УДК 616.329-001.37-053

Я. Раєцька, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

РІВЕНЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ 1 ТА 2 СТУПЕНЯ

Досліджено, що при моделюванні лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня у статевонезрілих щурів відбувався запальний процес, який пригнічував функції імунної системи організму на 7 та 15 доби. Встановлено зміни прозапальних цитокінів (підвищенням вмісту IL-1β, зниження IL-12) та протизапальних цитокінів (зростання рівню IL-10, зниження IL-4) найсуттєвіші зміни були при моделюванні лужного опіку стравоходу 2 ступеня. Показано, що при моделюванні опіку стравоходу 1 ступеня септичних ускладнень не відбувалось, при моделюванні 2 ступеня залишався ризик поліорганної недостатності або сепсису.

Ключові слова: опік стравоходу, прозапальні, протизапальні, інтерлейкіни.

Вступ. Відповідно до сучасних уявлень про опікову хворобу, одна з основних причин обтяженого перебігу опіку – є розвиток запального процесу. Основним фактором, відповідальним за розвиток запального процесу в організмі, є ослаблення імунного захисту з порушенням бар'єрної функції організму. У реалізації запальної реакції значну роль відіграє імунна система, впливаючи на гуморальні фактори специфічного і неспецифічного імунітету, і на місцеву дію, коли клітини імунної системи наближаються до джерела антигенної інформації, виділяють локально цитокіни, розрізняють і вбивають клітину [1,17]. У розвитку запального процесу важливу функцію виконують прозапальні інтерлейкіни (ІЛ), ІЛ-1β, ІЛ-12 [2]. Ці цитокіни беруть участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [3,17]. Наступний етап репарації включає стихання запальної реакції і посилений синтез колагену. Протизапальні інтерлейкіни, до яких відносять ІЛ-10 та ІЛ-4, які здатні зменшувати запальні прояви [3,5,12].

Незважаючи на великий обсяг досліджень недостатньо вивчені залишаються ряд питань по даній проблематиці, оскільки найчастіше відбувається механічне перенесення закономірностей перебігу опікової хвороби у дорослих в дитячу клініку.

Тому, метою даної роботи було дослідження цитокінів імунної системи у сироватці крові статевонезрілих щурів за умов моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеню на 7 та 15 доби.

Матеріали та методи. У дослідах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90—110 г (відповідають 1-4-річному віку дітей) із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Їм експериментально моделювали лужний опік стравоходу (ЛОС) 1 та 2 ступеня розчином NaOH 10%, 20%, відповідно [4]. Сироватку для дослідження відбирали на 7 та 15 доби, які відповідають стадії ранньої і пізньої токсемії опікової хвороби [6]. Методом виведення тварин із досліду була цервікальна дислокація. Рівень цитокінів (інтерлейкіну-1β, інтерлейкіну-12, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-10) у сироватці крові піддослідних тварин визначали методом імуноферментного аналізу з використанням наборів реактивів Biotrak ELISA System фірми "Healthcare" згідно з інструкціями. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми Excel. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стьюдента (t). При цьому достовірними вважались різниці $p<0,05$.

Результати та їх обговорення. В багатьох наукових роботах доведено, що на опікову травму, організм відповідає неспецифічною запальною реакцією, яка проявляється викидом цитокінів [6,12,17]. Вираженість цієї реакції залежить від площі та глибини ураження, характеру інфекційного агента та активності імунної відповіді постраждалого організму.

В період ранньої і пізньої токсемії (що припадає на 7-15 доби), знижується активність транспорту кисню до тканин. Тяжка і тривала гіпоксія тканин активує ендотеліальні клітини, котрі звільняють медіатори запалення та мітогенні молекули. Медіатори запалення індукують адгезію нейтрофільних гранулоцитів і непрямим шляхом ініціюють проліферацію гладком'язових клітин. Під час процесу адгезії лейкоцити активуються і звільняють вільні радикали та протеази. Вони пошкоджують біологічні молекули (зокрема – колаген). Проліферуючі гладком'язові клітини змінюють свій фенотип і втрачають здатність до фізіологічного скорочення. Венозний стаз призводить до церебральної ішемії та цитотоксичного набряку, що виникає в результаті метаболічного ацидозу [3,6,7].

Цитокіни впливають практично на всі клітини, що беруть участь у розвитку запалення, включаючи гранулоцити, макрофаги, фібробласти, клітини ендотелію і епітелію, Т- і В-лімфоцити [8]. При опіковій травмі значення цитокінів важко переоцінити на місцевому і системному рівнях. При тяжкому запаленні цитокіни потрапляють в кров, що призводить до гострої відповіді на рівні всього організму. У розвитку запалення при опіках важлива роль належить прозапальним цитокінам: ФНП-α, ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-1β, ІЛ-12.

