



І.Я. Криницька

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»

Особливості цитокінового профілю бронхоальвеолярного змиву щурів із модельованим гепатопульмональним синдромом

Мета роботи — дослідити вміст про- та протизапальних інтерлейкінів у бронхоальвеолярному змиві щурів та обґрунтувати їхню роль у патогенезі гепатопульмонального синдрому.

Матеріали та методи. Досліди проводили на 60 нелінійних білих щурах-самцях із модельованим гепатопульмональним синдромом.

Результати та обговорення. Досліджено вплив двох експериментальних моделей гепатопульмонального синдрому на цитокіновий профіль бронхоальвеолярного змиву у щурів. Встановлено, що у щурів обох експериментальних груп спостерігається вірогідне збільшення вмісту прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, IL-8) на тлі зниження концентрації протизапальних (IL-10).

Висновки. У щурів з експериментальним гепатопульмональним синдромом спостерігається різноспрямована реакція про- і протизапальних цитокінів, що може відігравати важливу роль в ініціації гепатопульмонального синдрому внаслідок нагромадження та активізації альвеолярних макрофагів і запуску метаболічних каскадних реакцій. Серед досліджуваних прозапальних цитокінів бронхоальвеолярного змиву найвиразніших змін зазнав IL-8.

Ключові слова

Цитокіни, гепатопульмональний синдром, патогенез.

Виділяють різні варіанти ураження легень, пов'язаних із захворюваннями печінки: ураження легень, асоційоване з ураженням печінки в межах одного захворювання (дефіцит α_1 -антитрипсину, муковісцидоз, спадкова геморагічна телеангіектазія — хвороба Ослера—Вебера—Рандю, саркоїдоз); ураження легень, патогенетично пов'язане із захворюванням печінки, — імунні позапечінкові вияви (фіброзувальний альвеоліт, легеневий гранулематоз, легеневий васкуліт); ускладнення портальної гіпертензії при цирозі печінки (базальні ателектази або дистелектази, гідроторакс, портопульмональна гіпертензія, гепатопульмональний синдром) [2].

Під гепатопульмональним синдромом (ГПС) розуміють дефект артеріальної оксигенації,

спричинений розширенням внутрішньолегеневих судин, що асоційовано із захворюванням печінки [19].

Немає сумнівів, що за ураження легень реалізація активізації специфічних і неспецифічних імунних реакцій пов'язана із впливом на різні гомеостатичні системи організму низки універсальних медіаторів, серед яких важливе місце посідають цитокіни [7, 11]. Умовно їх можна поділити на такі групи: гемопоетичні (колонієстимулювальні, інтерлейкіни — IL-3 та IL-7 тощо); регулятори природного імунітету (інтерферон-альфа, IL-1 і IL-6, фактор некрозу пухлин-альфа та ін.); регулятори специфічних імунних (IL-2 і IL-4) та запальних реакцій, що розвиваються в процесі специфічної імунної відповіді (IL-5 і IL-10 та ін.). Такий поділ на групи досить умовний, оскільки для всіх цитокінів характерна так звана плеотропна дія, тобто

Таблиця 1. Рівень ІЛ-1 β у щурів з модельованим ГПС (М \pm m)

Група	Перша контрольна (n = 12)	Перша експериментальна (n = 12)	Друга контрольна (n = 12)	Друга експериментальна (n = 12)
БАЗ				
ІЛ-1 β , пг/мл	4,55 \pm 0,37	5,96 \pm 0,44 $p_1 < 0,05$	4,82 \pm 0,33	7,62 \pm 0,51 $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,05$

Примітка. Тут і в наступних таблицях p_1 — різниця вірогідна порівняно з контролем; p_2 — різниця вірогідна порівняно з показниками уражених тварин.

вони — поліфункціональні молекули, що діють більше ніж на одну клітину-мішень і стимулюють у різних мішенях різні процеси (ріст, диференціювання, експресію певних мембранних антигенів) [3].

