

P-1011

Рикало Н.А., Яровенко Л.О.

Вплив протизапального цитокіна IGF-1 на репаративно-регенеративні процеси печінки у щурів різного віку на тлі хронічної алкогольної інтоксикації та корекції

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова
кафедра патофізіології, м. Вінниця, Україна

Актуальність теми. Медіатори запалення – біологічно активні речовини, які визначають подальший перебіг запального процесу. Регуляція запального процесу відбувається під впливом клітинних та плазменних медіаторів, шляхом: 1) активації синтезу факторів росту; 2) експресії рецепторів для цитокінів на мембрані клітин-мішеней; 3) синтезу білків гострої фази. Протягом декількох годин після впливу патогенів макрофаги, які емігрували в осередок запалення запускають синтез цитокінів, які активують функцію всіх імунних клітин, експресують їх рецептори, підсилюють синтез лейкоцитарних медіаторів, молекул адгезії і синтез факторів росту [1]. При цьому відбувається викид низькомолекулярних клітинних медіаторів запалення: гістаміну і ліпідних медіаторів. До них відносять простагландини, простацикліни, тромбосани, лейкотрієни, перекиси жирних кислот і фактори активації тромбоцитів. Гостра запальна реакція ініціюється внаслідок активації тканинних макрофагів, нейтрофілів та Т-лімфоцитів і секреції ними прозапальних цитокінів: інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-8), фактор некрозу пухлин (TNF- α) [2], які відіграють важливу роль у механізмах розвитку як місцевих, так і загальних ознак запалення. Гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор стимулюють ріст і диференціювання ранніх і пізніх гранулоцитарних попередників, формування нейтрофільних колоній в культурі клітин кісткового мозку, сприяють мобілізації нейтрофілів з кісткового мозку. і їх виживання, тим самим збільшуючи пул циркулюючих нейтрофілів [1].

Важлива роль належить й протизапальним медіаторам [3]:

- a) Полісахаридні медіатори (глікозамінглікани) до них відносять гепарин, гепаран-сульфат, хондроїтин-сульфат, дерматан-сульфат. Гепарин виділяється мастоцитами, еозинофілами, базофілами, макрофагами, фібробластами, він зменшує активність біогенних амінів і кінінової системи, пригнічує коагуляцію, адгезію і агрегацію тромбоцитів, служить структурним компонентом міжклітинної речовини сполучної тканини та бере участь в процесах регенерації.
- b) Інгібітори протеаз: α -1-антитрипсин, α -2-макроглобулін, антиплазмін, антитромбін-III, інгібітори комплементу, які пригнічують активність лізосомальних гідролаз, обмежують альтерацію і зменшують наслідки екзоцитозу.
- c) Антифосфоліпази - макрокортін, ренокортін, ліпомодулін, які інгібують утворення ейкозаноїдів.
- d) Антиоксиданти - церулоплазмін, гаптоглобін, гемопексин, транскобаламін, пероксидаза, супероксиддисмутаза, β -2-мікроглобуліну, амілоїд-А, С-реактивний білок, відповідають за інактивацію активних кисневих радикалів і ліпоперекисей.
- e) Інактиватори прозапальних медіаторів: арилсульфатаза (інактивація лейкотрієнів), гістаміназа (інактивація гістаміну), кініназа (інактивація кінінів).
- f) Поліаміни : кадаверин, путресцин, спермін, спермі дин, які здатні гальмувати ексудацію та стимулювати регенерацію.
- g) Цитокіни: *інтерлейкін 4 (IL-4)*, який продукується переважно Т-хелперами (Th2). Крім того, обмежена здатність до вироблення IL-4 була виявлена у тучних клітин, базофілів, В-лімфоцитів і стромальних клітин кісткового мозку. Основна функція IL-4 - це контроль проліферації, диференціації та функцій В-лімфоцитів, тобто антитільної відповіді. IL-4 може активувати і Т-лімфоцити, що задіяні у алергічній реакції клітинного типу; *інтерлейкін 10 (IL-10)*, який продукується Т-лімфоцитами, є інгібіторами продукції цитокінів, блокує функції Th1-хелперів; *інтерлейкін 13 (IL-13)* є продуктом активованих Т-лімфоцитів: як CD4+, так і CD8+. Серед CD4+ Т-лімфоцитів цей цитокін продукують і Th1, і Th2. По біологічній активності IL-13 має багато загального з IL-4, а саме подібній дії на В-лімфоцити і моноцити-макрофаги; *Трансформуючий фактор росту- β (TGF- β , плеотропний і мультифункціональний цитокін)* продукується багатьма клітинами,

