

© М. І. МАРУЩАК

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"

## Закономірності змін цитокінового статусу в бронхоальвеолярному змиві щурів за умови гострого ураження легень

М. І. MARUSHCHAK

SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky"

### PATTERNS OF CYTOKINE'S STATUS IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE OF THE RATS WITH ACUTE LUNG INJURY

При проведенні дослідження у щурів з експериментальним гострим ураженням легень було встановлено зростання рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-8) у бронхоальвеолярному змиві порівняно із контрольними групами тварин. Синтез ІЛ-10 в перші 12 год експерименту розглядається як механізм обмеження гіперпродукції прозапальних цитокінів, проте він виснажується до кінця першої доби експериментального гострого ураження легень. Таким чином, встановлена зміна динаміки цитокінового статусу свідчить про патогенетичну роль порушення концентрації інтерлейкінів у формуванні гострого ураження легень.

In the course of experimental research which was held on male rats with experimental acute lung injury, increased proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8) levels in bronchoalveolar lavage in comparison with control group of animals were observed. Synthesis of IL-10 in the first 12 hours of experiment considered as a mechanism for limiting hyperproduction of proinflammatory cytokines, but it is exhausted after 24 hours of experimental acute lung injury. In that way changes of cytokine's profile in blood are the evidence of pathogenetic role of cytokines concentrations alterations in the acute lung injury development.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій.** Гостре ураження легень (ГУЛ) і його тяжка форма – гострий респіраторний дистрес-синдром – це локалізована відповідь внаслідок дифузного запального процесу в легенях на системний запальний процес із гострим розвитком у пацієнтів гіпоксії, тахіпноє та зниженням еластичності легень [1]. Розвиток ГУЛ може розвиватися як у хворих із легеневою, так і позалегеневою патологією. Найчастішою легеневою причиною ГУЛ є інфекційна пневмонія (до 61,8 %), аспіраційна пневмонія (22,0–35,6 %) [2].

У даний час нема сумнівів, що при легеневих ураженнях реалізація активації специфічних і неспецифічних імунних реакцій пов'язана із впливом на різні гомеостатичні системи організму цілого ряду універсальних медіаторів, серед яких важливе місце займають цитокіни [3]. Їх часто називають клітинними гормонами, оскільки вони взаємодіють із специфічними клітинними рецепторами, здійснюючи аутокринну, паракринну й ендокринну регуляцію [4]. Цитокіни пріоритетно діють у вогнищі запалення і на території реагуючих лімфатичних органів, тому виникає необхідність дослідження інтерлейкінів у бронхоальвеолярному змиві (БАЗ) та крові для вивчення локального та системного характеру запалення.

Проведений огляд літературних джерел показав, що при ГУЛ внаслідок інфекційної пневмонії цито-

кіни відіграють важливу роль у підтримці імунного гомеостазу, генерації захисного імунітету, а також репаративних процесах легень [5]. Багато робіт присвячено ролі прозапальних цитокінів у патогенезі ГУЛ, що модельоване введенням ліпополісахариду, та методам їх корекції [6, 7]. Проведене у 2003 р. багатоцентрове клінічне дослідження показало, що здійснення вентиляції легень знижує смертність хворих із ГУЛ на 22 %, причому даний захисний ефект пов'язаний із зниженням числа нейтрофілів та концентрації прозапальних цитокінів у вогнищі ураження, що зумовлює необхідність встановити вклад цитокінів у патогенезі аспіраційного ГУЛ [8].

**Мета роботи:** вивчити динаміку найбільш характерних цитокінів – інтерлейкінів-1 $\beta$ , -8 та -10 у бронхоальвеолярному змиві експериментальних тварин та з'ясувати їх роль у патогенезі гострого ураження легень.

**Матеріали і методи.** Досліди були проведені на 60 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях із масою тіла 200–220 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету. Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей. Тварин розподілили на 5

груп: 1-ша – контрольна група (n=12), 2-га – ураження хлоридною кислотою тривалістю 2 год (n=12), 3-тя – ураження хлоридною кислотою тривалістю 6 год (n=12), 4-та – ураження хлоридною кислотою тривалістю 12 год (n=12), 5-та – ураження хлоридною кислотою тривалістю 24 год (n=12).