У відповідь на локальне чи системне ураження в легенях цитокіни продукуються власними клітинами, зокрема альвеолярними макрофагами, епітеліальними клітинами легень або клітинами, що з'являються в легенях, а саме: нейтрофілами, лімфоцитами, моноцитами. Рівень цитокінів зростає при багатьох легневих патологіях, проте їхня роль залишається суперечливою, що зумовлює актуальність пропонованого дослідження [1, 17].

Мета дослідження — дослідити вміст про- та протизапальних інтерлейкінів у бронхоальвеолярному змиві щурів та обґрунтувати в експерименті їхню роль у патогенезі ГПС.

Матеріали та методи

Досліди проводили на 60 нелінійних білих щурах-самцях з масою 180–220 г. У процесі моделювання патології 12 тварин загинуло. Першу експериментальну модель ГПС створено шляхом накладання подвійної лігатури на загальну жовчовивідну протоку і подальшого його перетину скальпелем [14]. У тварин першої контрольної групи загальну жовчовивідну протоку виділили з тканин, але не перетинали. Післяопераційну рану поширено наглухо зашивали. На 31-шу добу після операції тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом. Другу експериментальну модель ГПС створено шляхом 8-тижневого внутрішньошлункового введення олійного розчину CCl_4 (400 г на 1 л) в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини в першу добу експерименту, по 0,3 мл на 100 г на третю добу і далі кожної третьої доби до закінчення експерименту. Додатково в раціон щурів введено суміш кукурудзяної муки, смальцю і холестеролу та розчин алкоголю. Друга контрольна група тварин перебувала на стандартному раціоні віварію і отримувала внутрішньошлунково оливкову олію в еквівалентній кількості [20].

Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [13]. Після забою тварин розкривали грудну клітку і виділяли легенево-серцевий комплекс. З легень отримували бронхоальвеолярний змив (БАЗ) шляхом п'ятиразового промивання їх через трахею ізотонічним розчином натрію хлориду. 5,0–5,5 мл БАЗ центрифугували при 1500 г протягом 15 хв, відбирали супернатант [6].

Рівні інтерлейкіну-1 β (ІЛ-1 β), інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), інтерлейкіну-8 (ІЛ-8) й інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) визначали в БАЗ за імуноферментним методом на аналізаторі STAT-FAX з використанням тест-систем ТОВ «УкрмедДон» (Україна) згідно з інструкціями фірми-виробника.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за стандартними методами варіаційної статистики з використанням пакета статистичних програм. Результати наведено як (М \pm m), де М — середнє значення показника, m — стандартна похибка. Вірогідність розбіжностей між показниками визначали за допомогою двовибіркового критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Встановлено, що у щурів першої експериментальної групи на 31-шу добу після перев'язування загальної жовчовивідної протоки рівень ІЛ-1 β у БАЗ вірогідно зріс на 30,5 % ($p < 0,05$) порівняно із тваринами контрольної першої групи (табл. 1).

У щурів другої експериментальної групи (тетрахлорметан-індукований цироз) рівень ІЛ-1 β у БАЗ вірогідно зростав на 58,7 % ($p_1 < 0,001$) порівняно із тваринами контрольної другої. Під час порівняння рівня ІЛ-1 β у БАЗ тварин обох експериментальних груп встановлено переважання його на 27,8 % у щурів з тетрахлорметан-індукованим цирозом ($p < 0,05$).

Ймовірно, що в ролі основного продуцента ІЛ-1 β виступають активізовані альвеолярні макрофаги, цитотоксична фаза активізації яких супроводжується продукцією активних форм

Таблиця 2. Рівень ІЛ-6 у щурів з модельованим ГПС ($M \pm m$)

Група	Перша контрольна (n = 12)	Перша експериментальна (n = 12)	Друга контрольна (n = 12)	Друга експериментальна (n = 12)
БАЗ				
ІЛ-6 (пг/мл)	7,90 ± 1,16	11,90 ± 1,13 $p_1 < 0,05$	6,69 ± 0,57	8,64 ± 0,68 $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$

Таблиця 3. Рівень ІЛ-8 у щурів з модельованим ГПС ($M \pm m$)