включаючи моноцити, макрофаги, активовані Т- і В-лімфоцити та ендотеліальні клітини [2, 3]; *Інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1)*, який в останній час викликає інтерес багатьох науковців. IGF-1 володіє стимулюючою дією на функціональну і мітотичну діяльність клітин, забезпечує проліферацію, підтримання видової спеціалізації тканин і відновлення внутрішньо- і позаклітинних структур, як в процесі життєдіяльності організму, так і внаслідок ушкодження. Приблизно 75-85 % від загальної кількості IGF-1 продукується клітинами печінки [4]. Відомо, що при церозі печінки спостерігається зниження IGF-1 у крові [5], при фіброзі – навпаки збільшення, IGF-1 синтезується клітинами Купфера та ЗК. На сьогоднішній день, невивченим залишається роль IGF-1 в механізмах етанол-індукованого ушкодження гепатоцитів, у процесах регенерації печінки на тлі ХАУП та при застосуванні кверцетину та глютаргіну. Тому **метою роботи** стало дослідження рівня сироваткового IGF-1 та встановлення кореляційних зв'язків даного показника із пре-, пост- та синтетичною фазами ядерної активності гепатоцитів при хронічній алкогольній інтоксикації та на тлі застосування L-аргініну-L-глутамату і кверцетину у щурів різного віку.

Матеріали і методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 144 нелінійних щурах-самках різного віку. Всі експерименти виконано з дотриманням норм Конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), Ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

У відповідності до мети та завдань роботи використовували самки щурів трьох вікових категорій: I вікова категорія – статевонезрілі щури віком 1,5 міс. із початковою середньою масою тіла 50 – 60 г, n = 48; II вікова категорія – статевозрілі щури віком 6 міс. із початковою масою тіла 180 – 200 г, n = 48; III вікова категорія – старі тварини, віком 20 міс., початковою середньою масою тіла 300 – 320 г, n = 48. Кожну вікову категорію було розподілено на 4 групи по 12 дослідних тварин у кожній: 1) контрольні тварини (щури однакового віку);

2) тварини з хронічним алкогольним ушкодженням печінки (ХАУП), 3) тварини з ХАУП, яким через 1 год. після введення етанолу *per os* вводили ангіопротектор кверцетин (“Кверцетин”, ЗАТ НВЦ “Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод”, Україна) у дозі 100 мг/кг маси тіла тварин (Пахомова А. та ін., 2009); 4) тварини з ХАУП, яким через 1 год. після введення етанолу *per os* вводили гепатопротектор глутаргін (“Глутаргін”, ТОВ Фармацевтична компанія “Здоров’я”, Україна) у дозі 35 мг/кг маси тіла тварин.

У тварин 2, 3 і 4 груп кожної вікової категорії перших два тижні моделювали ХАУП за методикою Г. А. Ковальова та А. Ю. Петренка (2004), протягом цього періоду тварини отримували 5 % та 15 % етанол, починаючи із третього тижня – щоденно, *per os* вводили 96,0 % розчин етанолу в дозі 16 г/кг маси тіла на добу протягом 12 тижнів [5]. Введення кверцетину і глутаргіну на моделі ХАУП проводили через 2 тижні від початку експерименту щоденно 1 раз на добу через годину після введення етилового спирту впродовж 12 тижнів.

Після закінчення терміну експерименту проводили евтаназію тварин під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом декапітації та здійснювали забір крові та печінки щурів.

Рівень IGF-1 у сироватці крові визначали імуноферментним методом за комерційним набором реактивів “EIA-4140, IGF-I 600 ELISA” (“DRG”, Німеччина) відповідно до інструкції. Вимірювання проводили на імуноферментному аналізаторі Нумареадер 2106 (США).

Для визначення фаз клітинного циклу ядерної ДНК гепатоцитів після розтину черевної порожнини негайно вилучали печінку у тварин усіх дослідних груп. У стерильних умовах під капсулою з лівої великої частки зі свіжого матеріалу вирізали шматочок тканини розміром 0,5 см³, який промивали 0,9 % розчином NaCl і занурювали у фосфатно-сольовий буфер pH 7,4 (Sigma) для подальшого цитофлуориметричного аналізу, який проводили на багатофункціональному проточному цитометрі “Partec PAS” фірми Partec (Німеччина).

Статистичний аналіз отриманих результатів у ході виконання дисертаційної роботи здійснений згідно з комп'ютерною програмою “Statistica 6.1” (ліцензійний номер BXXR901E246022FA), із використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. У роботі використовували непараметричний U-критерій Мана-Уїтні. Аналіз кореляцій між показниками проводили за методом Спірмена. Статистично достовірною вважали різницю $p < 0,05$.

