

УДК 612.017.1:616.34-008.87

Л. В. Івасюк  
В. П. Пішак

Буковинський державний медичний  
університет, м.Чернівці

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЛИВУ ЕНДОТОКСИНІВ ГРАМНЕГАТИВНОЇ ТА ГРАМПозИТИВНОЇ МІКРОФЛОРИ НА ВМІСТ ЦИТОКІНІВ У СКЛИСТОМУ ТІЛІ ОКА КРОЛИКІВ ІЗ ПРОНИКНИМ ПОРАНЕННЯМ СКЛЕРИ

**Ключові слова:** ока, травма,  
ендотоксини, цитокіни.

**Резюме.** У кроликів за внутрішньочного уведення ендотоксину грам-негативної мікрофлори у склистому тілі різко зростає вміст прозапальних IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$ , що за відсутності змін з боку  $\gamma$ -INF супроводжується майже триразовим збільшенням кількості TGF- $\beta$ 1. Водночас інтравітреальне уведення ендотоксину грам-позитивної мікро-флори призводить до помірного підвищення вмісту в склистому тілі IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  та значно збільшує рівень  $\gamma$ -INF на тлі сталого вмісту TGF- $\beta$ 1.

### Вступ

Дослідження біології ендотоксинів і патофізіології ендотоксинемії ознаменувалися відкриттям ролі цитокінів у реалізації ефектів ліпополісахаридів. Встановлено, що ендотоксин у здорових волонтерів збільшує вміст у крові інтерлейкіну (IL)-1 $\beta$ , фактора некрозу пухлин (TNF)  $\alpha$  та IL-6 [4]. Відмічено, що активація протеолізу при сепсисі опосередкована IL-6 [6]. Ліпід А впливає на сироватковий рівень розчинних рецепторів IL-2 [5], діє на ЦНС через індукцію синтезу IL-1 $\beta$ , підвищує концентрацію в плазмі крові IL-1 $\beta$ , ФНП $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 та IL-12 за септичних станів [3], дозозалежно стимулює синтез та секрецію IL-2 та IL-4 клітинами селезінки, брижових лімфовузлів і пєєрових бляшок [1]. Відомо, що під впливом ендотоксинів розвивається клітинна інфільтрація тканин ока, що призводить до увєїту на тлі підвищення інтраокулярного вмісту інтерлейкіну-1 $\beta$ , простагландину E<sub>2</sub> та лейкотрієну V<sub>4</sub>. Простагландин E<sub>2</sub> стимулює продукцію ендотеліального фактора росту і фактора росту фібробластів, що викликає інтраокулярний фіброз та може призвести до утворення шварт у склоподібному тілі з тракційним відшаруванням сітківки [2].

Водночас наведені вище результати досліджень стосуються внутрішньоочних ефектів ліпополісахариду грамнегативної мікрофлори, тоді як вплив ендотоксинів грампозитивної мікрофлори, зокрема на локальний вміст цитокінів у травмованому оці практично не вивчений.

### Мета дослідження

З'ясувати особливості генерації про- і проти-запальних цитокінів у тканинах ока при локальному інтраокулярному уведенні ендотоксинів грамнегативної і грампозитивної мікрофлори.

### Матеріал і методи

У роботі використаний 31 кролик породи Шиншила з масою тіла від 2,5 до 3,0 кг. Моделювання травми ока проводили під місцевою анестезією (ретробульбарне уведення 1,5 мл 2% розчину новокаїну з дворазовою інстиляцією в кон'юнктивальну порожнину 0,25% розчину дикаїну). Проникну травму склери виконували за асептичних умов сколеним лезом бритви фіксоване лезотримачем. Формували лінійний розріз довжиною 4 мм. У склисте тіло вводили 10 нг ендотоксину *Salmonella typhimurium* або 10 нг ендотоксину грампозитивної мікрофлори-глюкозоамінілмураміддипептиду. 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 дикаїну. Енуклеювані очі негайно заморожували в рідкому азоті.

