

УДК616.36-008.5+616-008.8-074+612.017.1



М. Я. Насиров, Г. Ш. Гараев, С. А. Алекберова
Азербайджанский медицинский университет, Баку

ВЗАИМОСВЯЗЬ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ ИЛ-6 И ФНО- α В КРОВИ С БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ

Цель работы — изучить особенности изменений содержания цитокинов интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли α (ФНО- α) во взаимосвязи с динамикой биохимических показателей крови на модели экспериментальной механической желтухи у крыс.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на 30 белых крысах линии Вистар. Модель механической желтухи создавали перевязкой внепанкреатического участка общего желчного протока под наркозом (опытная группа, $n = 25$). Группа из 5 животных была контрольной. Изучали биохимические параметры крови (общий билирубин, общий белок, щелочная фосфатаза, аспаратаминотрансфераза, γ -глутамилтранспептидаза), а также уровень ИЛ-6 и ФНО- α .

Результаты и обсуждение. При создании механической желтухи у экспериментальных животных увеличивалась концентрация изучаемых цитокинов, что указывает на то, что воспалительный процесс, развивающийся при данной патологии, сопряжен с цитокиноопосредуемыми иммунологическими процессами. Динамика изменений уровня цитокинов свидетельствует о зависимости дисбаланса этих показателей от длительности механической желтухи.

Выводы. Динамика изменений изучаемых показателей свидетельствовала как об их взаимозависимости, так и о зависимости их содержания от длительности заболевания. Взаимосвязь между значениями биохимических показателей и уровнем активности цитокинов позволяет использовать значения последних в качестве критериев для оценки интенсивности гибели гепатоцитов.

■

Ключевые слова: механическая желтуха, иммунная система, цитокины.

Сохраняющаяся тенденция возрастания частоты заболеваний гепатопанкреатобилиарной зоны, осложняющихся холестаазом, высокие показатели летальности больных с механической желтухой обуславливают необходимость тщательного изучения всех аспектов этой формы хирургической патологии.

Механическая желтуха (МЖ) — тяжелое патологическое состояние, обусловленное наличием препятствий оттоку желчи из желчевыводящих путей. Летальность при данной патологии достигает от 15 до 30 % из-за часто возникающих осложнений (клеточно-печеночной недостаточности, токсического шока и др.) [4].

Многие клиницисты уделяют большое внимание изучению иммунной компетентности организма в возникновении осложнений при МЖ. С учетом роли местного и общего воспаления в развитии

препятствия оттоку желчи функция клеток иммунной системы заключается в ликвидации данной проблемы. Воздействие патофизиологических факторов, влияющих на иммунную систему, приводит к развитию иммунной недостаточности, которая проявляется как цитокиновой дисрегуляцией, так и нарушением функционирования клеточной, гуморальной и фагоцитарной систем иммунитета.

В настоящее время накоплен обширный фактический материал относительно роли цитокинов с разными функциональными свойствами при хронических прогрессирующих заболеваниях печени [9, 11, 12, 14, 15]. Цитокины представляют собой регуляторные белки, продуцируемые клетками разного типа, которые регулируют процессы иммуногенеза и воспаления. В организме они тесно связаны между собой и образуют так называемую цитокиновую цепь, в пределах которой

Алекберова Севда Акбер кизи, ст. лаборант кафедры хірургічних хвороб III
Email: sevda78@mail.ru

© М. Я. Насиров, Г. Ш. Гараев, С. А. Алекберова, 2016

проявление биологического действия отдельных цитокинов существенно модифицируется [6—8]. Некоторые цитокины вовлекают в процесс воспаления разные типы иммунокомпетентных клеток, связанных с печеночным синусоидом, — синусоидальные, или непаренхиматозные (эндотелиальные), звездчатые и купферовские клетки. Эти клетки — важная составляющая системы мононуклеарных фагоцитов [3]. Известно, что цитокины участвуют в регуляции воспалительной реакции ткани печени, апоптоза и некроза ее клеток, развитии холестаза и фиброза [5]. Повреждение печеночной ткани с развитием фибротических и некротических изменений связано с воспалительными изменениями в ткани органа и уровнем продукции провоспалительных цитокинов [10]. При прогрессировании хронического процесса и формировании цирроза отмечается более высокий уровень ряда цитокинов, что позволяет использовать эти показатели для оценки степени тяжести и прогнозирования течения болезни [2, 13].