Обговорення результатів дослідження. За використання імуноферментного аналізу встановлено, що рівень сироваткового IGF-1 в інтактних тварин різного віку відрізнявся (рис. 1). При цьому вміст IGF-1 у сироватці крові контрольних статевонезрілих щурів був меншим на 62,2 % ($p < 0,05$) за показники статевозрілих тварин. У старих тварин контрольної групи вміст IGF-1 дещо перевищував відповідний показник статевозрілих тварин, але при цьому статистично достовірної різниці не встановлено.

Установлено, що на тлі ХАУП у щурів різного віку відбувається достовірне зменшення вмісту IGF-1 у сироватці крові порівняно із контролем відповідних за віком тварин: у статевозрілих щурів – на 54,8 % та у старих – на 16,3 % (рис. 1). Отримані дані свідчать про токсичну дію етанолу, ураження паренхіми печінки з порушенням білоксинтезуючої функції, у тому числі зі зменшенням синтезу ростового цитокіну IGF-1, який синтезується печінкою.

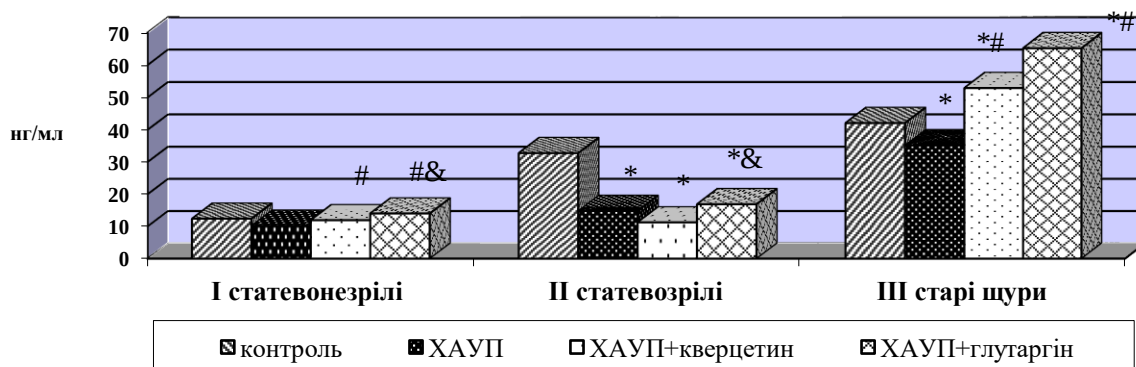


Рис. 1. Концентрація IGF-1 у сироватці крові щурів різного віку на тлі ХАУП та при застосуванні кверцетину та глутаргіну ($M \pm m$, $n=12$).

Примітка. Достовірність відмінностей ($p < 0,05$) порівняно: * – з контрольною групою; # – з ХАУП; & – між кверцетином та глутаргіном.

Найвищий рівень IGF-1 на тлі ХАУП спостерігали у старих тварин, що, на нашу думку, може виступати компенсаторно-захисним механізмом на токсичну дію етанолу. Кверцетин у статевозрілих тварин знижував рівень IGF-1 на 24,2 % ($p < 0,05$), що може свідчити про його здатність інгібувати IGF-1. При застосуванні глютаргіну вміст IGF-1 був більшим за відповідні показники з ХАУП: у I-й віковій категорії – на 37,4 % ($p < 0,05$) та у III-й – на 85,2 % ($p < 0,05$). Враховуючи дані літературних джерел щодо протизапальної, гепатопротекторної, а також антиапоптичної дії IGF-1, виявлене збільшення його рівня на тлі введення глютаргіну може свідчити про активацію регенерації печінки.