Нами були досліджені прозапальні інтерлейкіни до яких відносяться ІЛ-1β, ІЛ-12. Вони стимулюють проліферацію Т- і В-лімфоцитів, продукцію антитіл, посилюють синтез адгезивних молекул, активують синтез білків гострої фази, беруть участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [3,5,17]. IL-1β, є одним з ключових цитокінів, який характеризує рановий процес. Дослідження ІЛ-1β в сироватці крові показало збільшення цитокіну в порівнянні з інтактними тваринами (рис. 1).

© Раєцька Я., 2015

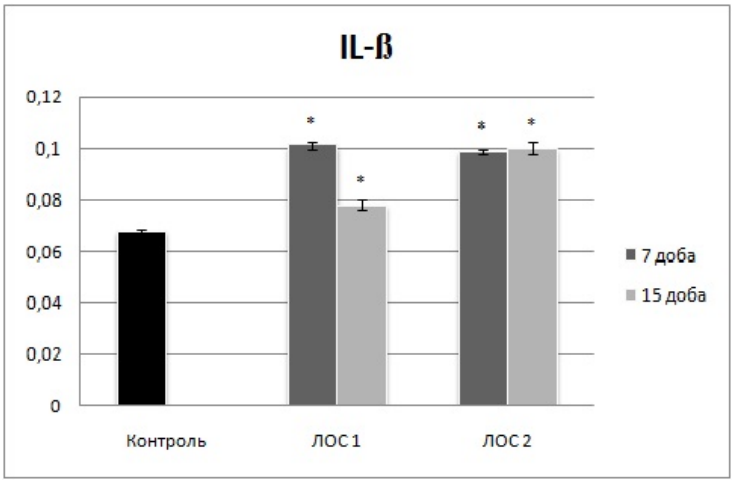

Рис. 1. Рівень прозапального цитокіна (IL-1ß) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. (M±m, n=10)

* – p<0,05 порівняно з контролем.

При моделюванні ЛОС 1 ступеня на 7, 15 доби рівень зростав на 60%, 14% відповідно. За умов 2 ступеня на 45%, 47% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Отримані дані узгоджуються з літературними, та свідчать про перебіг ранового процесу у щурів опіком, який характеризується тривалим підвищенням вмісту IL-1β [3].

Основними продуцентами IL-12 є моноцити, макрофаги, нейтрофіли, активовані лімфоцити. Індукторами синтезу цитокіну служать мікробні компоненти і продукти. Було показано, що IL-12 є ключовим цитокіном для посилення імунної відповіді та ініціації протиінфекційного захисту. Основними клітинами-мішенями IL-12 є природні кілери і Т-лімфоцити. Цитокін активує диференціювання Т-лімфоцитів, підвищує їх цитотоксичну активність [12]. Досліджуючи рівень ІЛ-12 за умов моделювання опіку були показані наступні зміни (рис. 2). При моделюванні ЛОС 1 ступеня на 7 добу рівень знижувався на 12%, на 15 добу зростав на 3%. За умов моделювання 2 ступеня на 7, 15 доби рівень ІЛ-12 знижувався на 6%, 10% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Отже, відзначалось незначне збільшення рівня IL-12 при моделюванні ЛОС 1 ступеня, що свідчить про відсутність септичних ускладнень. Зниження концентрації IL12, яке ми спостерігали при моделюванні опіку 2 ступеня свідчило про ризик розвитку поліорганної недостатності [9,10].

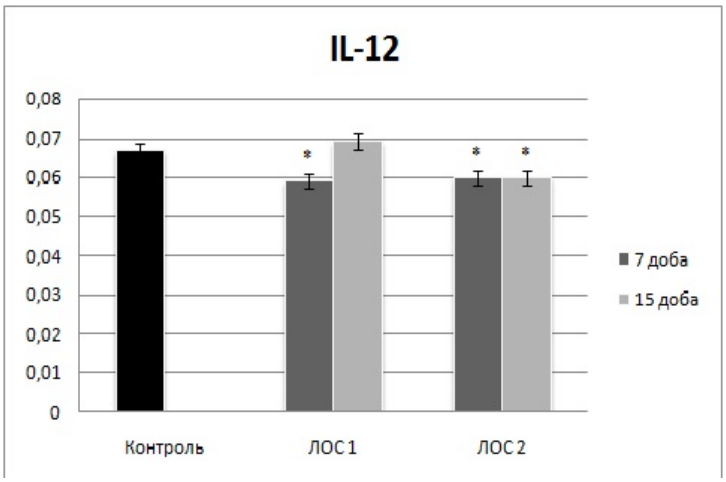

Рис. 2. Рівень прозапального цитокіна (IL-12) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. (M±m, n=10)

* – p<0,05 порівняно з контролем

Таким чином, рівень деяких цитокінів в крові при опіковій травмі розглядається як патофізіологічна ланка ураження органів та розвитку поліорганної недостатності, сепсису [11]. Групою китайських дослідників була встановлена прогностична роль підвищення концентрації ІЛ-10, в період токсемії [12]. Саме високий рівень ІЛ-10 пов'язують з високим ризиком септичних ускладнень після опіків [13,14].

Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження протизапальних інтерлейкінів до яких відносяться ІЛ-10, ІЛ-4. Вони синтезовані ТН2 і ТН3 клітинами, є антагоністами прозапальних цитокінів і володіють здатністю пригнічувати їх біологічну активність, зокрема, вони пригнічують проліферацію і відповідь Т-лімфоцитів на антигени, гальмують продукцію ІЛ-1, ФНП-α, оксиду азоту і простагландинів, зменшуючи,

таким чином, запальні прояви [3,5,12]. Дослідження ІЛ-10 в сироватці крові статевонезрілих щурів показало збільшення цитокіну в порівнянні з інтактними тваринами (рис. 3). При моделюванні ЛОС 1 ступеня на 7 добу рівень зростав на 6%, на 15 добу наближався до рівню контролю. За умов ЛОС 2 ступеня рівень зростав на 1,5%, 13% відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

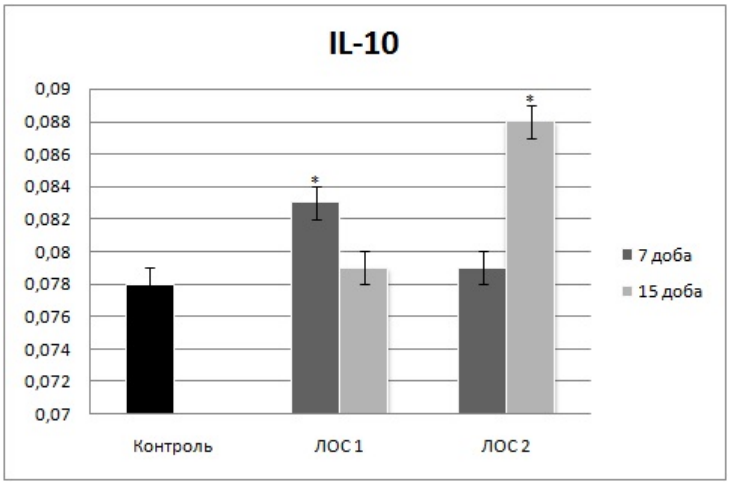

Рис. 3. Рівень протизапального цитокіна (IL-10) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. (M±m, n=10)

* – p<0,05 порівняно з контролем

Інші дослідники включають в критерії несприятливого результату при сепсисі і підвищення концентрації ІЛ-6 [12,15]. Встановлено, що одним з факторів підвищення ІЛ-6 при опіковій травмі є зниження концентрації ІЛ-4 (негативна достовірна кореляція), тому рівень ІЛ-4 також розглядається як прогностичний фактор виникнення ускладнень [16]. При дослідженні рівня ІЛ-4 за умов моделювання опіку були показані наступні зміни (рис. 4). За умов моделювання ЛОС 1 ступеня на 7, 15 доби рівень знижувався на 7%,14%, відповідно. За умов моделювання 2 ступеня на 7, 15 доби рівень ІЛ-4 знижувався на 11%, 8% відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

Отже, були виявленні певні особливості змін рівнів прозапальних та протизапальних цитокінів при моделюванні ЛОС 1, 2 ступеня у статевонезрілих щурів. Отримані дані свідчать, що ЛОС 1 ступеня протікав без розвитку септичних ускладнень, при моделюванні ЛОС 2 ступеня залишався ризик поліорганної недостатності або сепсису. У зв'язку з цим, доцільною є імунологічна і метаболічна корекція в лікуванні опікових хворих.