Для дослідження вибрали нейтрофілзалежну експериментальну модель ГУЛ [9]. Щурів анестезували внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Вентральну сторону ший обробляли хлоргексидином і робили 0,5-сантиметровий серединний розріз для візуалізації трахеї. Тварин розміщували горизонтально під кутом 45°, інсуліновим шприцом вводили в трахею HCl, рН 1,2 в дозі 1,0 мл/кг на вдиху. Тваринам контрольної групи вводили ізотонічний розчин натрію хлориду в дозі 1,0 мл/кг.

Через 2, 6, 12 та 24 год проводили евтаназію щурів методом введення тіопенталу натрію в дозі 90 мг/кг маси тварини, дотримуючись правил гуманного ставлення до тварин. Розкривали грудну клітку і відділяли легенево-серцевий комплекс. Рівні інтерлейкіну-1β (ІЛ-1β), інтерлейкіну-8 (ІЛ-8) та інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) у БАЗ визначали за допомогою імуноферментного методу на аналізаторі STAT-Fax з використанням тест-систем ТОВ “Укрмедсервіс”, ТОВ “УкрмедДон” (Україна) згідно з інструкціями фірми-виробника.

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента. Результати вважалися достовірними при значеннях  $p < 0,05$ .

Кореляційний аналіз проводили між усіма досліджуваними показниками. Вираховували коефіцієнт лінійної кореляції (r) та його достовірність (p), що відповідним чином позначалося у таблицях (кореля-

ційних матрицях). Якщо показник  $r=0$ , зв'язок вважався відсутнім, у діапазоні 0–0,3 – свідчив про слабку кореляцію, проміжок показника 0,3–0,7 характеризував зв'язок середньої сили, а інтервал 0,7–1,0 вказував на значну кореляційну взаємодію. Коефіцієнт кореляції оцінювали як достовірний при  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Встановлено, що рівні альвеолярних та системних цитокінів гостро змінюються (в межах від 1 до 2 год) у відповідь на альвеолярне пошкодження, причому як в системному, так і регіонарному кровотоці [10]. На підставі даних досліджень була висунута гіпотеза, що легені виступають важливим органом продукції цитокінів, а також джерелом їх надходження до системного кровотоку. Проведене нами дослідження вказало на те, що в перші 2 год моделювання ГУЛ рівень ІЛ-1β статистично незначимо зростав на 12,64 %, тоді як через 6 год виявлялось достовірне підвищення на 13,86 % відносно даних 2-ї дослідної групи, через 12 год – на 41,16 % проти результатів 3-ї дослідної групи і на 24 год досліді – на 13,96 % порівняно з попередньою групою (табл. 1). Встановлено, що через добу спостереження концентрація ІЛ-1β достовірно збільшилась практично вдвічі, причому відбувалось поступове зростання даного цитокіну впродовж 24 год (табл. 1).

При аналізі отриманих результатів рівня ІЛ-8 відмічено, що у БАЗ експериментальних тварин 2-ї групи з ГУЛ, індукованим інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти, спостерігалось достовірне зростання цього цитокіну на 251,57 % проти контролю, 3-ї групи – на 12,92 % відносно даних через 2 год, 4-ї дослідної групи – на 9,89 % проти результатів через 6 год і на 24 год досліді – на 8,47 % порівняно з попередньою групою (табл. 2). Прове-

**Таблиця 1. Рівень ІЛ-1β (пг/мл) у БАЗ щурів при модельованому гострому ураженні легень (M±m)**

Дослід 1	Дослід 2	Дослід 3	Дослід 4	Дослід 5
2,69±0,16	3,03±0,11	3,45±0,12*	4,87±0,12*	5,55±0,18*
		p<0,05	p<0,001	p<0,01

Примітка. \* – достовірність відмінностей між контрольною і дослідними групами ( $p < 0,01$ ), p – достовірність відмінностей між дослідними групами.

