

## Иммуноферментный и морфологический анализ печени на ранней стадии синдрома длительного раздавливания

К.Т.Саакян, А.В. Азнаурян, С.А.Авакян, А.В. Зильфян

ЕрГМУ им. М. Гераци, кафедра гистологии и НИЦ

375025 Ереван, Корюна, 2

**Ключевые слова:** синдром длительного раздавливания, органы-мишени, печень, цитокины, иммунопатологические расстройства

Как известно, при синдроме длительного раздавливания (СДР) печень рассматривается в качестве органа-мишени [1]. В то же время по сей день неизученными остаются механизмы возникающих в печени катаболических процессов. Не исключено, что эти процессы протекают на фоне развивающихся при краш-синдроме общих и местных иммунопатологических реакций. В указанном плане весьма перспективным представляется изучение медиаторного звена иммунитета с учетом структурных изменений в печени, возникающих на конкретных этапах течения СДР.

Необходимость проведения подобных исследований продиктована и тем обстоятельством, что органы желудочно-кишечного тракта, помимо иммунной, сердечно-сосудистой, центральной и половой систем, в условиях физиологической деятельности организма выступают в качестве возможного источника синтеза иммуноцитоккинов [2]. Более того, в качестве источника синтеза ИЛ-1, ИЛ-6 рассматриваются также и купферовские клетки. Учитывая токсические эффекты многих провоспалительных иммуноцитоккинов, основанные на принципах их короткодистантного спектра действия, и характер иммунопатологических расстройств в органах иммуногенеза при СДР, весьма целесообразным представляется определение роли иммуноцитоккинов в патогенезе возникающего в печени патологического процесса.

### Материал и методы

Опыты ставились на 42 белых половозрелых мышах массой 50–60 г. Животные подразделялись на 3 группы. Контрольной группой служили интактные мыши. Животные I опытной группы забивались через 24 ч, а животные II опытной группы – на 7-е сутки после декомпрессии. На специальной установке жи-

вотные обеих опытных групп подвергались сдавливанию в течение 1 ч. Площадь поражения занимала внутреннюю поверхность бедра и составляла 7 см<sup>2</sup>. На указанную площадь оказывалось давление силой 280 кПа.

Морфологическому анализу подвергалась ткань печени во всех исследуемых группах. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином.

Методами иммуноферментного и радиоиммунного анализа в сыворотке крови и супернатантах, приготовленных из гомогенизированных тканей печени и тимуса, определялось содержание пролактина, инсулиноподобного фактора роста (ИФР-1),  $\gamma$ -интерферона ( $\gamma$ -ИФН), ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6.

При постановке реакций ткани печени, тимуса предварительно подвергались кислотной реакции в 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (по 2 мл на пробу) в течение 15 мин на холоде (+4°C) с последующей гомогенизацией проб и центрифугированием гомогенатов (при 15000 g в течение 15 мин при +6°C). Супернатанты из сыворотки крови до определения хранились при -40°C.

Определение вышеупомянутых цитокинов осуществляли при помощи соответствующих кит-наборов производства фирмы DRG-International (США-Германия), а пролактина – с применением реагентов фирмы Syntroph Bioresearch Inc. (Чехословакия) на автоматическом спектрофотометре Stat-Fax 303 plus (США) в диапазоне спектра поглощения 420–450 нм. Содержание иммуноцитоккинов выражалось в пг/мл, пролактина – в нг/мл.

ИФР-1 определяли на радиоизотопном счетчике "Тамма" (Россия-Украина) при помощи кит-набора IGF-1y<sup>125</sup> фирмы Amersham Biotech (США).

