



УДК 619:636.1:591.478:577.175.1:616-097

А.Б. ЛАЗОРЕНКО, канд. вет. наук, доцент
Сумський національний аграрний університет

В.Й. ІЗДЕПСЬКИЙ, докт. вет. наук, професор
Луганський національний аграрний університет

РОЛЬ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН ТА МОДИФІКОВАНОГО ЦИТРУЛІНОВАНОГО ВІМЕНТИНУ В РОЗВИТКУ ІМУНОЗАЛЕЖНОГО ЗАПАЛЕННЯ СПОЛУЧНОТКАНИННИХ УТВОРЕНЬ КОПИТ У КОНЕЙ

Досліджено вміст фактора некрозу пухлин α та модифікованого цитрулінованого віментину в гомогенатах копитної дерми за гострих пододерматитів, латеральних хрящів і сухожилків глибокого пальцевого згинача за супутніх унгулярних деформацій у коней, розглянуто їхню роль у розвитку імунозалежного запалення сполучнотканинних утворень копит у коней.

Розвиток запальної реакції та регенерації в різні періоди супроводжується зміною типів клітинних взаємодій, адекватність і біологічна доцільність яких на всіх етапах регулюються міжклітинними взаємозв'язками, опосередкованими через синтез різних медіаторів [11]. Істотна роль у регуляції, ініціації та модуляції міжклітинних взаємодій у запальному осередку належить низькомолекулярним короткодистантним білково-пептидним факторам – цитокінам.

Цитокіни класифікують за їх хімічними та біологічними властивостями, а також типами рецепторів, за допомогою яких вони виконують свої біологічні функції [3, 9]. Серед цитокінів виділяють інтерлейкіни, монокіни та лімфокіни залежно від типу клітин, якими вони синтезуються. За впливом на процес запалення цитокіни поділяються на протизапальні та прозапальні цитокіни. Протизапальні цитокіни посилюють гуморальний і пригнічують клітинний імунітет за рахунок сповільнення продукції прозапальних цитокінів, тоді як останні є медіаторами запалення та деструкції тканин, підвищують клітинний і знижують гуморальний імунітет, стимулюють продукцію факторів росту [2, 9].

До основних медіаторів запалення належить фактор некрозу пухлин α (ФНП- α), який продукується макрофагами, моноцитами, кератиноцитами, Т- і В-лімфоцитами, НК-клітинами, нейтрофілами та клітинами ендотелію. Він володіє множинними ефектами на різні типи клітин за рахунок модуляції експресії генів факторів росту, цитокінів, факторів транскрипції, рецепторів клітинної поверхні та гострофазних протеїнів, стимулює катаболізм, активує синтез лізосомальних протеїназ і дегрануляцію нейтрофілів, пригнічує активність фібробластів щодо синтезу колагену, чинить прокоагуляційний та цитотоксичний вплив [7, 8, 11].

Є повідомлення про здатність ФНП- α індукувати процес апоптозу імунокомпетентних клітин, клітин сполучної тканини, а також циркулюючих й ексудативних нейтрофілів через активацію клітинних каспаз, які руйнують внутрішньоклітинні компоненти [5, 15], та ініціювати розвиток імунозалежного запалення й автоімунних захворювань через продукцію автоантитіл до структурних компонентів клітин, що зазнали апоптозу [12, 13].

Під час апоптозу макрофагів і фібробластів індукованою ФНП- α відбувається модифікація (цитрулінування) проміжного білка філаментів цитоскелету – віментину. Модифікований цитрулінований віментин (МЦВ) набуває антигенних властивостей та починає специфічно розпізнаватися антитілами, чим пролонгує розвиток запальної реакції. Цитрулінування, або дезамінування, віментину тісно пов'язано із апоптозом і є ферментативним процесом дезамінування пептидиларгініну за допомогою ферменту пептидиларгініндезамінази з перетворенням аргініну в цитрулін. Дезамінування модифікує структуру віментину та призводить до зростання можливих епітопів-мішеней автоантитіл [1, 6, 14, 16].

Роль ФНП- α у виникненні й формуванні цитокин-індукованих імунозалежних запальних процесів достовірно підтверджено в літературі, проте не знайдено джерел, які б містили дані щодо ролі ФНП- α та МЦВ у розвитку і пролонгації асептичної запальної реакції у сполучнотканинних утвореннях копит у коней.