Група	Перша контрольна (n = 12)	Перша експериментальна (n = 12)	Друга контрольна (n = 12)	Друга експериментальна (n = 12)
БАЗ				
ІЛ-8 (пг/мл)	6,05 ± 0,39	27,08 ± 2,27 $p_1 < 0,001$	5,10 ± 0,50	15,45 ± 1,37 $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,001$

Таблиця 4. Рівень ІЛ-10 у щурів з модельованим ГПС ($M \pm m$)

Дослідна група	Перша контрольна група (n = 12)	Перша експериментальна група (n = 12)	Друга контрольна група (n = 12)	Друга експериментальна група (n = 12)
БАЗ				
ІЛ-10 (пг/мл)	9,06 ± 1,02	3,76 ± 0,36 $p_1 < 0,001$	6,83 ± 0,70	3,60 ± 0,44 $p_1 < 0,01$; $p_2 > 0,05$

кисню, лізосомальних протеолітичних ферментів і прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-1 β .

Підвищення продукції ІЛ-1 β може стимулювати внутрішньолегевену експресію ЕТ_В — рецепторів [18], з якими зв'язується частина ендотеліну-1, що виділяється люмінально (в просвіт судин) і зумовлює аутокринний вазодилаторний ефект через збільшення eNOS активності і продукцію NO [21].

Рівень ІЛ-6 у щурів першої експериментальної групи (на 31-шу добу після перев'язування загальної жовчовивідної протоки) в БАЗ вірогідно зріс на 50,6 % ($p < 0,05$) порівняно із тваринами контрольної першої групи (табл. 2).

У щурів другої експериментальної групи (тетрахлорметан-індукований цироз) рівень ІЛ-6 в БАЗ вірогідно зріс на 29,1 % ($p < 0,05$) порівняно із тваринами контрольної другої. Під час порівняння рівнів ІЛ-6 у БАЗ тварин обох експериментальних груп виявлено вірогідну різницю ($p < 0,05$). Встановлено переважання цього показника на 27,4 % у щурів на 31-шу добу після перев'язування загальної жовчовивідної протоки.

Рівень ІЛ-8 у щурів на 31-шу добу після перев'язування загальної жовчовивідної протоки в БАЗ вірогідно збільшився в 4,5 разу ($p < 0,001$) порівняно із тваринами контрольної першої групи (табл. 3).

У щурів з тетрахлорметан-індукованим цирозом печінки рівень ІЛ-8 у БАЗ достовірно зростав у 3 рази ($p < 0,001$) порівняно із тваринами конт-

рольної групи № 2. При порівнянні рівня ІЛ-8 у БАЗ тварин обох експериментальних груп нами встановлено переважання даного показника на 43 % у щурів на 31-шу добу після перев'язки загальної жовчовивідної протоки ($p < 0,001$).

Зі всіх досліджуваних прозапальних цитокінів ІЛ-8 у наших експериментах зазнав найвираженіших змін. Високий рівень даного показника у щурів з модельованим ГПС може бути зумовлений тим, що він продукується під впливом бактеріальних ендотоксинів та цитокінів, в основному ІЛ-1 і фактора некрозу пухлин-альфа. Окиснювальний стрес також може індукувати продукцію ІЛ-8, активуючи ядерні фактори транскрипції. Доведено, що редокс-чутливі транскрипційні фактори (NF- κ B і AP-1) активуються в клітинах, які беруть участь у запаленні, зумовлюючи ірегуляцію деяких прозапальних генів [16, 10]. Наші попередні дослідження [4, 5] показали активацію перекисного окиснення та підвищення рівня фактора некрозу пухлин-альфа у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом.

Рівень ІЛ-10 у щурів на 31-шу добу після перев'язки загальної жовчовивідної протоки в БАЗ достовірно зменшився в 2,4 разу ($p < 0,001$) порівняно із тваринами контрольної групи № 1 (табл. 4).