Радиоизотопная активность выражалась в имп/мин. Определяемые показатели были обратно пропорциональны концентрации ИФР-1, то есть высокая активность соответствовала низким концентрациям гор-

Сдвиги в содержании иммуноцитоккинов и пролактина  
в печени, тимусе и сыворотке крови мышей на ранних этапах течения СДР

| Объект исследования | Контроль     | 24 часа                                 | 7 дней                     |
|---------------------|--------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| ИЛ-1, пг/мл         |              |                                         |                            |
| Сыворотка           | 2,4±1,1      | 3,1±0,5<br>p>0,5                        | 1,3±0,8<br>p>0,5           |
| Печень              | 146,0±2,3    | 42,3±6,6<br>p<0,001                     | 234,6±17,6<br>p<0,001      |
| Тимус               | 131,2±16,4   | 30,8±6,3<br>p<0,001                     | 14,8±3,5<br>p<0,001        |
| ИЛ-2, пг/мл         |              |                                         |                            |
| Сыворотка           | 232,0±17,5   | 489,6±31,4<br>p<0,001                   | 951±48,1<br>p<0,001        |
| Печень              | 399,0±20,5   | 600,6±37,9<br>p<0,001                   | 3763±18,7<br>p<0,001       |
| Тимус               | 6543,0±67,4  | 1981,0±42,6<br>p<0,001                  | 1173,7±48,6<br>p<0,001     |
| ИЛ-6, пг/мл         |              |                                         |                            |
| Сыворотка           | 1661,0±124,3 | 290,6±36,7<br>p<0,001                   | 292,0±28,3<br>p<0,001      |
| Печень              | 415,9±24,3   | 248,8±13,7<br>p<0,001                   | 404,5±15,8<br>p>0,5        |
| Тимус               | 1013,0±37,5  | 85,5±7,9<br>p<0,001                     | 433,7±48,3<br>p<0,001      |
| γ-ИФН, пг/мл        |              |                                         |                            |
| Сыворотка           | 6,4 ± 0,5    | 0,2 ± 0,03<br>p<0,001                   | 3,3 ± 0,5<br>p<0,001       |
| Печень              | 0,8 ± 0,07   | не определяется<br>5,4 ± 0,9<br>p<0,001 | 2,8 ± 0,5<br>p<0,001       |
| Тимус               | 16,2 ± 1,6   |                                         | 10,8 ± 0,4<br>0,01>p>0,002 |
| Пролактин, нг/л     |              |                                         |                            |
| Сыворотка           | 5,3±1,2      | 1,9±0,4<br>0,02>p>0,01                  | 0,8±1,3<br>p=0,02          |
| Печень              | 2,5±0,6      | 1,3±0,4<br>p>0,5                        | 6,9±1,2<br>0,01>p>0,002    |
| Тимус               | 0,1±0,001    | 2,3±0,5<br>p<0,001                      | 0,7±0,007<br>p<0,001       |
| ИФР-1               |              |                                         |                            |
| Сыворотка           | 318,2±24,5   | 440,4±26,1<br>p<0,001                   | 307,6±26,9<br>p>0,5        |
| Печень              | 319,1±20,4   | 441,4±31,3<br>0,01>p>0,002              | 403,9±32,9<br>0,05>p>0,02  |
| Тимус               | 336,3±16,4   | 423,5±20,7<br>0,01>p>0,002              | 375,2±24,8<br>p>0,5        |

мона, и наоборот.

Статистический анализ проводился с использованием критериев Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Как показали результаты иммуноферментного анализа на предмет определения содержания цитокинов, в печени мышей, подвергнутых компрессии, на различных этапах патологического процесса наблюдаются существенные сдвиги в содержании ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6 (таблица). Сдвиги носили разнонаправленный характер, что, по-видимому, было обусловлено одно-временным течением катаболических и анаболических реакций, характеризующих общую направленность патологического процесса в печени.