**Таблиця 2. Рівень ІЛ-8 (пг/мл) у БАЗ щурів при модельованому гострому ураженні легень (M±m)**

Дослід 1	Дослід 2	Дослід 3	Дослід 4	Дослід 5
8,28±0,22	29,11±0,61*	32,87±0,69*	36,12±1,05*	39,18±0,83*
		p<0,01	p<0,05	p<0,05

Примітка. \* – достовірність відмінностей між контрольною і дослідними групами ( $p < 0,001$ ), p – достовірність відмінностей між дослідними групами.

дене дослідження показало, що рівень ІЛ-8 протягом часу спостереження збільшився у 4,73 раза, причому відбувалось прогресивне зростання даного показника з максимумом на 2 годину.

Встановлено, що при HCl-індукованому ГУЛ через 2 год рівень ІЛ-10 достовірно зростав на 54,45 %, через 6 год – на 21,79 % відносно даних 2-ї дослідної групи, через 12 год – на 17,89 % проти резуль-

Таблиця 3. Рівень ІЛ-10 (пг/мл) у БАЗ щурів при модельованому гострому ураженні легень (M±m)

Дослід 1	Дослід 2	Дослід 3	Дослід 4	Дослід 5
7,31±0,45	11,29±0,42*	13,75±0,60*	16,21±0,43*	12,21±0,62*
		p<0,01	p<0,01	p<0,001

Примітка. \* – достовірність відмінностей між контрольною і дослідними групами (p<0,001), p – достовірність відмінностей між дослідними групами.

татів 3-ї дослідної групи, причому на 24 год досліді даний показник достовірно зменшився на 24,68 % відносно попередньої групи (табл. 3).

Результати дослідження показали, що протягом перших 12 год відбувається активація ІЛ-10, що сповільнює надмірну продукцію прозапальних цитокінів, знижує продукцію супероксиданіонів, проте даний механізм виснажується вже через добу спостереження.

Враховуючи здатність нейтрофілів виробляти прозапальні цитокіни та у сукупності з вільними кисневими радикалами, оксидом азоту відігравати важливу роль у патогенезі ГУЛ [8], наші дослідження показали, що при моделюванні НСІ-індукованого ГУЛ у БАЗ відмічалися як виражений лейкоцитоз, так і нейтрофільний гранулоцитоз. Встановлено, що при НСІ-індукованому ГУЛ через 2 год кількість гранулоцитів становила (29,83±1,05) %, через 6 год – (69,25±1,69) %, через 12 год – (69,08±1,16) %, через 24 год – (69,75±1,33) %, що було достовірно вище показника контрольної групи – (0,47±0,05) %. Отримані результати підтверджуються попередніми дослідженнями та даними інших наукових праць [11, 12].

Щодо цитокіногенезу при НСІ-індукованому ГУЛ встановлено активацію прозапальних ІЛ-1β та ІЛ-8, що може бути зумовлено гіпоксією. Потрібно відмітити, що більшість прозапальних ефектів у БАЗ при ГУЛ належать ІЛ-1β, який ініціює активацію нейтрофілів, міграцію їх у вогнище ураження, опосередковано зумовлює надмірну генерацію активних форм кисню [13]. Розвиток набряку при ГУЛ теж належить ІЛ-1β, який впливає на епітеліальні натрієві канали, порушуючи транспорт рідини, зумовлює збільшення проникності білків у легенях. Дослідження показують, що гіперпродукція ІЛ-1β нейтрофілами відбувається перш ніж ці клітини потраплять у легені [13]. Отже, високий рівень при НСІ-індукованому ГУЛ вказує на істотну роль ІЛ-1β в патогенезі даної патології, будучи пусковим фактором регіонарної відповіді організму на дію гідрохлоридної кислоти. При цьому відомо, що для синтезу ІЛ-1β необхідна активація мембранних Toll-like рецепторів або внутрішньоклітинних NLR рецепторів, що супроводжується активацією ядерного фактора транскрипції NF-κB і експресією генів ІЛ-1β та інших прозапальних цитокінів. Активація цих рецепторів супроводжується збільшенням внутрішньоклітинного вмісту каспази-1, яка збільшує секрецію ІЛ-1β у міжклітинний простір [14]. Отже, можна

припустити, що підвищений рівень ІЛ-1β зумовлений активацією внутрішньоклітинної кіназної системи і системи факторів транскрипції.