Визначення вмісту цитокінів проводили в склистому тілі. Екстракцію цитокінів проводили на мікроколонках C<sub>2</sub> Amprep™ (Велика Британія) з реєстрацією показників світлопоглинання на рідері "Уніплан-М" (Росія) за допомогою наборів

реагентів “ProCon IL-1 $\beta$ ” для визначення інтерлейкіну-1 $\beta$  (Росія) та “ProCon TNF $\alpha$ ” (ООО “Протеиновый контур”, Росія) для визначення фактора некрозу пухлин  $\alpha$ , а також “Human IFN $\gamma$  ELISA kit” (DiaClone, Франція) для визначення інтерферону-  $\gamma$ . Рівень в плазмі крові трансформувального фактора росту  $\beta_1$  визначали методом імуоферментного аналізу реактивами фірми “R&D Systems. Quantikine<sup>TM</sup> - TGF $\beta_1$ ” (США).

Результати досліджень опрацьовували методами варіаційного статистичного аналізу з визначенням критерію Стюдента за програмою “Biostat” на PC PENTIUM II.

Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

### Обговорення результатів дослідження

При проникній травмі склери вміст інтерлейкіну-1 $\beta$  (у контролі - 41,3 $\pm$ 5,8, при травмі - 55,7 $\pm$ 8,3 пг/1 г тканини;  $p>0,1$ ;  $n=17$ ), фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (відповідно 39,2 $\pm$ 4,9 та 47,6 $\pm$ 6,4 пг/1 г тканини;  $p>0,3$ ;  $n=17$ ),  $\gamma$ -інтерферону (відповідно 112,9 $\pm$ 7,6 та 123,9 $\pm$ 10,7 пг/1 г тканини;  $p>0,4$ ;  $n=17$ ) і трансформувального фактора росту  $\beta_1$  (відповідно 204,5 $\pm$ 12,1 та 196,2 $\pm$ 6,4 нг/1 г тканини;  $p>0,6$ ;  $n=17$ ) достовірних змін не зазнавав.

За умов інтравітреального введення ендотоксину грамнегативної мікрофлори проникна травма склери характеризувалася різким підвищенням рівня у склистому тілі IL-1 $\beta$  (392,2 $\pm$ 41,5 пг/1 г тканини;  $p<0,001$ ;  $n=17$ ) і вмісту TNF- $\alpha$  (280,6 $\pm$ 30,8 пг/1 г тканини;  $p<0,001$ ;  $n=17$ ), які перевищували контрольні показники відповідно у 9 і 7 разів та були більшими ніж при неускладненій проникній травмі склери відповідно у 7 і 6 разів. Водночас кількість  $\gamma$ -INF у склистому тілі травмованого ока не змінювалася (106,4 $\pm$ 12,0 пг/1 г тканини;  $p>0,2$ ;  $n=17$ ), тоді як вміст TGF- $\beta_1$  суттєво зростає й переважає контроль (n=17) і показники у тварин з не ускладненою травмою ока (n=14) відповідно у 2,7 і 2,8 раза (549,8 $\pm$ 53,2 пг/1 г тканини;  $p<0,001$ ).

При проникній травмі склери з введенням ендотоксину грамполозитивної мікрофлори в склисте тіло вміст в останньому IL-1 $\beta$  збільшувався відносно контролю на 80% (74,2 $\pm$ 8,0 пг/1 г тканини;  $p<0,01$ ;  $n=17$ ), не відрізнявся від такого у тварин з не ускладненою травмою ока ( $p>0,1$ ;  $n=14$ ) і був у 5 разів меншим, ніж у кроликів, яким за умов поранення склери в склисте тіло вводили ендотоксин грамнегативної мікрофлори ( $p<0,001$ ;  $n=14$ ).

Рівень TNF- $\alpha$  під впливом ендотоксину грамполозитивної мікрофлори підвищувався на 45%

(56,9 $\pm$ 6,3 пг/1 г тканини;  $p<0,05$ ;  $n=17$ ), не відрізнявся від показників у тварин з не ускладненою травмою склери ( $p>0,3$ ;  $n=14$ ) і був майже в 5 разів нижчим за такий у кроликів, яким у склисте тіло вводили ендотоксин грамнегативної мікрофлори ( $p<0,001$ ;  $n=14$ ).