Наиболее существенные сдвиги наблюдались со стороны ИЛ-2. Через 24 ч после декомпрессии в печени происходило повышение его содержания в 1,6 раза, а через 7 дней уровень ИЛ-2 превышал аналогичный показатель I опытной группы в 6 раз и контрольной – почти в 10 раз. У мышей I опытной группы в печени определялись лишь следовые количества ИЛ-1, в то время как на 7-е сутки эксперимента (II опытная группа) выявлялись весьма высокие показатели медиатора, уровень которого более чем в 1,6 раза превышал контрольный. Сдвиги в содержании ИЛ-6 характеризовались на протяжении раннего периода краш-синдрома тенденцией, направленной в сторону нормализации. Так, если через 24 ч после декомпрессии содержание ИЛ-6 заметно снижалось (почти в 1,7 раза), то на 7-е сутки течения патологического процесса уровень указанного медиатора практически не отличался от такового в контроле.

Результаты иммуноферментного анализа у контрольных животных и мышей I опытной группы не выявили наличия  $\gamma$ -ИФН в печени, и лишь на 7-й день удалось определить его наличие (2,8 пг/мл). Следует особо отметить, что на протяжении всего эксперимента четко прослеживается обратная корреляционная зависимость между процессами синтеза ИЛ-1, ИЛ-2 в печени и тимусе. Наиболее рельефно эта зависимость наблюдается на 7-е сутки течения краш-синдрома, когда уровень ИЛ-1 в тимусе не определялся (в контроле 131,2 пг/мл), в печени же его содержание, как было указано выше, повышалось почти в 1,6 раза. На 7-е сутки течения патологического процесса содержание ИЛ-1 в тимусе снизилось по сравнению с контрольным уровнем почти в 5 раз, в то время как в печени уже через 24 ч содержание указанного медиатора продолжало возрастать. На 7-е сутки краш-синдрома определялись наиболее высокие показатели ИЛ-1 в печени, превосходящие контрольный уровень почти в 10 раз.

Следующим этапом наших исследований явилось

определение в сыворотке крови и внутренних органах ИФР-1 и пролактина. Необходимость проведения подобных исследований на начальных этапах течения краш-синдрома продиктована следующим обстоятельством. ИФР-1 и пролактин в настоящее время рассматриваются, наряду с гормоном роста (соматотропином), в качестве модуляторов процессов дифференциации и активации клеток иммунной системы [3, 4]. При ряде патологических состояний (хроническая сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, бронхиальная астма, острые инфекционные гепатиты) указанные гормоны аденогипофиза выступают в качестве факторов, обеспечивающих в конечном итоге процессы ремоделирования в миокарде, печени и легких, тем самым определяя новый уровень функционирования указанных органов в экстремальных условиях.

Необходимо отметить, что синтез всех трех гормонов в аденогипофизе во многом обусловлен стимулирующим влиянием на секреторные клетки аденогипофиза ИЛ-1, ИЛ-6 и  $\gamma$ -ИФН [4, 5]. Таким образом, ИФР-1, пролактин и гормон роста включаются в общепатологическое звено процесса ремоделирования, причем иммуноцитокнины выступают в качестве определяющего фактора на ранних этапах его формирования – путем их прямого действия на клетки-мишени и активации в гипофизе всех 3 гормонов роста, а указанные гипофизарные гормоны обеспечивают конечный эффект в процессе ремоделирования ряда паренхиматозных органов [6]. Более того, при стрессах различного генеза эффект пролактина потенцируется в результате местной активации ИФР-1.

В этой связи немаловажный интерес, на наш взгляд, представляют результаты иммуноферментного анализа на предмет определения пролактина и ИФР-1 в печени (таблица).

Так, через 24 ч после декомпрессии уровень пролактина по сравнению с контрольным снижался почти в 2 раза. Однако на 7-е сутки течения СДР определялись довольно высокие показатели данного гормона, которые превышали контрольный уровень в 2,7 раза.