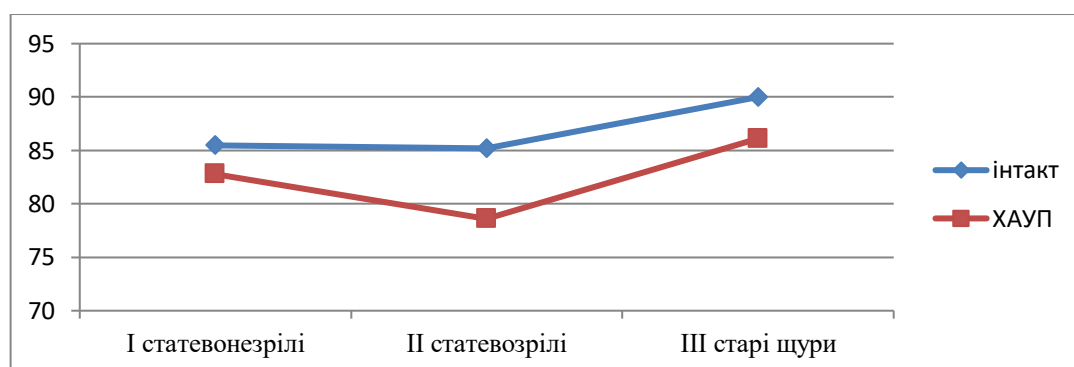


Рис 2. Вікові зміни відсотку ядер гепатоцитів, які перебувають у G_0G_1 -фазі клітинного циклу ядерної ДНК у інтактних щурів та щурів із ХАУП.

Згідно з цитофлуориметричними дослідженнями встановлено, що у старих тварин контрольної групи відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у фазі G_0G_1 , був найвищим проти показників статевозрілих і статевонезрілих щурів (рис. 2). Відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у G_2M -фазі та S-фазі з віком зменшувався, відповідно (рис. 3, 4), індекс проліферації у старих тварин також мав найнижче значення, що узгоджується із даними. Отримані дані можуть свідчити про зниження процесів регенерації у печінці з віком через накопичення продуктів вільнорадикального окиснення, порушення елімінації продуктів життєдіяльності гепатоцитів, зменшення довжини теломера, розвитку апоптозу, а також зниження процесів проліферації гепатоцитів унаслідок зниження чутливості до факторів росту.

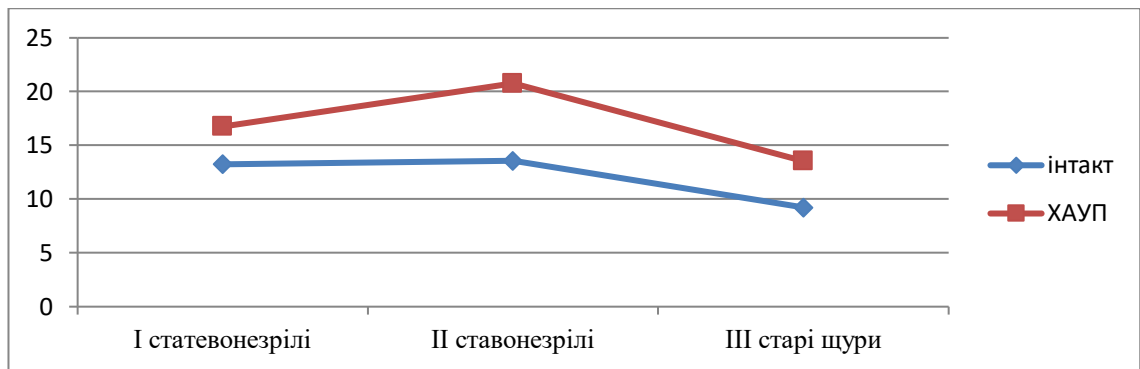


Рис. 3. Вікові зміни відсотку ядер гепатоцитів, які перебувають у G_2M -фазі клітинного циклу ядерної ДНК у інтактних щурів та щурів із ХАУП.

Зменшення кількості ядер гепатоцитів, що перебувають у S-фазі клітинного циклу, може бути внаслідок природного зниження мітотичної активності гепатоцитів з віком (рис. 4). Збільшення кількості ядер гепатоцитів, що перебувають у G_0G_1 -фазі та взаємопов'язане з цим зменшення кількості ядер клітин печінки, що перебувають у G_2M -фазі клітинного циклу у старих тварин, може бути через знижену відповідь на оксидативний стрес, зменшення експресії ростових регуляторних генів та темпів репарації ДНК гепатоцитів у тварин цієї вікової категорії.