Многими клиницистами доказано, что фактор некроза опухоли α (ФНО- α) с одной стороны активизирует гепатоциты в процессе регенерации печени, с другой — стимулирует развитие печеночной недостаточности. Повышение концентрации цитокинов типа ФНО- α и интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и ИЛ-6 отмечено у больных с разными заболеваниями, что напрямую связано с неблагоприятным течением заболевания и прогнозом [16]. В литературе имеются единичные сообщения об исследовании продукции этих цитокинов в процессе хирургических вмешательств [2, 3], что может иметь принципиально важное значение для прогноза развития послеоперационных осложнений и возможности их коррекции.

Цель работы — изучить особенности изменений содержания цитокинов интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли α во взаимосвязи с динамикой биохимических показателей на модели экспериментальной механической желтухи у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводили натошак на 30 белых крысах линии Вистар обоих полов массой 180—220 г. Метки и индивидуальные номера животных регистрировали в протоколах лабораторных испытаний. Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха — (22 ± 2) °C, светлый/темный цикл 12/12 ч, неограниченное потребление корма и воды). Все исследования проведены согласно Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях от 18.03.1986 г.

Модель МЖ создавали перевязкой внепанкреатического участка общего желчного протока (опытная группа, $n = 25$). Крысам под общей анестезией проводили срединную лапаротомию, органы брюш-

ной полости сдвигали и выделяли общий желчный проток, который перевязывали двумя лигатурами 4-0, после этого органы брюшной полости аккуратно возвращали в прежнее положение и проводили послойное ушивание операционной раны.

Группа из 5 животных была контрольной.

Животных опытной группы распределили на пять подгрупп по 5 крыс в каждой в зависимости от срока забора крови для биохимических исследований (1, 3, 7, 10 и 15-е сутки после моделирования МЖ).

Биохимические параметры крови (общий билирубин, общий белок, щелочная фосфатаза (ЩФ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), γ -глутамилтранспептидаза (ГГТП)) изучали с помощью наборов реагентов по общепринятым методикам. Содержание ИЛ-6 и ФНО- α определяли иммуноферментным методом с помощью набора ЗАО «Вектор-Бест» в диапазоне концентраций: ИЛ — 5,6—300 пг/мл, ФНО- α — 0—250 пг/мл на аппарате Bioscreen-MS-2000.

Полученные цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики, с использованием критерия Ван-дер-Вардена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После перевязки общего желчного протока наблюдали многократное повышение уровня билирубина, АСТ, ЩФ, ГГТП и изучаемых цитокинов (таблица). Так, уже в первые сутки содержание билирубина в сыворотке крови возросло в 2 раза, по мере увеличения длительности холестаза оно повышалось и к 15-м суткам заболевания в 13,2 раза превысило норму ($p < 0,01$). Сходную картину наблюдали в отношении активности ЩФ и АСТ. Механизм повышения данных показателей связан с усилением синтеза фермента в гепатоцитах и поступлением их в сыворотку через плазматическую мембрану клеток. Интересно, что содержание обоих показателей увеличивались вплоть до 10-х суток, достигая значений, превышающих норму в 4,1 раза (АСТ) и 2,3 раза (ЩФ) ($p < 0,01$), а к 15-м суткам резко снижалось и превышало норму уже в 1,6 и 1,4 раза соответственно. Подобная динамика биохимических показателей объясняется глубокими нарушениями функций печени. Развившийся холестаз резко сказывается на белоксинтезирующей функции печени. Отмечено существенное нарушение синтеза белка, наиболее выраженное к 7-м суткам — продукция белка снизилась на 57 % по сравнению с нормой.

