- α підсилює продукцію ІЛ-1, ІЛ-6 та експресію молекул І класу головного комплексу гістосумісності, сприяє проліферації Т- і В-лімфоцитів, активації НК-клітин і макрофагів [1,4,5].

Таким чином, встановлене нами раннє підвищення вмісту обох зазначених цитокінів при пораненні товстої кишки забезпечує синергічну дію ІЛ-1 і ФНП- α на травму та інфікування черевної порожнини. Однак у старих щурів вміст зазначених прозапальних цитокінів є суттєво меншим, ніж у статевозрілих тварин, що може бути однією з причин вікового послаблення імунної відповіді і зниження активності факторів неспецифічної резистентності організму, що старіє.

Трансформувальний фактор росту, який отримав свою назву внаслідок стимуляції процесу трансформації фібробластів, що культивуються в тумороподібний фенотип, складається з двох протеїнів – ТФР- α і ТФР- β [8,9]. ТФР- β синтезується багатьма типами клітин, а його рецептори експресовані практично на всіх клітинах. Відомі три фундаментальні ефекти ТФР β : ТФР β моделює проліферацію імунокомпетентних клітин, головним чином, як супресор, підвищує депозицію позаклітинного матриксу через промоцію синтезу та пригнічення його деградації, а також володіє імуносупресивною дією, яка реалізується через різноманітні механізми [10,11].

Отже, ТФР- β сприяє процесам утворення сполучної тканини, особливо в ділянці ушкодження тканин. За результатами нашого дослідження, у старих щурів, на відміну від статевозрілих тварин, в яких збільшення вмісту в крові ТФР- β відбувається паралельно підвищенню рівня прозапальних цитокінів, концентрація ТФР- β у плазмі крові після нетривалого підвищення знижується до висхідного рівня. Ми вважаємо, що такі зміни створюють умови для розвитку неспроможності кишкових швів, особливо на тлі інфікування черевної порожнини.

Висновки

1. У статевозрілих щурів у відповідь на травмування товстої кишки відбувається прогресивне зростання вмісту в плазмі крові прозапальних цитокінів - ІЛ-1 β і TNF- α , що супроводжується паралельним підвищенням плазматичного рівня TGF- β ₁.
2. Концентрації у плазмі крові ІЛ-1 β і TNF- α у старих тварин з пораненням товстої кишки зростають у значно меншій мірі.
3. Якісною відмінністю є динаміка змін плазматичного рівня TGF- β ₁, який у старих щурів після незначного підвищення зазнає зниження до висхідного рівня.

Література

1. Бережная Н.М. Интерлейкины и формирование иммунологического ответа при злокачественном росте // Аллергология и иммунология. – 2000. – Т.1, № 1. – С.45-61.

2. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – К.: Наукова думка, 1998. – 313 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. Гушин И.С. Аллергия: аллергены, индукция и регуляция синтеза Ig // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1999. – № 1. – С.24-32.
5. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Одесса: Астро Принт, 1999. – С. 98-102.
6. Симбирцев А.С., Котов А.Ю., Пигарева Н.В. и др. Взаимосвязь интерлейкина-1 и глюкокортикоидных гормонов в регуляции иммунного ответа // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1993. – Т.115, № 2. – С.183-185.
7. Akerlund K., Harris H.E., Tracey K.J., Wang H. et al. Anti-inflammatory effects of a new tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitor (CNI-1493) in collagen-induced arthritis (CIA) in rats // Clin. Exp. Immunol. – 1999. – Vol.115, № 1. – P.32-41.
8. Brandes M.E., Allen J.B., Ogawa Y., Wahl S.M. Transforming growth factor- β 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals // J. Clin. Invest. – 1991. – Vol. 87. – P.1108-1113.
9. Bray P., Agrotis A., Bobik A. Transforming growth factor- β and receptor tyrosine kinase-activating growth factors negatively regulate collagen genes in smooth muscle of hypertensive rats // Hypertension. – 1998. – Vol.31, № 4. – P.986-994.
10. Cooper W.O., Fava R.A., Gates C.A., Cremer M.A. et al. Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intraarticular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta // Clin. Exp. Immunol. – 1992. – Vol. 89. – P.244-250.
11. Demoor-Fossard M., Boittin M., Redini F., Pujol J.P. Differential effects of interleukin-1 and transforming growth factor beta on the synthesis of small proteoglycans by rabbit articular chondrocytes cultured in alginate beads as compared to monolayers // Mol. Cell. Biochem. – 1999. – Vol. 199, № 1-2. – P.69-80.
12. Desser L., Rehberger A., Kokron E., Paukovits W. Cytokine synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by proteolytic enzymes // Oncology. – 1993. – Vol. 50. – P.403-407.
13. Dinarello C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 antagonist // Int. Rev. Immunol. – 1998. – Vol. 16, № 5-6. – P.457-499.
14. Dinarello C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery // FASEB J. – 1994. – Vol. 8. – P.1314 - 1325.
15. Porteu F., Brockhaus M., Wallach D. et al. Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266, №28. – P.18846-18853.
16. Theze J. Cytokine receptors: a combinative family of molecules // Eur. Cytokine New. – 1994. – Vol. 5, № 4. – P.353-368.

THE PECULIARITIES OF CONTENT CHANGES OF CYTOKINES IN THE BLOOD PLASMA OF OLD ALBINO RATS ONTO THE WOUNDED COLON

V.P. Poliovyi

Abstract. It was proved in the blood plasma of old rats the dynamic of content changes of IL-1 β , TNF- α , and TGF- β ₁ onto the wounded colon. The mature rats reacted onto the wounded colon by the increase in the blood plasma of a content of antiinflammatory IL-1 β , TNF- α , and TGF- β ₁. The old rat's reaction was less manifested, but TGF- β ₁ after nonsignificant increase dropped to the initial level.

Key words: wound, colon, cytokines.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)