© А.Б. Лазоренко, В.Й. Іздепський, 2012

Мета роботи – визначити концентрацію фактора некрозу пухлин α та антитіл до модифікованого цитрулінованого віментину в гомогенатах копитної дерми за пододерматитів, латеральних хрящів і сухожилків глибокого пальцевого згинача за супутніх унгулярних деформацій у коней.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Вивчали фрагменти основи шкіри стінок та підшви копит коней української верхової та російської рисистої порід, а також безпородних з копитами анатомічно правильної форми, без ортопедичної патології ($n=12$), із гострими асептичними пододерматитами ($n=10$) та хронічними ламінітами ($n=8$). Фрагменти латеральних хрящів і сухожилків глибокого пальцевого згинача відбирали з копит анатомічно правильної форми ($n=12$), а також за наявних унгулярних деформацій – їжакове, пласке та повне копито ($n=10$). Слід зазначити, що всі наведені вище деформації копит супроводжувалися асептичними запальними процесами в дермі стінок і підшви, а в деяких випадках – із порушенням дермо-епідермального з'єднання.

Зразки основи шкіри, хрящової та сухожилкової тканин (1–5 г), що відбирали після забою тварин, відмивали у фізіологічному розчині й піддавали кріоконсервації у пластикових мікропробірках за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. У день визначення концентрації ФНП- α та МЦВ у тканині зразки гомогенізували на холоді у PBS буфері (рН 7,4), що містив 1% розчин тритону X-100 у співвідношенні 1 : 40, і залишали за температури $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 2 год [10].

Надалі гомогенат тканин центрифугували за 3000 об./хв протягом 15 хв. Вміст автоантитіл до МЦВ у тканинних гомогенатах визначали за методом твердофазного імуноферментного аналізу ELISA із використанням тест-системи Anti-MCV ORG 548 (Orgentec, Німеччина), а концентрацію ФНП- α – за допомогою тест-системи Peninsula Laboratories Inc. (США). Фактичний вміст автоантитіл до МЦВ та рівня ФНП- α у зразках тканинних гомогенатів розраховували з урахуванням співвідношення тканина – PBS буфер. Отриманий цифро-

вий матеріал обробляли методами варіаційної статистики з використанням параметричного t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших попередніх дослідженнях [4] було з'ясовано, що розвиток асептичних пододерматитів у коней супроводжується значним зниженням у копитній дермі концентрації глікопротеїнів, глікозаміногліканів та їхніх сульфатованих форм – хондроїтинсульфатів за одночасного збільшення вмісту серомукоїдів, хлорнорозчинних глікопротеїнів, сіалових кислот, імуноглобулінів і сечової кислоти, що пов'язано із посиленням розпадом цих білково-вуглеводних компонентів сполучнотканинного матриксу під впливом лізосомальних протеаз.

Розвиток гострих асептичних пододерматитів у коней характеризується істотною експресією ФНП- α у копитній дермі (рис. 1). Концентрація цього прозапального цитокіну в тканинних гомогенатах основи шкіри за гострого запалення зростає у 3,6 разу – з ($274,17\pm 30,50$) до ($988,80\pm 91,76$) пг/мл ($P < 0,001$) порівняно з показником інтактних тварин. За хронічного ламініту рівень ФНП- α в основі шкіри ($673,0\pm 62,33$) пг/мл був майже у 1,5 разу нижчим порівняно з таким у коней із гострим запаленням ($P < 0,01$), проте у 2,5 разу вищим, ніж у клінічно здорових ($P < 0,001$).

Експресія ФНП- α в основі шкіри за гострої асептичної запальної реакції свідчить про істотні деструктивні процеси в сполучнотканинному матриксі копитної дерми. Слід зазначити, що навіть за хронічного запалення без виражених клінічних ознак концентрація цього медіатора тканинної деструкції і, відповідно, його локальний синтез клітинами запального осередку залишається на досить високому рівні, що засвідчує розвиток глибоких процесів дезорганізації матриксу основи шкіри за хронічного перебігу ламініту. Ініціація та пролонгація запального процесу під впливом ФНП- α в копитній дермі за хронічного ламініту істотно поглиблюється модулюванням запальної реакції за імунозалежним типом.



