

# Сдвиги в содержании провоспалительных цитокинов, пролактина и оксида азота в подвздошной кишке мышей при синдроме длительного раздавливания (Сообщение 1)

К. Т. Саакян

НИЦ и кафедра гистологии ЕрГМУ им. М. Гераци

375025 Ереван, ул. Корюна, 2

**Ключевые слова:** синдром длительного раздавливания, пролактин, оксид азота, цитокины, подвздошная кишка

Как известно, лимфоидный аппарат дистальных отделов желудочно-кишечного тракта является составным компонентом в общей иерархической структурной организации иммунной системы организма. Следует отметить, что реализация многих региональных клеточных и гуморальных иммунных механизмов осуществляется не только благодаря наличию иммунокомпетентной лимфоидной ткани (пейеровы бляшки и солитарные фолликулы), но и полифункциональными клетками, локализованными в самой стенке толстых и тонких кишок.

Нашими предыдущими исследованиями [1–3] было установлено, что на ранних этапах синдрома длительного раздавливания (СДР) в центральном органе иммуногенеза и в «органах-мишенях» – легких, поджелудочной железе и печени возникал иммунопатологический процесс, который, сопровождался разнонаправленными сдвигами медиаторной функции – в плане синтеза и ингибции конкретных провоспалительных цитокинов, гормонов роста и оксида азота. В то же время иммунокомпетентная лимфоидная ткань дистальных отделов желудочно-кишечного тракта при СДР не служила предметом специального изучения. Необходимость и целесообразность проведения подобных исследований были продиктованы следующим обстоятельством: во-первых, необходимо выяснить роль лимфоидного аппарата кишечника в механизме развития общих иммунопатологических расстройств и эндотоксикоза, в частности; во-вторых, не исключено, что при таком комбинированном стрессе, каковым является СДР, в результате процесса транслокации кишечной грам-негативной микрофлоры могут нарушаться межассоциативные связи, установленные в процессе симбиотических взаимоотношений макро- и микроорганизмов, что одновременно чревато расстройствами в системе регионального бактериального и иммунного гомеостаза.

## Материал и методы

Опыты ставились на 58 белых половозрелых мышах массой 40–50 г. Животные были подразделены на 3 группы. Контрольной группой служили интактные мыши. На специальной установке животные опытных групп подвергались сдавливанию в течение 1 часа. Площадь поражения занимала внутреннюю поверхность бедра и составляла 7 см<sup>2</sup>. На указанную площадь оказывалось давление 280 кПа. Животные опытных групп выводились из эксперимента через 24 часа и на 7-е сутки после декомпрессии. После забивки извлекалась подвздошная кишка, которая очищалась от содержимого путем промывания в физрастворе. Ткань высушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали на торсионных весах, после чего гомогенизировали в микрогомогенизаторе типа стекло-тефлон при 1000 об/мин на холоде (при –4°C). Гомогенат экстрагировали в физрастворе в течение 15 мин. при 6°C, после чего раствор центрифугировали при 15000 g в течение 15 минут на холоде. Полученный супернатант до проведения иммуноферментных исследований хранили в глубоком холоде (при –40°C).

В течение первой же недели в супернатантах методом иммуноферментного анализа определяли уровень ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и  $\gamma$ -ИФН, пролактина и оксида азота (NO). Содержание указанных цитокинов определяли при помощи соответствующих антимышинных наборов фирмы DRG-International Inc. (США–Германия), пролактина – фирмы Syntroph Bioresearch Inc. (Чехия), а NO – Assay Design Inc. на автоматическом спектрофотометре Stat-Fax 303 Plus (США) в диапазоне спектра поглощения при длине волны 420–450 нм. Содержание иммуноцитокинов выражалось в pg/ml, пролактина – в нг/мл, NO – ммоль/л.

Статистический анализ проводился с использованием критериев Стьюдента.



## Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенного иммуноферментного анализа на предмет определения моноцитарных и лимфоцитарных цитокинов, на ранних этапах течения СДР имело место резкое понижение уровня всех изучаемых медиаторов. В супернатантах, приготовленных из подвздошной кишки, ИЛ-1 не выявлялся. Заметно снижалось содержание ИЛ-2 как через 24 часа, так и на 7-е сутки наблюдения (табл. 1). Так, через 24 часа уровень ИЛ-2 снижался по сравнению с контролем в 3,5 раза, а на 7-е сутки наблюдения — в 2,5 раза. На ранних этапах течения СДР в подвздошной кишке значительно снижалось и содержание ИЛ-6, которое в обеих опытных группах было ниже контрольных показателей в 3,5 раза. Резко снижалось также и содержание  $\gamma$ -ИФН, причем в обеих опытных группах определялись весьма низкие приблизительно одинаковые показатели, которые уступали контрольным в 4,3 раза. Таким образом, на ранних этапах течения СДР в подвздошной кишке нами были зарегистрированы весьма низкие показатели изучаемых провоспалительных цитокинов. Данное обстоятельство свидетельствует, по-видимому, в пользу резкого угнетения региональных синтетических процессов в клетках лимфоидной ткани подвздошной кишки, ответственных за выработку указанных медиаторов.