Після інтравітреального введення ендотоксину грамполозитивної мікрофлори в склисте тіло травмованого ока значно збільшувалася кількість  $\gamma$ -INF (419,1 $\pm$ 30,8 пг/1 г тканини): його рівень перевищував контроль у 3,7 раза ( $p<0,001$ ;  $n=17$ ) та був відповідно в 3,4 і 3,9 раза більшим, ніж у тварин з неускладненою травмою склери ( $p<0,001$ ;  $n=14$ ) й у кроликів, яким вводили ендотоксин грамнегативної мікрофлори ( $p<0,001$ ;  $n=14$ ).

TGF- $\beta_1$ , навпаки, відносно контролю не змінювався (236,1 $\pm$ 25,6 пг/1 г тканини;  $p>0,2$ ;  $n=17$ ), не відрізнявся від показників у кроликів з не ускладненою травмою склери ( $p>0,1$ ;  $n=14$ ) і був на 57,1% меншим, ніж у тварин, що отримували інтравітреальну ін’єкцію ендотоксину грамнегативної мікрофлори ( $p<0,001$ ;  $n=14$ ).

Таким чином, зміни вмісту цитокінів у склистому тілі травмованого ока суттєво відрізняються (рис.): під впливом ендотоксину грамнегативної мікрофлори різко зростає вміст прозапальних IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$ , що за відсутністю змін  $\gamma$ -INF супроводжується майже триразовим збільшенням імуносупресивного TGF- $\beta_1$ , тоді як інтравітреальне введення ендотоксину грамполозитивної мікрофлори призводить лише до помірного підвищення вмісту в склистому тілі IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  проте значно збільшує рівень  $\gamma$ -INF на тлі стало го вмісту TGF- $\beta_1$ .

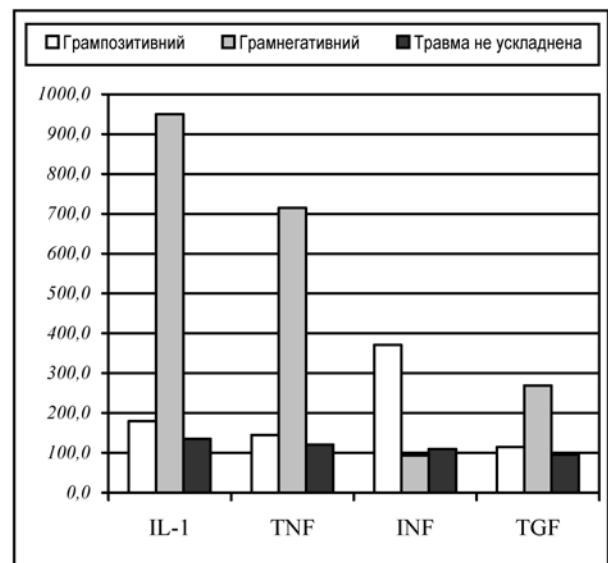


Рис. Вплив ендотоксинів грамнегативної і грамполозитивної мікрофлори на вміст цитокінів у склистому тілі при проникній травмі склери (у % від контролю).

Отримані дані узгоджуються з даними літератури про результати системного уведення ендотоксину грамнегативної мікрофлори, коли спостерігається підвищення тканинної експресії мРНК TNF- $\alpha$ , збільшення накопичення TNF- $\alpha$  у печінці й селезінці та його рівня у сироватці крові. Концентрація IL-1 $\beta$  залишається низькою у плазмі крові людей з множинними тяжкими травмами, тоді як вивільнення TNF- $\alpha$  мононуклеарами крові, стимульованими ліпополісахаридом, значно збільшується [1].

Отже, в разі інтравітреального уведення ендотоксину грамнегативної мікрофлори формується потужний прозапальний цитокіновий потенціал, тоді як за локальної дії ендотоксину грампозитивної мікрофлори в склистому тілі переважає генерація інтерферону- $\gamma$ .

### Висновки

1. У кроликів за внутрішньочного уведення ендотоксину грамнегативної мікрофлори у склистому тілі різко зростає вміст прозапальних IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$ , що за відсутності змін  $\gamma$ -INF супроводжується майже триразовим збільшенням кількості TGF- $\beta$ 1.

2. Інтравітреальне уведення ендотоксину грампозитивної мікрофлори призводить до помірного підвищення вмісту в склистому тілі IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  та значно збільшує рівень  $\gamma$ -INF на тлі стаłego вмісту TGF- $\beta$ 1.