В то же время на всем протяжении эксперимента в тимусе определялись значительно высокие показатели пролактина. Так, через 24 ч после декомпрессии уровень пролактина возрастал по сравнению с контрольной группой в 23 раза, а на 7-е сутки его содержание несколько снижалось, но превышало контрольный уровень в 7 раз! Следует особо отметить, что в сыворотке крови животных, подвергнутых компрессии, в относительно ранний период течения СДР определялись весьма низкие показатели пролактина. Так, уровень указанного нейrogормона через 24 ч снижался по сравнению с контролем в 2,8 раза, а на 7 сутки – в 6,6 раза.

Как показали результаты радиоиммунного анализа

на предмет определения ИФР-1, через 24 ч после декомпрессии в тимусе и печени имело место значительное понижение уровня указанного нейrogормона. Так, в печени содержание ИФР-1 снижалось по сравнению с контролем в 1,4 раза, а в тимусе – в 1,25 раза. Содержание ИФР-1 в печени и тимусе в указанный период течения СДР коррелировало с его содержанием в сыворотке крови: уровень ИФР в сыворотке крови на 24-е сутки эксперимента снижался по сравнению с контролем в 1,4 раза. Следует отметить, что на 7-е сутки наблюдения уровень ИФР-1 в тимусе и в сыворотке крови нормализовался, однако в печени его содержание было ниже контрольного уровня почти в 1,3 раза.

Таким образом, в относительно ранний период течения СДР (24-е сутки эксперимента) в печени происходило значительное понижение уровня указанных нейrogормонов, что коррелировало с низкими показателями указанных нейrogормонов в сыворотке крови. Заслуживает внимания и то обстоятельство, что на 7-е сутки течения СДР в тимусе продолжали определяться высокие концентрации пролактина, а уровень ИФР-1 нормализовался. Одновременно происходила нормализация уровня ИФР-1 в сыворотке крови, в то время как содержание в ней пролактина резко снижалось (в 6,6 раза).

Как известно, ИЛ-1 и ИЛ-6 при экстремальных ситуациях в случае их повышенного синтеза органами иммуногенеза стимулируют в печени выработку протеинов острой фазы, которые, в свою очередь, обуславливают активацию многочисленных катаболических процессов в организме, в том числе и пролонгированный пирогенный эффект. Так, высокий уровень ИЛ-1 в печени на 7-е сутки эксперимента может индуцировать выработку таких мощных провоспалительных факторов, каковыми являются синтезируемые гепатоцитами белки острой фазы. Низкий уровень ИЛ-6 через 24 ч после декомпрессии и нормализация данного показателя на 7-е сутки эксперимента скорее всего свидетельствуют о становлении на данном этапе течения краш-синдрома репаративно-пролиферативных процессов.

Дискутабельным представляется основной источник синтеза ИЛ-1 и ИЛ-2, в результате чего их содержание в печени на 7-е сутки резко повышалось. В то же время, как показали результаты иммуноферментного анализа, в тимусе экспериментальных животных содержание ИЛ-2 по сравнению с контролем резко снижалось, а ИЛ-1 и вовсе не определялся. Поэтому можно предположить, что на конкретном этапе течения СДР тимус не следует рассматривать в качестве возможного источника поступления в печень вышеуказанных цитокинов.

Основываясь на установленном факте местного синтеза в печени ИЛ-1 и ИЛ-6 купферовскими клетками, можно предположить, что на относительно ранних

этапах краш-синдрома происходит активация в печени клеток моноцитарно-фагоцитирующей системы, обеспечивающей направленный синтез, в данном конкретном случае – ИЛ-1 и ИЛ-6.

Относительно низкий уровень ИЛ-2 в тимусе экспериментальных животных и его высокий уровень в сыворотке крови позволяют, с одной стороны, свести до минимума тимический источник синтеза указанного медиатора, с другой, – допускают его нетимусное происхождение. Не исключено, что в отличие от тимуса синтез ИЛ-2 осуществляется лимфоцитами, которые в экстремальных условиях мигрируют из крови во внутренние органы и участвуют в формировании лимфоклеточных инфильтратов, напоминающих фолликулоподобные структуры лимфоидной ткани органов иммуногенеза [7]. В пользу выдвинутого предположения свидетельствуют полученные нами результаты морфологического анализа печени, которые позволили на конкретном этапе течения СДР выявить аналогичный иммунопатологический компонент не только в легких [7], но и в печени.