Особый интерес представляют, на наш взгляд, исследования, направленные на изучение содержания пролактина в подвздошной кишке, поскольку, как известно, пролактин оказывает дозозависимый эффект на процессы стимуляции и ингибции цитокинов иммунокомпетентными клетками [4–9]. Проведенный иммуноферментный анализ выявил значительное повышение содержания пролактина в наиболее ранний период течения СДР. Так, через 24 часа после декомпрессии уровень пролактина в подвздошной кишке превышал контрольный в 7,4 раза; в дальнейшем наблюдалась тенденция, направленная в сторону его понижения, однако показатели пролактина на 7-е сутки наблюдения были в 2,9 раза выше контрольного уровня.

Как показали результаты иммуноферментного анализа, на всем протяжении эксперимента в подвздошной кишке определялись весьма низкие показатели NO. Наиболее резкое снижение его содержания имело место через 24 часа после декомпрессии, когда уровень NO был ниже контрольного в 4,7 раза. На 7-е сутки эксперимента прослеживалась лишь тенденция, направленная в сторону его повышения, однако уровень NO был ниже контрольного в 1,9 раза.

Трактовка полученных данных весьма затруднительна. Можно сделать предположение, согласно которому в данном конкретном случае не задействованы нейрогуморальные механизмы, обеспечивающие син-

Таблица 1

Уровень цитокинов, пролактина и оксида азота в подвздошной кишке мышей на ранних этапах течения СДР

| Исследуемые показатели | Контрольная группа | Опытные группы                |                                 |
|------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                        |                    | через 24 ч после декомпрессии | на 7-е сутки после декомпрессии |
| ИЛ-1                   | 160,9 ± 11,3       | —                             | —                               |
| ИЛ-2                   | 114,25 ± 83,2      | 321,7 ± 29,8<br>p>0,001       | 463,5 ± 32,3<br>p<0,001         |
| ИЛ-6                   | 155,6 ± 13,6       | 41,8 ± 3,7<br>p<0,001         | 44,3 ± 2,8<br>p<0,001           |
| $\gamma$ -ИФН          | 7,4 ± 0,8          | 1,7 ± 0,3<br>p<0,001          | 1,5 ± 0,2<br>p<0,001            |
| Пролактин              | 1,5 ± 0,2          | 11,2 ± 0,6<br>p<0,001         | 4,4 ± 0,3<br>p<0,001            |
| NO                     | 86,2 ± 7,2         | 18,4 ± 4,6<br>p<0,001         | 45,9 ± 3,5<br>p<0,001           |

тез *in situ* провоспалительных цитокинов, поскольку на фоне выраженной ингибции медиаторной функции иммунокомпетентных клеток происходило значительное повышение пролактина.

По-видимому, в механизмах избирательной направленной ингибции иммуоцитокинов заинтересованы другие факторы, возможно, негормонального генеза. Речь, в первую очередь, идет о нарушении симбиотических взаимоотношений, которые установились в процессе эволюционного развития человека между резидентной кишечной микрофлорой и лимфоидным аппаратом толстого кишечника. В пользу данного предположения свидетельствуют также литературные данные, в которых показано, что некоторые представители грам-негативной микрофлоры и, в первую очередь, *E.coli*, как в условиях нормы, так и в экстремальных ситуациях выступают в качестве мощных биостимуляторов направленного синтеза иммуоцитокинов [10–12]. Именно поэтому процессы угнетения синтеза иммуоцитокинов в лимфоидном аппарате толстого кишечника следует рассматривать именно в аспекте установленного нами при СДР феномена транслокации.

Затруднительной представляется также интерпретация полученных данных, в которых установлен весьма низкий уровень NO в подвздошной кишке. Можно лишь сделать допущение, согласно которому в результате транслокации из экзониз кишечника резидентных микроорганизмов нарушается функционирующий в норме "бактериально-иммунный" гомеостаз, обеспечивающий, в частности, многие физиологические функции желудочно-кишечного тракта, в том числе и процессы местной стимуляции иммуно-



компетентных клеток. Не исключено также, что низкий уровень NO в подвздошной кишке обусловлен

также резким угнетением синтеза провоспалительных цитокинов.