Потужним та ефективним атрактантом щодо поліморфноядерних лейкоцитів є ІЛ-8, який синтезується як клітинами імунної системи (моноцитами, альвеолярними макрофагами, Т-лімфоцитами, нейтрофілами, природними кілерами), так і неімунними клітинами (ендотеліальними й епітеліальними клітинами) і відповідає за легенеvu активацію гранулоцитів крові [15]. Зростання концентрації ІЛ-8 при аспіраційному ГУЛ виникає у відповідь на гіперпродукцію фактора некрозу пухлин альфа або ІЛ-1β. Щодо нейтрофілів ІЛ-8 зумовлює їх дегрануляцію, підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, респіраторний вибух та сприяє приєднанню до ендотеліальних клітин. Відомо, що в процесі дегрануляції нейтрофілів у позаклітинний простір з первинних гранул лейкоцитів швидко вивільняється нейтрофільна еластаза, яка забезпечує гідроліз таких цитокінів, як ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8 та ряд інших, тим самим зменшуючи прозапальну дію [16]. Це змусило нас дослідити зв'язок між кількістю нейтрофільних гранулоцитів і рівнем досліджуваних прозапальних цитокінів.

Провівши порівняльний аналіз кореляційних зв'язків між рівнем ІЛ-1β, ІЛ-8, кількістю нейтрофільних гранулоцитів у бронхоальвеолярному змиві, встановлено, що при ГУЛ, яке індуковане інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти, вже у першу фазу ГУЛ (перші 2 год експерименту) наявний достовірний позитивний кореляційний зв'язок середньої сили між концентрацією досліджуваних цитокінів (p<0,05), який набирає сили в 3-й та 4-й дослідних групах (p<0,01). Між рівнем ІЛ-1β та кількістю нейтрофілів встановлено позитивний кореляційний зв'язок середньої сили лише в 4-й експериментальній групі, тоді як між концентрацією ІЛ-8 і кількістю гранулоцитів діагностовано позитивний корелятивний зв'язок протягом всього часу спостереження (табл. 4).

Отже, отримані результати підтверджують сучасні літературні дані та наше припущення про те, що ІЛ-1β при аспіраційному ГУЛ є ініціатором цитокінового каскаду, зокрема ІЛ-8 [10, 13, 15]. Враховуючи значимий прямий кореляційний зв'язок між рівнем гранулоцитів та концентрацією ІЛ-8, можна припустити, що крім нейтрофільної еластази, інші патогенетичні чинники пролонгують тривалість життя та біологічну активність даного хемокіна.

Таблиця 4. Пари кореляційних зв'язків між рівнем ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-8 і кількістю нейтрофільних гранулоцитів у бронхоальвеолярному змиві при гострому аспіраційному ураженні легень

Пари кореляційних зв'язків		Дослідні групи	Коефіцієнт кореляції, $r_{xy}$	Вірогідність кореляційного зв'язку, $p$
ІЛ-1 $\beta$ , пг/мл	ІЛ-8, пг/мл	2	0,68	<0,05
		3	0,77	<0,01
		4	0,85	<0,01
		5	0,85	<0,01
ІЛ-1 $\beta$ , пг/мл	Кількість нейтрофільних гранулоцитів, %	2	0,13	>0,05
		3	0,51	>0,05
		4	0,62	<0,05
		5	0,50	>0,05
ІЛ-8, пг/мл	Кількість нейтрофільних гранулоцитів, %	2	0,63	<0,05
		3	0,78	<0,01
		4	0,78	<0,01
		5	0,62	<0,05

**Висновки.** 1. За гострого ураження легень, модельованого інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти, спостерігається статистично значима взаємозв'язана гіперпродукція прозапальних ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-8 у бронхоальвеолярному змиві, що може відігравати важливу роль в ініціації та прогресуванні даної патології внаслідок активації й дегрануляції нейтрофілів та запуску метаболічних каскадних реакцій, при цьому ІЛ-8 позитивно корелює з кількістю гранулоцитів.