В печени подопытных мышей, забитых сразу после декомпрессии, весьма четко прослеживаются признаки дискомплексации печеночных балок. Радиальная ориентация гепатоцитов сохранена лишь в отдельных печеночных дольках, однако в указанных дольках радиальные тяжи гепатоцитов весьма рыхло прилегают друг к другу в силу резкого расширения межбалочных синусоидных капилляров. Заметно расширенным выглядит просвет центральных вен. Повсеместно во всех «сохранившихся» печеночных дольках прослеживаются процессы белково-липидной дистрофии (рис. а). Дистрофические изменения не характеризуются четкой локализацией в конкретных зонах печеночных долек, то есть наблюдаются как в центральных участках вокруг *v. centralis*, так и в промежуточных периферических зонах. Во всех составных компонентах микроциркуляторного русла (центральные вены, межбалочные капилляры, артериолы и венулы триады) обнаруживались признаки дистрофии эндотелиоцитов, плазморрагии, умеренного периваскулярного отека.

Следует отметить, что на территории сохранившихся гепатоцитов и в дистрофических участках выявлялись единичные лимфоциты. Наличие указанных лимфоцитов в печеночной ткани у мышей, подвергнутых декомпрессии сразу после 1-часовой экспозиции, в данном конкретном случае не представляется возможным трактовать с иммунопатологическими позициями, поскольку аналогичные скопления лимфоцитов обнаруживались нами и в печени мышей контрольной группы.

Через 2 ч после декомпрессии, в отличие от предыдущего срока, на фоне белково-липидной дистрофии выявлен структурный компонент иммунопатологических реакций, проявляющийся наличием обильных

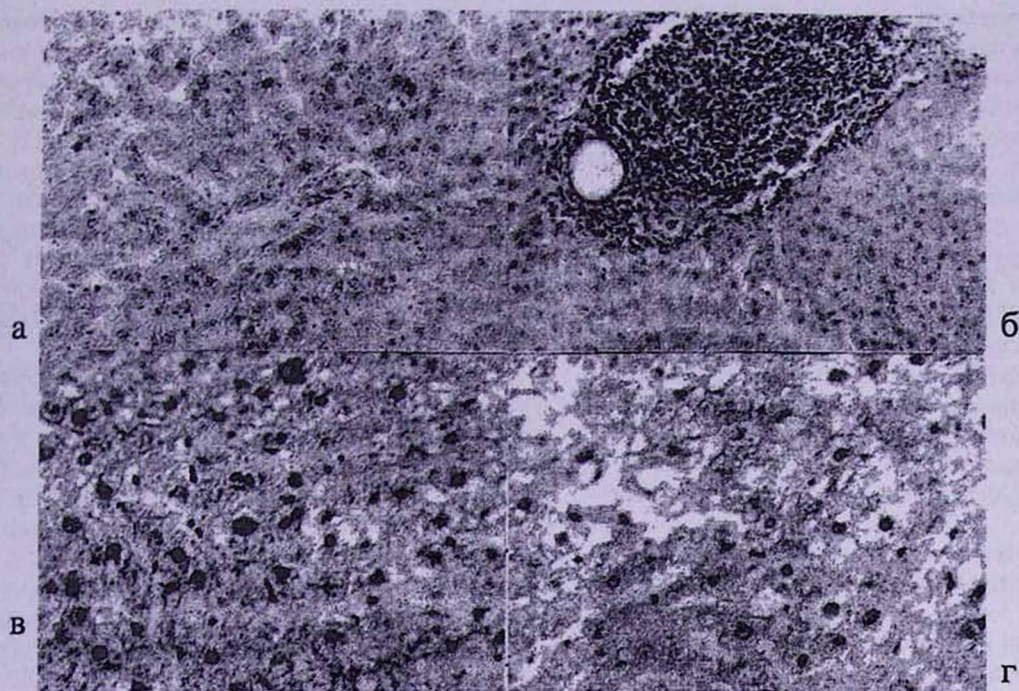


Рис. Структурные сдвиги в печени на ранних этапах течения СДР. Окраска гематоксилин-эозином.