Поступила 14.11.04

## Երկարատև ճնշման համախտանիշի պարագայում մկների զստադիքում բորբոքմանը նպաստող ցիտոկինների, պրոլակտինի և NO պարունակության մեջ փոփոխությունները

Կ. Ս. Սահակյան

Երկարատև ճնշման համախտանիշի (ԵՃՀ) վաղ փուլերի ընթացքում իմունաֆերմենտային վերլուծության եղանակով ուսումնասիրվել են բորբոքմանը նպաստող ցիտոկինների (պրոլակտին և ազոտի օքսիդ), պարունակության շեղումները՝ փորձարարական կենդանիների զստադիքում: Կատարված հետազոտություններով հաստատվել է, որ դեկոմպրեսիայից 24 ժամ հետո և 7 օր անց զստադիքում տեղի էր ունենում IL-1, IL-2, IL-6 և  $\gamma$ -IFN սինթեզի զգալի ընկճում: Երկու ուսումնասիրվող ժամանակահատվածներում գրանցվել են մույնպես ազոտի օքսիդի համեմատաբար ցածր ցուցանիշներ:

Ստացված տվյալների մեկնաբանությունը չափազանց դժվարացած է: Միաժամանակ բացատրված չէ, որ սուր սթրեսի պայմաններում, ինչպիսին է ԵՃՀ, խախտվում են էվոլյուցիայով ամրապնդված բարդ մեխանիզմները, որոնք ընկած են իմունային և մանրէային ռեգիոնալ համեմատազի հիմքում:

Աղիքների ավշային ապարատի մեդիատոր գործառնության կտրուկ ընկճմանը հանգեցնող հիմնական գործոններից բացի, ԵՃՀ-ի պարագայում առաջացող աղիքային և մանրէային տրանսլոկացիայի գործընթացը հարկ է դիտարկել որակապես նոր դիրքից:

## Shifts in the content of pro-inflammatory cytokines, prolactin and NO in ileum of mice at crush-syndrome

K.T. Sahakyan

The shifts in content of some pro-inflammatory cytokines – prolactin and nitric oxide, in the ileum of experimental animals at the early stages of crush-syndrome in experimental animals have been investigated by means of immunofluorescent analysis methods. It has been established that after 24 hours and on the 7<sup>th</sup> day after decompression in ileum a considerable inhibition of the IL-1, IL-2, IL-6 and  $\gamma$ -IFN synthesis is observed. Comparatively low indices of NO are registered also in both studied periods.

It is difficult to interpret the obtained data, but it may

be considered that in conditions of such acute stress as crush-syndrome, the compound evolutionally consolidated mechanisms, being the basis of regional immune and bacterial homeostasis, are broken.

Besides many background factors, causing acute inhibition of the intestine lymphoid apparatus mediator function, the appearing at SDR process of intestine bacterial translocation should be considered from qualitatively new positions.

## Литература

1. Саакян К.Т. Мед. наука Армении НАН РА, 2002, XLII, 1, с. 28.
2. Саакян К.Т. Эксперим. и клин. мед. Тбилиси, 2004, 5-6, с. 33.
3. Саакян К.Т. Эксперим. и клин. мед. Тбилиси, 2004, 5-6, с. 48.
4. Hadden J. W. Int. J. Immunopharmacol., 1992 Apr; 14 (3): 345-352. Review.
5. Ярилин А. А., Беляков И. М. Иммунология, 1996, с. 4.
6. Clapp C., Lopez-Gomez F.J., Nava G., Corbacho A. et al. J. Endocrinol., 1998, v. 158, 1, p. 134.
7. Richards S. M., Garman R. D., Keyes L., Kavanagh B., McPherson J. M. Cell Immunol., 1998, v. 184, 2, p. 85.
8. Zellweger R., Wichmann M.W., Ayala D., Chaudry J.H. J. Trauma, 1998, v. 44, 1, p. 70.
9. Holstad M., Sandler S. Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice, J. Endocrinol., 1999, v. 163, 2, p. 229.
10. Laye S., Parnet P., Goujon E., Dantzer R. Brain Res. Mol. Brain Res., 1994 Nov; 27(1): 157-62.
11. Linthorst A.C., Reul J.M. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1998 May 1; 840: 139-152.
12. Зильфян А.В., Сосбатян Л. Медицинская наука Армении НАН РА, 2000, XL, 34, с. 23.