2. Протягом перших 12 год експерименту ІЛ-10 сповільнює надмірну продукцію прозапальних цитокінів, проте даний механізм виснажується до кінця першої доби модельованого ураження.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати свідчать про потребу в подальшому вивченні механізмів активації цитокінового каскаду в легенях при аспіраційному ураженні легень.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Теслюк І. І. Критичні стани: гострий респіраторний дистрес-синдром / І. І. Теслюк // *Терапія (Український медичний вісник)*. – 2010. – № 11. – С. 41–43.
- Мониторинг внесосудистой воды легких у больных с тяжелым сепсисом / М. Ю. Киров, В. В. Кузьков, Л. Я. Бьертнес, Э. В. Недашковский // *Анестезиология и реаниматология*. – 2003. – № 4. – С. 41–45.
- Barnes P. J. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms / P. J. Barnes, S. D. Shapiro, R. A. Pauwels // *Eur. Respir. J.* – 2003. – Vol. 22. – P. 672–688.
- Котович И. Л. Диагностическое значение исследования клеток, цитокинов и компонентов сурфактанта легких в бронхоальвеолярной лаважной жидкости / И. Л. Котович, А. Д. Таганович // *Медицинские новости*. – 2000. – № 9. – С. 18–22.
- Deng J. C. Growth Factors and Cytokines in Acute Lung Injury / J. C. Deng, T. J. Standiford // *Compr. Physiol.* – 2011. – Vol. 1. – P. 81–104.
- Antiinflammatory effects of matrine in LPS-induced acute lung injury in mice / Bo Zhang, Zhong-Yang Liu, Yan-Yan Li [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – Vol. 44, Is. 5. – P. 573–579.
- Galectin-9 Attenuates Acute Lung Injury by Expanding CD14-Plasmacytoid Dendritic Cell-like Macrophages / K. Kojima, T. Arikawa, N. Saita [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2011. – Vol. 184. – P. 328–339.
- Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury / R. B. Goodman, J. Pugin, J. S. Lee, M. A. Matthay // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2003. – Vol. 14 (6). – P. 523–535.
- Matute-Bello G. Animal models of acute lung injury / G. Matute-Bello, C. Frevert, T. Martin // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2008. – V. 295. – P. 379–399.
- Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS / G. U. Meduri, S. Headley, G. Kohler [et al.] // *Chest*. – 1995. – Vol. 107. – P. 1062–1073.
- Патогенетична роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку гострого ураження легень / А. А. Гудима, М. І. Марущак Г. Г. Габор, М. І. Куліцька // *Буковинський медичний вісник*. – 2011. – № 3. – С. 82–86.
- Alveolar Recruitment in Pulmonary and Extrapulmonary / A. W. Thille, J.-C. M. Richard, S. M. Maggiore [et al.] // *Anesthesiology*. – 2007. – Vol. 106. – P. 212–217.
- Acute Respiratory Distress Syndrome Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 $\beta$  expression after hemorrhage and endotoxemia / M. V. Parsey, R. M. Tuder, E. Abraham // *The Journal of Immunology*. – 1998. – Vol. 160. – P. 1007–1013.
- Кетлинский С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2008. – 552 с.
- Interleukin-8 synthesis, regulation, and steroidogenic role in H295R human adrenocortical cells / Damian G. Romero, Gaston R. Vergara, Zheng Zhu [et al.] // *Endocrinology*. – 2006. – Vol. 147, № 2. – P. 891–898.
- Кубышкин А. В. Эластолитическая активность бронхоальвеолярного лаважа при моделировании воспалительного процесса в легких / А. В. Кубышкин, И. И. Фомочкина // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – Т. 80, № 1. – С. 89–95.

Отримано 03.02.12