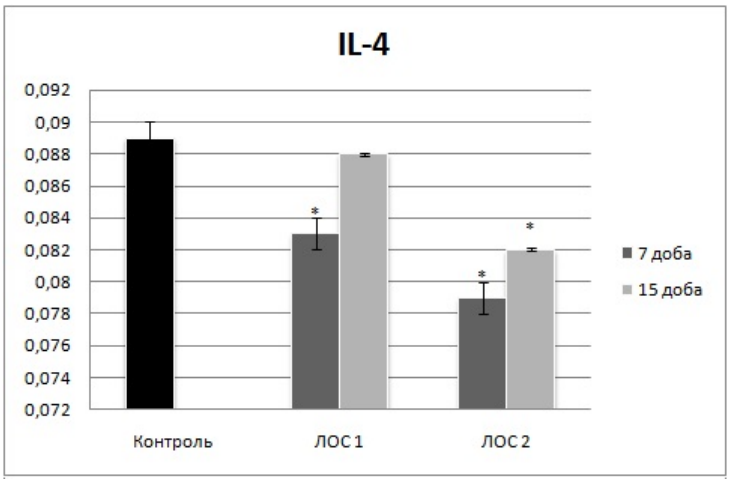

Рис. 4. Рівень протизапального цитокіна (IL-4) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. (M±m, n=10)

* – p<0,05 порівняно з контролем

Висновок

Отже, було досліджено, що при моделюванні лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня у статевонезрілих щурів відбувався запальний процес, який пригнічував функції імунної системи організму на 7 та 15 доби.

Показано, що при моделюванні опіку стравоходу 1,2 ступеня відбувалось тривале підвищенням вмісту IL-1β на 7, 15 доби. Встановлено зниження IL-12 при моделюванні опіку стравоходу 2 ступеня. Виявлено зростання рівню IL-10 та зниження IL-4 найбільше при експериментальному опіку 2 ступеня.

Встановлені зміни рівнів прозапальних та протизапальних цитокінів вказують, що при моделюванні лужного опіку стравоходу 1 ступеня септичних ускладнень

не відбувалось, при моделюванні 2 ступеня залишався ризик поліорганної недостатності або сепсису.

Список використаних джерел

1. Казаков В.Н. Пути взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем в регуляции функций организма / Казаков В.Н., Снегирь М.А., Снегирь А.Г. и др. // Архив клинической и экспериментальной медицины. – Т.13, № 1–2. – 2004. – С. 3–10.
2. Змушко Е.И., Белозеров Е.С., Митин Ю.А. Клиническая иммунология. Руководство для врачей. – СПб, 2001. – 574 с.
3. Поликарпова А. В. Сравнительное изучение динамики уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при ожогах кожи различнойприроды/ А. В. Поликарпова, Е. Э.Перский// Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія : Біологія. – 2011. – № 971, вип. 14. – С. 27-32.
4. Я.Б. Раєнька. Експериментальна модель лужного опіку І та ІІ-го ступеню стравоходу у статевонезрілих щурів/ Я.Б. Раєцька, Т.В. Іщук, О.М. Савчук Л.І. Остапченко. // Науковий вісник Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Біологія. – 2014. – Т.6. – С. 129-132.
5. Ward P.A. The acute in flammatoryresponse and its regulation /Ward P.A., Lentsch A.B. // Archives of Surgery. – 1999. – №134. – P. 666– 669.
6. Фисталь Э.Я., Козинец Г.П., Самойленко Г.Е., Носенко В.М., Фисталь Н.Н., Солошенко В.В. Комбустиология: Учебник. – Донецк, 2005. – 315 с.
7. Оглоблина В. М. Современные основы патогенеза острой церебральной ишемии / В. М. Оголоблина // Український журнал екстремальної медицини імені Г. О. Можаєва. – 2005. – Том 6. – №2. – С. 81-87.
8. Belardelli, F. Role of interferons an do ther cytokines in there gulation of the immune response / F. Belardelli // APMIS. – 1995. – Vol. 103 (3). – P. 161-179.
9. Koller M. Liberationof interleukin 12 (IL12) after trauma and polytrauma/ Koller M., David A., Hahn M.P. etal. // Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd. – 1998. – Vol. 115, Suppl. 1. – P. 453–456.
10. Wick M. Does liberation of interleukin 12 correlate with the clinical course of polytraumatized patients/ Wick M., Kollig E., Walz M. etal. // Chirurg. – 2000. – Vol. 71, №. 9. – P. 1126–1131.
11. Agay, D. Interleukin-6, TNF-alphaand interleukin-1 beta levels in blood and tissue in severely burned rats / D. Agay, M. Andriollo-Sanchez, R. Claeyssenetal./ Agay, D. // European CytokineNetwork. – 2008. – Vol. 19 (1). – P. 1-7.
12. Zhou, H. Changes in serum contents of interleukin-6 and interleukin-10 and their relation with occurrence of sepsis and prognosis of severely burned patients / J. Zhou, J.J. Tu, Y. Huangetal. // Zhonghua Shao Shang Za Zhi. – 2012. – Vol. 28 (2). – P. 111-115.
13. Lyons, A. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection / A. Lyons, J.L. Kelly, M.L. Rodricketal. // Annual Surgery. – 1997. – Vol. 226 (4). – P. 450-458.
14. Napolitano, L.M. Nitric oxide inhibition normalizes splenocyte interleukin-10 synthesis in murine thermal injury / L.M. Napolitano, C. Campbell // Archive Surgery. – 1994. – Vol. 129 (12). – P. 1276-1282.
15.Pileri, D. Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome / D. Pileri, A. Accardo Palombo, L. D'Amelioetal. // Annual BurnsFireDisasters. – 2008. – Vol. 21 (4). – P. 182-185.
16.Messingham, K.A. Interleukin-4 treatment restores cellular immunity after ethanol exposure and burn injury / K.A. Messingham, S.A. Heinrich, E.M. Schillingetal. // Alcoholic Clinical Experimental Research. – 2002. – Vol. 26 (4). – P. 519-526.
17. Paunel-Görgülü, A. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis / A. Paunel-Görgülü, T. Kirichevska, T. Lögters et al. // Molecular Medicine. – 2012. – Vol. 18 (1). – P. 325-335.