Рис. 1. Концентрація ФНП- α у гомогенаті копитної дерми коней

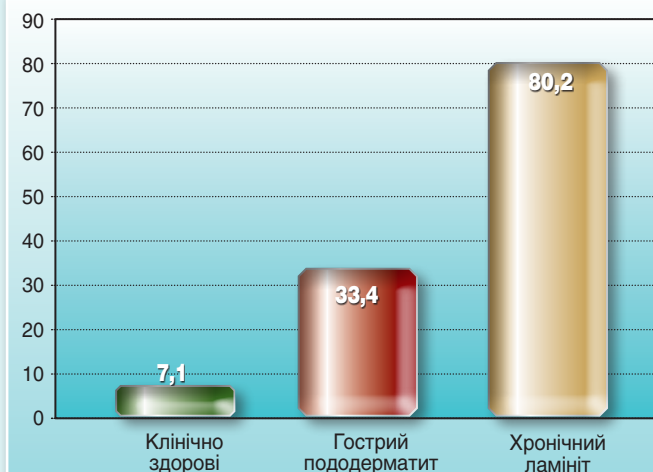


Рис. 2. Вміст антитіл до МЦВ у гомогенаті копитної дерми коней

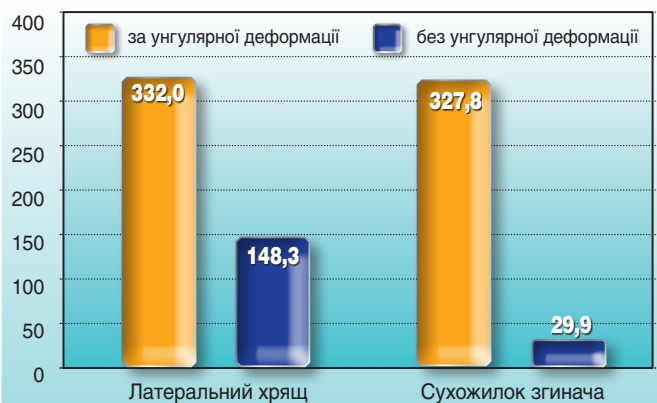


Рис. 3. Концентрація ФНП-α у гомогенаті сухожилків глибокого згинача та латеральних хрящів коней

ФНП-α є не лише плейотропним прозапальним медіатором, а й може ініціювати апоптоз клітин-ефекторів запального процесу. Під час апоптозу макрофагів та фібробластів індукованого ФНП-α відбувається модифікація (цитрулінування) проміжного білка філаментів цитоскелету – віментину, який набуває антигенних властивостей і утилізується специфічними антицитруліновими антитілами [1, 5].

За хронічного ламініту в коней спостерігають ініціацію локального апоптозу клітин копитної дерми за тривалого пресингу ФНП-α та, як наслідок, інтенсифікацію процесів цитрулінування віментину з накопиченням антитіл до МЦВ у гомогенатах основи шкіри (рис. 2).

Зокрема, рівень автоантитіл до МЦВ за хронічного ламініту в гомогенаті копитної дерми порівняно із інтактними тваринами зростає у 11,3 разу – з $(7,07 \pm 0,76)$ до $(80,20 \pm 10,15)$ МО/мл ($P < 0,001$). За гострого перебігу пододерматиту вміст автоантитіл до МЦВ також збільшується порівняно з клінічно здоровими майже у 4,7 разу ($P < 0,001$) – до $(33,40 \pm 2,71)$ МО/мл, проте залишається нижчим, ніж у тварин із хронічним ламінітом у 2,4 разу ($P < 0,001$).

Таким чином, за хронічного ламініту спостерігають пролонгацію експресії ФНП-α та локальний пресинг копитної дерми, що супроводжується накопиченням у запальному осередку маркерів апоптозу макрофагів і фібробластів – МЦВ й автоантитіл до нього. Це пролонгує запальну реакцію і модулює її за імунозалежним типом.

Дослідження вмісту ФНП-α у гомогенатах сухожилків глибокого пальцевого згинача та латеральних хрящів за унгулярних деформацій (рис. 3) свідчить, що рівень цього маркера тканинної деструкції значно збільшується в обох сполучнотканинних утвореннях. Зокрема, концентрація ФНП-α у гомогенатах сухожилків за копитної деформації порівняно з клінічно здоровими тваринами зростає майже у 12,5 разу – з $(29,92 \pm 2,92)$ до $(372,80 \pm 7,22)$ пг/мл ($P < 0,001$). Водночас у латеральному хрящі за копитної деформації рівень ФНП-α зростає відносно показника інтактних тварин у 2,2 разу – зі $(148,33 \pm 17,01)$ до $(332,00 \pm 7,11)$ пг/мл ($P < 0,001$). Зростання концентрації ФНП-α у гомогенатах сухожилків глибокого пальцевого згинача та латеральних хрящів у разі унгулярних деформацій свідчить про



Рис. 4. Вміст антитіл до МЦВ у гомогенаті сухожилків глибокого згинача та латеральних хрящів коней

його локальну гіперпродукцію і, вочевидь, про розвиток запально-деструктивних змін у сухожилковій і хрящовій тканинах.