### Перспективи подальших досліджень

Перспективним вважаємо вивчення та розробку патогенетично обґрунтованих способів корекції інтраокулярного запалення різного генезу за наявності проникного поранення склери.

**Література.** 1. Васильева Г.И. Цитокины – общая система гомеостатической регуляции клеточных функций / Г.И. Васильева., А.И. Иванова, С.Ю. Тюкавкина // Цитология - 2001. - Т.43, №12 С 101. 2. Пенішкевич Я.І. Зміни фібринолізу у кроликів з проникаючою травмою рогівки, ускладненою гіфеомою: вплив простогландинів та інгібіторів їх синтезу/ Я.І.Пенішкевич //Офтальмол. ж. – 2002.-№3.- С.44-48. 3. Boelen A. Induced illness in interleukin-6 (IL-6) knock-out mice: A causal role of IL-6 in the development of the low 3,5,3'-triiodothyronine syndrome/ A. Boelen, M.A.Maas, C.W. Lowik // Endocrinology. - 2004. - V.137, № 12. - P.5250-

5254. 4. De Rijk R., Exercise and circadian rhythm-induced variations in plasma cortisol differentially regulate interleukin-1b (IL-1b), IL-6, and tumor necrosis factor-a (TNFa) production in humans: High sensitivity of TNFa and resistance of IL-6./ R. De Rijk, D. Michelson, B. Karp // J. Clin. Endocrinol. and Metab. - 2005. - V.82, № 7. - P.2182-2191. 5. Quantitative assessment of the soluble Interleukin-2 receptor in haemodialysed and kidney transplant patients/ [J. Hokl, J. Cemy, P. Nemecek [et al]. // Scr. Med. - 2004. - V.69, № 3-4. - P.125-128. 6. Sepsis in mice stimulates muscle proteolysis in the absence of IL-6/ [A. Williams, J.J. Wang, L.S. Wang [et al.] // Amer. J. Physiol. - 2003. - V.275, № 6, Pt. 2. - P.1983-1991.

### ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ ЭНДОТОКСИНОВ ГРАММОТРИЦАТЕЛЬНОЙ И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА КРОЛИКОВ С ПРОНИКАЮЩИМ РАНЕНИЕМ СКЛЕРЫ

Л. В. Ивасюк, В. П. Пишак

**Резюме.** У кроликов при внутриглазном введении эндотоксина грамотрицательной микрофлоры в стекловидном теле резко возрастает содержание провоспалительных IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , что на фоне отсутствия изменений со стороны  $\gamma$ -INF сопровождается почти трехкратным увеличением количества TGF- $\beta$ 1. В то же время, интравитреальное введение эндотоксина грамположительной микрофлоры приводит к умеренному повышению содержания в стекловидном теле IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , а также значительному увеличению уровня  $\gamma$ -INF на фоне стабильного содержания TGF- $\beta$ 1.

**Ключевые слова:** глаз, травма, эндотоксины, цитокины.

### A CHARACTERISTIC OF THE EFFECT OF ENDOTOXINS OF GRAMNEGATIVE AND GRAMPOSITIVE MICROFLORA ON THE CONTENT OF CYTOKINES IN THE VITREOUS BODY OF THE EYE OF RABBITS WITH A PENETRATING WOUND OF THE SCLERA

L.V. Ivasiuk, V. P. Pishak

**Abstract.** The content of anti-inflammatory IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  sharply elevates in the rabbit vitreous body after an intraocular introduction of the endotoxin of gramnegative microflora that is amount of TGF- $\beta$ 1 against a background of the absence of changes on the part of  $\gamma$ -INF. At the same time, an intravitreal administration of the endotoxins of gramnegative microflora results in a moderate elevation of the content in the vitreous body of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and increases considerably the level of  $\gamma$ -INF with an underlying permanent content of TGF- $\beta$ 1

**Key words:** eye, injury, endotoxin, cytokines

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2010. - Vol.9, №1 (31). - P.24-26.

Надійшла до редакції 25.02.2010

Рецензент – проф. Ю. С. Розговий

© Л. В. Ивасюк, В. П. Пишак, 2010