Надійшла до редколегії 22.12.15

Я. Раецкая, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЩЕЛОЧНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА 1 И 2 СТЕПЕНИ

Доказано, что при моделировании щелочного ожога пищевода 1 и 2 степени у неполовозрелых крыс происходил воспалительный процесс, который угнетал функции иммунной системы организма на 7 и 15 сутки. Установлены изменения провоспалительных цитокинов (повышение содержания IL-1β, снижение IL-12) и противовоспалительных цитокинов (рост уровня IL-10, снижение IL-4) более существенные изменения наблюдали при моделировании щелочного ожога пищевода 2 степени. Показано, что при моделировании ожога пищевода 1 степени септических осложнений не происходило, при моделировании 2 степени оставался риск полиорганной недостаточности или сепсиса.

Ключевые слова: ожог пищевода, провоспалительные, противовоспалительные, интерлейкины.

Ya. Raetska, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

PROINFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES LEVEL IN RAT'S SERUM UNDER MODELING ALKALI BURNS OF THE ESOPHAGUS OF 1ST AND 2ND DEGREES

It was investigate under modeling alkali burns of the esophagus of 1st and 2nd degrees in immature rats was occure inflammation that inhibited functions of the immune system at 7th and 15th day. Determined changes of proinflammatory cytokines (increased content of IL-1β, IL-12 decrease) and anti-inflammatory cytokines (growth level of IL-10, decreased IL-4) were the most significant at the modeling 2nd degrees esophageal alkali burns. It is shown that at modeling esophagus burns of 1st degree not take place septic complications and under modeling 2nd degrees the risk of multiple organ failure or sepsis were occure.

Keywords: burn of the esophagus, proinflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, interleukins.

УДК 616-005.4 + 546.41

А. Майстренко, мол. наук. співроб., Н. Войтенко, д-р мед. наук
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця, НАН України, Київ

ОСОБЛИВОСТІ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ ПРИ ІШЕМІЧНОМУ УРАЖЕННІ НЕРВОВИХ ТКАНИН – НЕЙРОНІВ ГІППОКАМПА

Цей огляд описує особливості роботи систем, що забезпечують гомеостаз кальцію під час ішемічного ураження нейронів гіпокампа. Під час ішемії надлишок внутрішньоклітинного Ca^{2+}, ексайтотоксична активність глутамату та супутнє утворення вільних радикалів являються одними з основних факторів, що сприяють ушкодженню та наступній загибелі нейронів в певних зонах гіпокампу. Розуміння механізмів здатних попередити ушкодження нейронів під час ішемії та запобігти розвитку ураження сьогодні являється ключовим для розробки стратегій нейропротективних пост- та прекондиціонувань.

Ключові слова: SERCA – Ca^{2+}-АТФаза ендопалзматичного ретикулуму, PMCA – Ca^{2+}АТФ-аза плазматичної мембрани, ішемічне ураження, гіпокамп.

Вступ. Оскільки лікарські засоби та терапевтичні методики, що працюють на тваринах та допомагають попереджати розвиток ішемічного ураження у людини викликають побічні ефекти і часто є токсичними сьогодні значну увагу приділяють дослідженню механізмів перебігу ішемічного ураження мозку та пошуку і активації ендогенних нейропротективних стратегій.

Патогенез церебрального ішемічного ушкодження включає багаточисленні процеси, які мають загальний алгоритм як в нейронах гіпокампа, так і в нейронах

© Майстренко А., Войтенко Н., 2015