У щурів з тетрахлорметан-індукованим цирозом печінки рівень ІЛ-10 у БАЗ достовірно зменшився в 1,9 разу ($p < 0,01$) порівняно із тварина-

Таблиця 5. Співвідношення IL-1 β /IL-10 у щурів з модельованим ГПС (M \pm m)

Дослідна група	Перша контрольна група (n = 12)	Перша експериментальна група (n = 12)	Друга контрольна група (n = 12)	Друга експериментальна група (n = 12)
БАЗ				
IL-1 β /IL-10	0,526 \pm 0,059	1,696 \pm 0,252 $p_1 < 0,001$	0,746 \pm 0,105	2,221 \pm 0,205 $p_1 < 0,001$; $p_2 > 0,05$

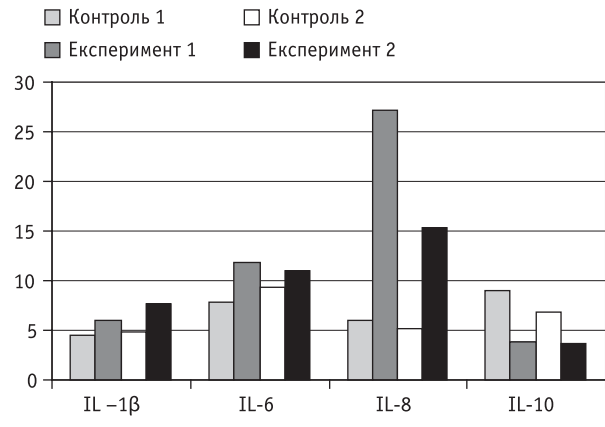
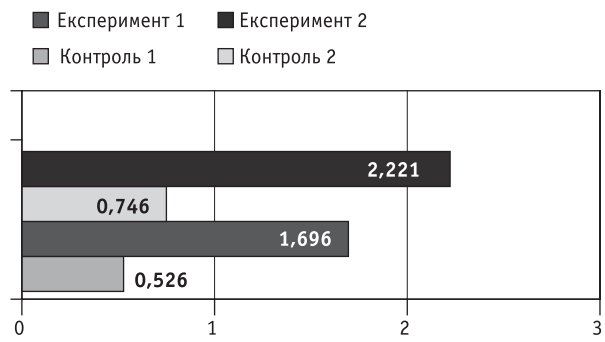


Рис. 1. Зміни вмісту прозапальних та протизапальних цитокінів у БАЗ щурів з модельованим ГПС

Рис. 2. Зміни співвідношення IL-1 β /IL-10 у БАЗ щурів з модельованим ГПС

ми контрольної групи № 2. При порівнянні рівня IL-10 у БАЗ тварин обох експериментальних груп нами не виявлено між ними достовірної різниці ($p > 0,05$).

IL-10 належить до протизапальних медіаторів, які блокують ефекти лімфоцитарних і макрофагальних прозапальних цитокінів та інгібують функцію антигенпрезентуючих клітин. Він стимулює в моноцитах експресію розчинних рецепторів TNF- α (природних інгібіторів TNF- α) і збільшує продукцію IL-1R антагоністу (IL-1Ra), що пригнічує зв'язування IL-1 з мембранним рецептором [15]. IL-10 продукується Th-2 типу, В-лімфоцитами, моноцитами і епітеліальними клітинами [9]. Даний цитокін здатний інгібувати апоптоз, зокрема В-лімфоцитів і активованих Т-клітин [12].

Зменшення рівня даного цитокіну у БАЗ щурів з модельованим ГПС, ймовірно, свідчить про виснаження механізмів локальної деактивації моноцитарно-макрофагальної продукції прозапальних цитокінів.

Отже, результати нашого дослідження свідчать про різноспрямовану реакцію прозапальних і протизапальних цитокінів у бронхоальвеолярному змиві щурів з обома моделями ГПС (рис. 1). Такий дисбаланс цитокінового профілю може зумовлювати порушення активації і диференціації імункомпетентних клітин, а звідси і розвиток імунопатологічних реакцій, патології гомеостазу і прямого пошкоджувального ефекту цитокінів [8].

Величина співвідношення в БАЗ цитокінів з прозапальною та протизапальною активністю (IL-1 β /IL-10) у щурів на 31-шу добу після перев'язки загальної жовчєвивідної протоки в БАЗ достовірно збільшилася в 3,2 рази ($p < 0,001$) порівняно із тваринами контрольної групи № 1 (табл. 5).