При анализе активности ИЛ-6 и ФНО- α в сыворотке крови экспериментальных животных зафиксировано значительное повышение их уровня по сравнению с контрольной группой. Концентрация этих цитокинов в крови возрастала по мере увеличения продолжительности моделированной МЖ и достигла максимального значения у ИЛ-6 к 7-м суткам (в 18,2 раза выше нормы), а у ФНО- α —

Т а б л и ц а

**Биохимические показатели сыворотки крови и содержание цитокинов
в модели экспериментальной механической желтухи у крыс**

Показатель	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	15-е сутки	Контрольная группа
Билирубин, мкм/л	12,8 ± 1,3 1,3–9,3*	45,1 ± 4,1 30,6–56,0*	57,5 ± 6,9 35,4–78,2*	65,7 ± 6,5 46,8–85,6*	82,0 ± 6,4 62,1–101,9*	6,2 ± 0,6 4,5–7,8
Общий белок, г/л	54,5 ± 2,6 46,1–60,2*	44,6 ± 3,4 34,2–55,3*	35,1 ± 3,2 24,8–45,1*	36,3 ± 3,1 26,4–45,9*	59,7 ± 3,4 49,3–69,9*	81,7 ± 3,9 69,2–90,3
АСТ, усл. ед.	508,8 ± 19,5 432,1–537,9*	644,7 ± 24,2 566,4–702,5*	695,0 ± 37,9 615,4–702,5*	739,6 ± 63,0 541,2–938,8*	287,7 ± 26,2 237,5–383,2*	179,3 ± 7,5 164,5–206,2
ЩФ, усл. ед.	768,6 ± 36,1 693,7–868,8*	937,6 ± 27,9 863,4–993,7*	1060,0 ± 71,7 911,2–1241*	1260,0 ± 92,4 981,0–1557,0*	760,8 ± 30,3 668,0–853,4*	542,6 ± 55,2 359,2–667,4
ГГТП, ед./л	21,4 ± 1,5 18,3–26,2*	33,8 ± 1,4 28,9–36,2*	37,5 ± 2,2 28,9–36,2*	47,5 ± 3,3 36,7–57,1*	54,1 ± 3,1 44,6–63,6*	2,5 ± 0,2 1,9–3,2
ФНО-α, пг/мл	17,5 ± 1,39 14,7–22,4*	21,3 ± 1,13 19,3–25,6*	18,88 ± 2,43 11,2–26,5*	10,3 ± 1,44 5,8–14,9*	6,8 ± 0,65 4,8–8,9**	4,66 ± 0,23 4,09–5,23
ИЛ-6, пг/мл	6,5 ± 0,4 5,15–7,51*	9,3 ± 0,4 8,1–10,3*	13,6 ± 3,4 3,4–24,5*	7,6 ± 1,3 4,8–12,7*	4,1 ± 0,6 2,2–6,1*	0,7 ± 0,1 0,5–1,2

Статистическая значимость различий с показателями контрольной группы: * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

уже к 3 суткам (в 4,6 раза выше нормы). Это можно объяснить тем, что при воспалительном процессе происходит активация выработки провоспалительных цитокинов. Как и в случае с ферментами, после достижения максимальной концентрации в дальнейшем происходит некоторое снижение их уровня. К 15-м суткам от начала эксперимента содержание ИЛ-6 превышало показатель контрольной группы в 5,4 раза ($p < 0,001$), а ФНО-α — на 45,9% ($p < 0,05$). Это объясняется истощением иммунной системы, выраженной потерей гепатоцитов вследствие некроза или апоптоза, что совпадает с мнением других исследователей.

Таким образом, установлено, что при моделировании МЖ в эксперименте у крыс на фоне постоянного нарастания уровня билирубина происходит изменение содержания ЩФ и АСТ, а также цитокинов, которое носит двухфазный характер — вначале повышение, а по мере увеличения длительности заболевания — снижение.