Експресія ФНП-α у сухожилку глибокого згинача пальця та латеральних хрящах за унгулярних деформацій у коней ініціює пролонгацію запально-деструктивних процесів через індукцію апоптозу і, відповідно, модифікацію віментину, що супроводжується накопиченням у запальному осередку антитіл до МЦВ (рис. 4).

Рівень антитіл до МЦВ у гомогенаті сухожилкової тканини за копитної деформації був підвищеним порівняно із клінічно здоровими кінцями майже у 3,6 разу і становив відповідно $(17,44 \pm 2,56)$ та $(4,87 \pm 0,24)$ МО/мл ($P < 0,001$), а в хрящовій тканині – у 6,1 разу (відповідно $(90,72 \pm 14,99)$ і $(11,73 \pm 1,90)$ МО/мл; $P < 0,001$).

Отже, розвиток унгулярної деформації у коней характеризується зростанням концентрації автоантитіл до МЦВ у тканині сухожилка глибоких пальцевих згиначів та латеральних хрящів, що є ознакою субклінічного перебігу імунозалежної запальної реакції.

ВИСНОВКИ

1. Експресія фактора некрозу пухлин α в основі шкіри за гострої асептичної запальної реакції свідчить про істотні деструктивні процеси у сполучнотканинному матриксі копитної дерми, тоді як у разі хронічного запалення без виражених клінічних ознак концентрація цього цитокіну і його локальний синтез клітинами запального осередку залишаються на досить високому рівні, що є ознакою глибоких процесів дезорганізації матриксу основи шкіри.

2. За хронічного ламініту в коней спостерігають локальний апоптоз клітин копитної дерми за тривалого пресингу фактора некрозу пухлин α та, як наслідок, ініціацію процесів цитрулінування віментину з накопиченням антитіл до модифікованого цитрулінованого віментину в основі шкіри.

3. Зростання концентрації фактора некрозу пухлин α у гомогенатах сухожилків глибокого пальцевого згинача та латеральних хрящів за унгулярних деформацій засвідчує його локальну гіперпродукцію і розвиток запально-деструктивних змін у сухожилковій та хрящовій тканинах.



4. Розвиток унгулярної деформації в коней характеризується зростанням рівня автоантитіл до модифікованого цитрулінованого виментину в тканині сухожилків глибоких пальцевих згиначів і латеральних хрящів, що свідчить про субклінічний перебіг імунозалежної запальної реакції.

Перспективою подальших досліджень є вивчення ролі автоантитіл до інших структурних компонентів клітин сполучної тканини за ортопедичної патології у коней з метою розв'язання питань вибору та обґрунтування методів лікування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Гринь В.К.** Антицитрулиновые антитела и их роль в диагностике и клинике ревматоидного артрита / В.К. Гринь, А.М. Гнилырыбов, Т.П. Хрещачакова // Журн. АМН України. – 2004. – Т. 10. – № 3. – С. 475–483.
2. **Ершов Ф.И.** Цитокины – новое поколение биотерапевтических препаратов / Ф.И. Ершов // Вест. Рос. АМН. – 2006. – № 9–10. – С. 45–50.
3. **Кноринг Г.Ю.** Цитокиновая сеть как мишень системной энзимотерапии / Г.Ю. Кноринг // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 4. – С. 45–49.
4. **Лазоренко А.Б.** Зміни вмісту білково-вуглеводних сполук у основі шкіри копит коней за асептичних пододерматитів / А.Б. Лазоренко // Наук. вісник Білоцерк. націон. аграр. ун-ту. – 2010. – Вип. 4 (76). – С. 64–67.
5. **Маянский Н.А.** Апоптоз экссудативных нейтрофилов человека / Н.А. Маянский, М.И. Заславская, А.Н. Маянский // Иммунология. – 2000. – № 2. – С. 11–13.
6. **Минин А.А.** Виментиновые промежуточные филаменты и их роль во внутриклеточном распределении органелл / А.А. Минин, М.В. Молдавер // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 221–252.
7. **Нестерова И.В.** Цитокиновая регуляция и функционирующая система нейтрофильных гранулоцитов / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова // Гематология и трансфузиология. – 1999. – Т. 44. – № 2. – С. 43–51.
8. **Серебренникова С.Н.** Влияние цитокинов на клетки очага воспаления / С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, Н.В. Семенов // Сб. научн. трудов «Проблемы и перспективы современной науки». – Томск, 2009. – Т. 2. – № 1. – С. 20–22.
9. **Симбирцев А.С.** Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3. – № 2. – С. 16–22.
10. **Токмакова А.Ю.** Особенности хронических ран у больных сахарным диабетом и пути их коррекции / А.Ю. Токмакова, Г.Ю. Страхова, М.И. Арбузова // Эндокринная хирургия. – 2007. – № 1 (1). – С. 38–42.
11. **Шубич М.Г.** Медиаторные аспекты воспалительного процесса / М.Г. Шубич, М.Г. Авдеева // Архив патологии. – 1997. – № 2. – С. 3–8.
12. **Deband M.** Anti-TNF-alpha-induced systemic lupus syndrome / M. Deband, O. Vittecoq, V. Descamps // Clin. Rheumatol. – 2003. – Vol. 22. – № 1. – P. 56–61.
13. **Maggd R.A.** Tumor necrosis factor alpha in systemic lupus erythematosus and anti-DNA autoantibody production // Lupus. – 2002. – Vol. 11. – № 12. – P. 850–855.
14. **Mor-Vaknin N.** Vimentin is secreted by activated macrophages / N. Mor-Vaknin, A. Punturieri, K. Sitwala, D. Markovitz // Nat. Cell. Biology. – 2003. – Vol. 5. – P. 59–63.