У щурів з тетрахлорметан-індукованим цирозом печінки співвідношення (IL-1 β /IL-10) у БАЗ достовірно збільшилося в 3 рази ($p < 0,001$) порівняно із тваринами контрольної групи № 2. При порівнянні співвідношення (IL-1 β /IL-10) у БАЗ тварин обох експериментальних груп нами не виявлено між ними достовірної різниці ($p > 0,05$) (рис. 2).

Висновки

1. У щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом спостерігається гіперпродукція прозапальних IL-1 β , IL-6 та IL-8 у легенях на тлі зниження продукції протизапального IL-10, що може відігравати важливу роль в ініціації ГПС внаслідок накопичення та активації альвеолярних макрофагів та запуску метаболічних каскадних реакцій.

2. Серед досліджуваних прозапальних цитокінів бронхоальвеолярного змиву найвираженіших змін зазнав IL-8.

Перспективи подальших досліджень. Обґрунтованою є перспектива продовження вивчення патогенетичних особливостей ГПС, а саме вивчення функціонального стану системи мононуклеарних фагоцитів, що є основним джерелом продукції цитокінів.

Список літератури

1. Иванов А.А., Гладких О.П., Кузнецова А.В., Данилова Т.И. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии // Молекулярная медицина.— 2005.— № 2.— С. 16–21.
2. Ильченко Л.Ю., Федоров И.Г., Карабиненко А.А. и др. Гепатопульмональный синдром: состояние проблемы // СТМ.— 2009.— № 1.— С. 84–88.
3. Кирковский Л.В., Акалович С.Т., Чалый Ю.В., Кирковский В.В. Роль интерлейкина-8, дефензинов, фактора некроза опухоли и его рецепторов в процессе реализации воспалительной реакции // Медицинский журнал.— 2008.— № 3.— С. 8–12.
4. Криницька І.Я. Показники перекисного окиснення ліпідів у щурів за умови експериментального гепатопульмонального синдрому // Здобутки клінічної і експериментальної медицини.— 2011.— № 1.— С. 66–70.
5. Криницька І.Я., Яремчук О.З. Роль системи фактора некрозу пухлин-альфа у розвитку експериментального гепатопульмонального синдрому // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія.— 2012.— № 2.— С. 28–34.
6. Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. Эластолитическая активность бронхоальвеолярного лаважа при моделировании воспалительного процесса в легких // Укр. біохім. журн.— 2008.— № 1 (80)— С. 89–95.
7. Марущак М.І. Закономірності змін цитокинового статусу в бронхоальвеолярному змиві щурів за умови гострого ураження легень // Шпитальна хірургія.— 2012.— № 2.— С. 39–42.
8. Левитан Б.Н., Астатин А.В., Афанасьев С.С., Левитан Г.Б. Цитокиновый профиль сыворотки крови при циррозах печени // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.— 2003.— № 5.— С. 151.
9. Рубцова И.Е., Лебедева И.Е. Действие моноклональных антител к интерлейкину-10 на пролиферативный ответ Т-лимфоцитов зависит от уровня апоптоза в культурах мононуклеарных клеток пуповинной крови новорожденных // Иммунология.— 2004.— № 1.— С. 16–20.
10. Aydin M., Ozkok E., Ozturk O. et al. Relationship between interleukin-8 and the oxidant-antioxidant system in end-stage renal failure patients // Exp. Clin. Transplant.— 2007.— Vol. 5, N 1.— P. 610–613.
11. Barnes P.J., Shapiro S.D., Pauwels R.A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms // Eur. Respir. J.— 2003.— Vol. 22.— P. 672–688.
12. Cohen S.B., Crawley J.B., Kahan M.C. et al. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an up-regulation of Bcl-2 // Immunology.— 1997.— Vol. 92, N 1.— P. 1–5.
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of Europe. Strasbourg.— 1986.— N 123.— 52 p.
14. Fallon M.B., Abrams G.A., McGrath J.W. et al. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome // Am. J. Physiol.— 1997.— Vol. 272.— P. 779–784.
15. Jenkins J.K., Malyak M., Arend W.P. The effects of interleukin-10 (IL-10) on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils // Lymphokine Cytokine Res.— 1994.— Vol. 13.— P. 47–49.
16. Lakshminarayanan V., Drab-Weiss E.A., Roebuck K.A. H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NFkappaB to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells // J. Biol. Chem.— 1998.— Vol. 273, N 49.— P. 32670–32678.
17. Markelova E.V., Turmova E.P., Silaev A.A. et al. The role of cytokines in the development of the pneumonia after aorto-coronary bypass at patients with ischemic heart disease // Pacific Medical Journal.— 2006.— N 2.— P. 35–37.
18. Newman P., Kakkar V.V., Kanse S.M. Modulation of endothelin receptor expression in human vascular smooth muscle cells by interleukin-1 beta // FEBS Lett.— 1995.— Vol. 363.— P. 161–164.
19. Shafiq M., Khan A.A., Alam A. et al. Frequency of hepatopulmonary syndrome in cirrhotic patients // J. Coll. Physician. Surq. Pak.— 2008.— Vol. 18, N 5.— P. 278–281.
20. Zhang Hui-Ying, De-Wu Han, Zhong-Fu Zhao et al. Multiple pathogenic factor-induced complications of cirrhosis in rats: A new model of hepatopulmonary syndrome with intestinal endotoxemia // World J. Gastroenterology.— 2007.— Vol. 13 (25)— P. 3500–3507.
21. Zhang Zhao-Jie, Chang-Qing Yang. Progress in investigating the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome // Hepatobiliary Pancreat Dis Int.— 2010.— Vol. 9 (4)— P. 355–360.