- а) Процессы дисконфлексии и дистрофии гепатоцитов. Расширение просвета центральной вены и межбалочных синусоидных капилляров. Сразу после 1-часовой компрессии. Об. 20, ок. 10. -  
 б) Обильная периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация по типу формирования лимфоидных фолликулов. Через 2 ч после 1-часовой компрессии. Об. 20, ок. 10.  
 в, г) Процесс диффузной липоидной дистрофии гепатоцитов с характерной локализацией малых лимфоцитов в участках дистрофически измененных паренхиматозных клеток: в) через 24 ч; г) через 7 суток после 1-часовой компрессии. Об. 40, ок. 10.

периваскулярных лимфоцитарных инфильтратов по типу формирования микроструктур, напоминающих фолликулы селезенки и лимфоузлов (рис. б).

Умеренная лимфоцитарная инфильтрация была зарегистрирована в периваскулярных и перидуктальных отделах вокруг микрососудов триад. Наличие отдельных малых лимфоцитов в участках дистрофии и микронекроза печеночной ткани наряду с вышеописанными изменениями свидетельствует в пользу заинтересованности местных иммунопатологических реакций в процессах дистрофии и деструкции паренхиматозных и стромальных клеток печени.

Через 24 ч после декомпрессии наблюдались процессы белково-липидной дистрофии гепатоцитов с наличием очагов микронекроза (рис. в). Следует отметить, что на данном этапе течения СДР лимфоцитарных инфильтратов, напоминающих фолликулы селезенки, в печени обнаружить не удалось.

На 7-е сутки эксперимента наблюдалась картина, аналогичная таковой через 24 ч после декомпрессии (рис. г). Как и во все изучаемые сроки, отсутствовали

морфологические критерии, свидетельствующие в пользу активации репаративно-пролиферативных процессов.

В настоящее время считается установленным, что гипоталамический пролактин стимулирует ИЛ-6 в купферовских клетках печени [8]. На основе данного факта нами установлена прямая корреляционная зависимость между уровнями пролактина, ИФР-1 и ИЛ-6 в печени. Так, через 24 ч в печени имело место заметное понижение как пролактина и ИФР-1, так и ИЛ-6. Одновременно не исключено, что высокие концентрации пролактина в печени на 7-е сутки течения краш-синдрома оказывали стимулирующее действие на купферовские клетки печени, обеспечивая синтез ИЛ-6 в "физиологических" для печени концентрациях.

Анализируя полученные данные, можно прийти к заключению, что на ранних этапах течения СДР в печени происходят сдвиги в содержании иммуноцитокinov, пролактина и ИФР-1, которые в совокупности с результатами морфологического анализа позволяют определить характер и особенности течения регио-

нального патологического процесса. Полученные результаты проведенных комплексных исследований позволяют с качественно новых позиций рассматривать роль конкретных представителей класса цитокинов в индукции патологического процесса и формировании адаптивных реакций в конкретных органах-мишенях. В указанном плане в первую очередь следует рассматривать роль ИЛ-6 в печени не в качестве провоспалительного, провоцирующего фактора, а наоборот, в данном конкретном случае, в отличие от процесса в легких [7], – в качестве адаптогена. В частности, его синтез купферовскими клетками “в физиологических концентрациях” обусловлен стимулирующим влиянием пролактина, обеспечивающим, по-видимому, на более поздних этапах течения СДР структурно-функциональную перестройку органа – в плане активации репаративно-пролиферативных процессов *in situ*.