15. **Strasser A.** Apoptosis signaling / A. Strasser, L. O'Connor, V. Dixit // Ann. Rev. Biochem. – 2000. – Vol. 69. – P. 217–245.
16. **Venrooky W.J.** Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis / W.J. Venrooky, J.M. Hazes, H.I. Visser // J. Med. – 2002. – Vol. 60. – № 10. – P. 383–388.

Одержано 24.05.2012

Роль фактора некроза опухолей и модифицированного цитрулинизированного виментина в развитии иммунозависимого воспаления соединительнотканых образований копыт у лошадей. А.Б. Лазоренко, В.И. Издепский

Установлено, что экспрессия фактора некроза опухоли α (ФНО- α) в основе кожи при острой асептической воспалительной реакции отражает существенные деструктивные процессы в соединительнотканном матриксе копытной дермы. При хроническом воспалении без выраженных клинических признаков концентрация данного цитокина и его локальный синтез клетками воспалительного очага остаются на достаточно высоком уровне, что свидетельствует о глубоких процессах дезорганизации матрикса основы кожи. При хроническом ламините у лошадей наблюдают инициацию локального апоптоза клеток копытной дермы в результате длительного прессинга ФНО- α и, как следствие, инициацию процессов цитрулинизирования виментина с накоплением антител к модифицированному цитрулинизированному виментину (МЦВ) в основе кожи. Увеличение концентрации ФНО- α в гомогенатах сухожилий глубокого пальцевого сгибателя и латеральных хрящей при унгулярных деформациях свидетельствует о его локальной гиперпродукции и развитии воспалительно-деструктивных изменений в сухожильных и хрящевой тканях. Развитие унгулярной деформации у лошадей характеризуется увеличением уровня автоантител к МЦВ в тканях сухожилий глубоких пальцевых сгибателей и латеральных хрящей, что свидетельствует о наличии субклинического течения иммунозависимой воспалительной реакции.

Tumor necrosis factor and the modified citrullinated vimentin in developing immunodependent inflammation of connective tissue formations of the horses' hoofs. A.B. Lazorenko, V.I. Izdepskyi

It was established that the expression of TNF- α at the base of the skin with acute aseptic inflammatory reaction evidenced by the significant destructive processes in the connective matrix of the heel of the dermis, whereas in the case of chronic inflammation without marked clinical signs, the concentration of this mediator of tissue destruction and, accordingly, its local synthesis by cells of the inflammatory focus remains at a fairly high level, indicating a profound process of disorganization of the matrix framework of the skin with chronic laminitis. In chronic laminitis in horses there is initiation of a local cell apoptosis hoof dermis with prolonged pressure TNF- α and as a consequence, the initiation process citrullinated vimentin with the accumulation of antibodies to MCV at the heart of the skin. Increased concentrations of TNF- α in homogenates of the deep finger flexor tendon and the lateral cartilage in unguular strains indicates that its local hyperproduction and the development of inflammatory and destructive changes in tendon and cartilage. Development unguular strain in horses is characterized by increased levels of antibodies to MCV in the tissues of the finger flexor tendons of the deep and lateral cartilage, which suggests the presence of subclinical flow immunodependent inflammatory response. ☉