ВЫВОДЫ

При создании механической желтухи у экспериментальных животных увеличивалась концен-

трация исследуемых цитокинов, что указывает на то, что воспалительный процесс, развивающийся при данной патологии, сопряжен с цитокинопосредуемыми иммунологическими процессами. Об этом свидетельствуют данные об увеличении концентрации ФНО-α на 45,9%, а ИЛ-6 — в 5,4 раза по сравнению с нормой к 15-м суткам после обтурации желчного протока.

Наблюдаемая динамика изменений уровня изучаемых цитокинов свидетельствует о зависимости дисбаланса этих показателей от длительности механической желтухи. Так, если в первые сутки развития обтурационной желтухи значение ФНО-α составляло ($4,66 \pm 0,23$) пг/мл, а ИЛ-6 — ($0,746 \pm 0,149$) пг/мл, то к 3-м суткам оно достигало максимальной величины, увеличившись в 4,6 и 18,2 раза соответственно. В дальнейшем происходило некоторое снижение их уровня, хотя значения превосходили норму в 1,5 и 5,4 раза.

Взаимосвязь между значениями биохимических показателей и уровнем активности цитокинов позволяет использовать значения последних в качестве критериев для оценки интенсивности гибели гепатоцитов.

Литература

1. Гаджиев Дж.Н., Тагиев Э.Г., Гаджиев Н.Дж. Сравнительная оценка некоторых цитокинов в сыворотке крови и желчи у больных острым калькулезным холециститом // Хирургия Украины. — 2013. — № 1. — С. 62–65.
2. Гаджиев Дж.Н., Тагиев Э.Г., Гаджиев Н.Дж. Состояние цитокинового статуса у больных с механической желтухой доброкачественного генеза // Хирургия. — 2015. — № 5. — С. 56–58.
3. Жидовинов А.А., Жидовинов Г.И., Алёшин Д.А. Значение лабораторных маркеров эндотоксикоза и цитокинового профиля в диагностике и эффективности лечения осложненных форм острого холецистита // Цитокины и воспаление. — 2006. — № 3. — С. 27–33.

- Иванов Ю. В., Чудных С. М. Механическая желтуха: диагностический алгоритм и лечение // *Лечащий врач.* — 2002. — № 7—8. — С. 41—43.
- Ивкова А. Н., Федоров И. Г., Сторожаков Г. И. Роль цитокинов в развитии фиброза печени // *Клин. перспект. гастроэнтерол., гепатол.* — 2006. — № 1. — С. 2—9.
- Мамаев С. Н., Лукина Е. А., Шульпекова Ю. О. и др. Регуляция воспаления и фиброза печени цитокинами при ее хронических поражениях // *Клин. лаб. диагн.* — 2001. — № 12. — С. 37—40.
- Насиров М. Я., Алекберова С. А., Аббасалиева П. М. Роль цитокинов в патологии органов пищеварения // *Сәғһаһууә.* — 2014. — № 2. — С. 86—93.
- Насіров М. Я., Гаджіев Н. Дж., Климова Е. М. и др. Динамика цитокинов с распространенным перитонитом // *ЭНИ Забайкал. мед. вестн.* — 2012. — № 2. — С. 106—111.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — С. 169—175.
- Скляр Л. Ф., Никифоров Н. Д., Маркелова Е. В. Цитокиновый профиль при хроническом гепатите С // *Клин. мед.* — 2005. — № 10. — С. 40—44.
- Хайтов Р. М., Игнатъева Г. А., Сидорович И. Г. Иммунология. — М.: Медицина, 2000. — 432 с.
- Царегородцева Т. М., Серова Т. И. Цитокины в гастроэнтерологии. — М.: Анахарсис, 2003. — 96 с.
- Eckels D. D., Tabatali N., Wanq H. et al. In vitro human Th-cells responses to a recombinant hepatitis C virus antigen: failure in IL-2 production despite proliferation // *Hum. Immunol.* — 1999. — Vol. 60. — P. 187—199.
- Kim J. K., Chon C. Y., Kim L. H. et al. Changes in serum and ascitic monocyte chemo tacticprotein-1 (MCP-1) and IL-10 levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis // *Interferon Cytokine Res.* — 2007. — N 3. — P. 227—230.
- Kiyici M., Nak S. G., Budak F. et al. Lymphocyte subsets and cytokines in ascitic fluid of decompensated cirrhotic patients with and without spontaneous ascites infection // *Gastroenterol. Hepatol.* — 2006. — N 6. — P. 963—969.
- Leist M., Gantner F., Jilg S. et al. Activation of the 55kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release // *J. Immunol.* — 1995. — Vol. 154. — P. 1307—1316.