Какова биологическая значимость усиленного поступления пролактина в печень на ранних этапах течения СДР?

Можно сделать предположение, что высокие концентрации пролактина в печени обеспечивают становление репаративно-пролиферативных процессов в условиях развившейся диффузной белково-липидной дистрофии. В указанном плане влияние пролактина на репаративно-пролиферативные процессы в печени было сравнительно недавно изучено группой японских исследователей [9]. Так, было установлено, что при частичной резекции печени в условиях многократного введения пролактина на фоне вызванной пролактинемии не наблюдалось активации или ингибции процессов пролиферации гистиоцитов и стромальных элементов в сохранившихся отделах печени. Необходимо отметить, что в отдельной серии экспериментов введение пролактина осуществлялось в условиях овариэктомии. Тем самым авторы исключали возможный путь поступления пролактина из яичника в печень.

Исходя из полученных собственных данных следует, что в условиях СДР “кумуляция” в печени пролактина не должна рассматриваться в качестве фактора, обеспечивающего формирование местных репаративно-пролиферативных процессов. Подтверждением данного обстоятельства являются обнаруженные нами в печени морфологические изменения на ранних этапах СДР – диффузный процесс белково-липидной дистрофии без видимых признаков активации как гепатоцитов, так и клеток фибробластического ряда. В то же время не исключено, что высокий уровень пролактина в печени обеспечивается в первую очередь его поступлением из основного источника его синтеза – гипофиза, а также благодаря миграции в печень конкретных лимфоцитарных популяций, также вырабаты-

вающих пролактин [10, 11]. В пользу данного обстоятельства свидетельствует факт обнаружения в здоровой печени пролактина исключительно в периваскулярных отделах “артериоло-венулярных триад”, центральных венах и эпителии желчных путей [12]. Более того, те же авторы установили, что ни в паренхиматозных, ни в стромальных клетках нормально функционирующей печени рецепторы к пролактину не обнаружены. В этой связи авторы приходят к весьма важному, на наш взгляд, выводу, согласно которому пролактин в печени не действует через аутокринные и паракринные механизмы.

Учитывая весьма ценные сведения, полученные указанными авторами, можно допустить, что на ранних этапах СДР “реализация” поступившего в печень пролактина осуществляется, по-видимому, воздействием на клетки-мишени иммунной системы *in situ*. В качестве таких клеток в первую очередь выступают местные макрофаги – купферовские клетки, а также пришлые клетки моноцитарно-лимфоцитарного ряда, которые обнаруживаются в печени в виде периваскулярных инфильтратов. Именно поэтому не исключено, что в основе поражения печени при СДР лежат также иммунопатологические процессы, проявляющиеся усиленным местным синтезом ряда провоспалительных иммуноцитокинов, оказывающих на гепатоциты как прямое цитотоксическое действие, так и опосредованное – путем стимуляции печеночными клетками токсических белков острой фазы.

В заключение считаем необходимым отметить следующее: с качественно новых позиций, на наш взгляд, следует рассматривать роль конкретных гипофизарных гормонов роста – пролактина и ИФР-1 в процессах избирательной активации медиаторного звена иммунной системы и формирования репаративно-пролиферативных реакций как в условиях нормы (особенно у лиц препубертатного и пубертатного периода), так и при ряде экстремальных состояний.

Выдвинутое нами предположение представляется весьма правомочным, поскольку реализация эффектов указанных гипофизарных гормонов, согласно литературным данным, осуществляется поэтапно в следующей последовательности: ИФР-1 стимулирует синтез пролактина, который в свою очередь активизирует синтез соматотропного гормона.

В этой связи не исключено, что разнонаправленные сдвиги в содержании ИФР-1 и пролактина обусловлены в каждом конкретном случае характером и особенностями течения стресс-синдрома различного генеза, при котором имеет место избирательная активация и/или ингибция взаимообусловленных нейро-эндокринных и иммунопатологических процессов.

Поступила 05.11.02