И.Я. Криницька

Особенности цитокинового профиля бронхоальвеолярного смыва крыс с моделируемым гепатопульмональным синдромом

Цель работы — исследовать содержание про- и противовоспалительных интерлейкинов в бронхоальвеолярном смыве крыс и обосновать их роль в патогенезе гепатопульмонального синдрома.

Материалы и методы. Опыты проводили на 60 беспородных крысах-самцах с моделируемым гепатопульмональным синдромом.

Результаты и обсуждение. Исследовано влияние двух экспериментальных моделей гепатопульмонального синдрома на цитокиновый профиль бронхоальвеолярного смыва крыс. Установлено, что у крыс обеих экспериментальных групп наблюдается достоверное увеличение содержания провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8) на фоне снижения содержания противовоспалительных (IL-10).

Выводы. У крыс с экспериментальным гепатопульмональным синдромом наблюдается разнонаправленная реакция про- и противовоспалительных цитокинов, что может играть важную роль в инициации гепатопульмонального синдрома вследствие накопления и активизации альвеолярных макрофагов, а также запуска метаболических каскадных реакций. Среди исследуемых провоспалительных цитокинов бронхоальвеолярного смыва наиболее выражены изменения претерпел IL-8.

I. Ya. Krynytska

The features of bronchoalveolar lavage cytokine profile in rats with modeled hepatopulmonary syndrome

Objective: to determine the content of pro- and anti-inflammatory interleukins in bronchoalveolar lavage in rats with hepatopulmonary syndrome (HPS) model.

Materials and methods. The experiments were performed on 60 nonlinear mature rats with hepatopulmonary syndrome model.

Results and discussion. The influence of two experimental models of hepatopulmonary syndrome on cytokine profile of bronchoalveolar lavage in rats has been studied. Significant increase of pro-inflammatory interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8) content and decrease the anti-inflammatory interleukins (IL-10) content was observed in animals of both experimental groups.

Conclusions. Multidirectional reaction of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines was observed in rats with experimental hepatopulmonary syndrome, what may play an important role in the initiation of HPS due to the accumulation and activation of alveolar macrophages and start of metabolic cascade reactions. IL-8 had undergone the most pronounced changes among the studied proinflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage.

Контактна інформація:

Кривницька Інна Яківна, к. мед. н., доцент кафедри клініко-лабораторної діагностики
46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1
Тел. (0352) 25-45-77
E-mail: innakri@yahoo.com

Стаття надійшла до редакції 9 листопада 2012 р.