М. Я. Насіров, Г. Ш. Гараєв, С. А. Алекберова

Азербайджанський медичний університет, Баку

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ВМІСТУ ЦИТОКІНІВ ІЛ-6 І ФНП- α У КРОВІ З БІОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МЕХАНІЧНІЙ ЖОВТЯНИЦІ

Мета роботи — вивчити особливості змін вмісту цитокинів інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) і фактора некрозу пухлин α (ФНП- α) у взаємозв'язку з динамікою біохімічних показників крові на моделі експериментальної механічної жовтяниці у щурів.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження проведено на 30 білих щурах лінії Вістар. Модель механічної жовтяниці створювали перев'язкою позапанкреатичної ділянки загальної жовчної протоки під наркозом (дослідна група, $n = 25$). Група з 5 тварин була контрольною. Вивчали біохімічні показники крові (загальний білірубін, загальний білок, лужна фосфатаза, аспаратамінотрансфераза, γ -глутамілтранспептидаза), а також ІЛ-6 і ФНО- α .

Результати та обговорення. При створенні механічної жовтяниці в експериментальних тварин збільшувалася концентрація досліджуваних цитокинів, що свідчить про те, що запальний процес, який розвивається за цієї патології, пов'язаний з цитокінопосередкованими імунологічними процесами. Динаміка змін рівня досліджуваних цитокинів свідчить про залежність дисбалансу цих показників від тривалості механічної жовтяниці.

Висновки. Динаміка змін досліджуваних показників свідчила як про їх взаємозалежність, так і про залежність їх вмісту від тривалості захворювання. Взаємозв'язок між значеннями біохімічних показників і рівнем активності цитокинів дає змогу використовувати значення останніх як критерій для оцінки інтенсивності загибелі гепатоцитів.

Ключові слова: механічна жовтяниця, імунна система, цитокіни.

M. Y. Nasirov, Q. S. Qarayev, S. A. Alekberova

Azerbaijan Medical University, Baku

INTERRELATION OF THE MAINTENANCE OF CYTOKINES IL-6 AND TNF α IN BLOOD WITH BIOCHEMICAL INDICATORS AT EXPERIMENTAL OBSTRUCTIVE JAUNDICE

The aim — to study changes in cytokines IL-6 and TNF α rate in interrelation with biochemical indicators dynamics on experimental obstructive jaundice rat model.

Materials and methods. Experimental researches were conducted on 30 white Wistar line rats. The model of obstructive jaundice was created by extra pancreatic site of the general bilious canal bandaging under anesthesia. The animals were divided into 2 groups. 1 Group ($n = 5$) was control. The animals' bile duct in 2 group (experimental) ($n = 25$) was tied in order to create an obstructive jaundice model. blood biochemical parameters total bilirubin, total protein, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) gammaglutamyltranspeptidase (GGT) were studied. In addition, IL-6 and TNF α rate were determined.

Results and discussion. The changes dynamics of the indicators testified both of their interdependence, and their dependence on disease duration. In addition, the level of cytokines activity was noted to be the benchmark for measuring the intensity of the hepatocytes death.

Conclusions. At creation of an obstructive jaundice on experimental animals, the concentration of studied cytokines were increasing, that indicates that the inflammatory process developing at this pathology is attended with depended on cytokines immunological processes. The observed cytokines level dynamics changes testifies the dependence of the indicators misbalance on obstructive jaundice duration. The interrelation between the biochemical indicators values and cytokines activity level gives an opportunity to use last values as the criteria for the hepatocytes death's intensity assessment.

Key words: obstructive jaundice, the immune system, cytokines.