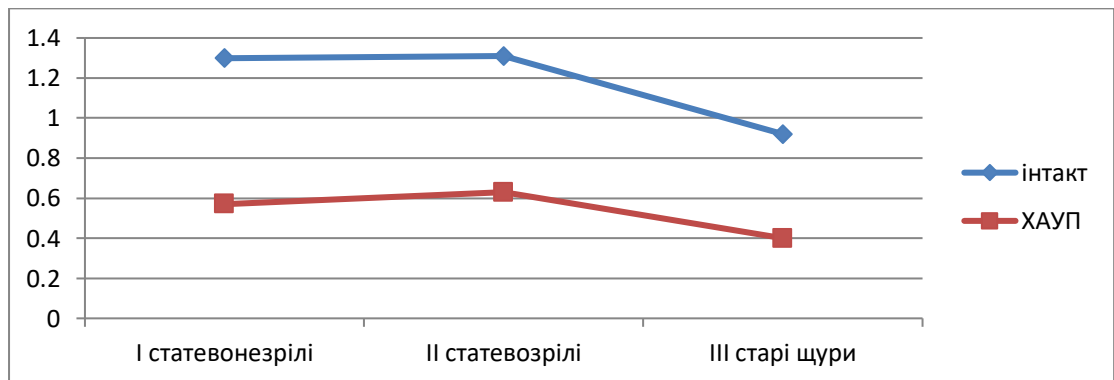


Рис. 4. Вікові зміни відсотку ядер гепатоцитів, які перебувають у S-фазі клітинного циклу ядерної ДНК у інтактних щурів та щурів із ХАУП.

Установлено, що при ХАУП відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у фазі G_0G_1 був меншим за контроль відповідного віку (рис. 2): у I-й віковій категорії – на 3,1 %, у II-й – на 7,6 % та у III-й – на 4,2 % ($p < 0,05$). На тлі ХАУП у всіх дослідних тварин відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у S-фазі був

меншим за контроль (рис. 4): у щурів I-ї вікової категорії – на 56,2 %, у II-й – на 51,9 % та у III-й – на 56,5 % ($p<0,05$), що може бути ознакою зниження біосинтетичних процесів у гепатоцитах. Вміст ядерної ДНК клітин печінки, які перебувають у G_2M -фазі був більшим у щурів на тлі ХАУП (рис. 3): у I-й віковій категорії – на 26,7 %, у II-й – на 53,1 %, та в III-й – на 46,7 % ($p<0,05$) порівняно із контролем.

На тлі введення кверцетину та глутаргіну відсоток ядер гепатоцитів, які перебували у G_0G_1 -фазі, був більшим у статевозрілих щурів на 4,1 і 5,6 % ($p<0,05$), порівняно із значеннями ХАУП. Відсоток ядер гепатоцитів, які перебували у S-фазі, був більшим на тлі застосування кверцетину порівняно із показниками тварин із ХАУП: у I-й віковій категорії – у 2,5 рази ($p<0,05$), у II-й – у 2 рази ($p<0,05$) та у III-й – лише у 0,3 рази. При введенні глутаргіну у статевонезрілих щурів відсоток ядер клітин печінки, які перебували у фазі S також був більшим на 84,2 % у статевонезрілих та на 58,7 % – у статевозрілих щурів, ($p<0,05$) у порівнянні із ХАУП. На тлі введення кверцетину та глутаргіну у старих щурів отримані дані при порівнянні із ХАУП не відрізняються, що може відбуватись унаслідок виснаження захисних механізмів та зниження резистентності організму в процесі старіння, оскільки знижується синтез ДНК та мітотична активність гепатоцитів.

Провівши кореляційний аналіз отриманих результатів досліджень у щурів із ХАУП між основними показниками клітинного циклу гепатоцитів і рівнем IGF-1, виявлено низку кореляційних зв'язків. Встановлено, що у тварин, яким моделювали ХАУП переважали кореляційні зв'язки середньої сили, дещо менша кількість – сильних зв'язків, що представлено у таблиці 1, у старих тварин подібних особливостей невиявлено.

Таблиця 1. Показники кореляції (r) IGF-1 та показників клітинного циклу в щурів різних вікових категорії на тлі ХАУП

Показники клітинного циклу:	I статевонезрілі щури	II статевозрілі щури
G_0G_1	-0,45	0,60*

S	-0,53*	0,87*
G ₂ M	0,67*	-0,60*

Примітка. r – показник кореляції по Спірмену; * – достовірність відмінностей ($p < 0,05$), ** – достовірність відмінностей ($p < 0,01$).

Висновки: На тлі ХАУП у всіх вікових категоріях знижувалася концентрація інсуліноподібного фактора росту-1. Введення кверцетину призводило до збільшення вмісту інсуліноподібного фактора росту-1 у старих тварин, в той час як у статевозрілих тварин він знижувався. Глутаргін підвищував концентрацію інсуліноподібного фактора росту-1 у статевонезрілих щурів на 37,4 % та у старих щурів на 85,2 %, підвищуючи регенерацію печінки.

Установлено, що застосування глутаргіну достовірно відновлювало наступні показники фаз клітинного циклу у порівнянні із ХАУП: відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у G₀G₁-фазі, G₂M-фазі, що може бути ознакою репаративної регенерації печінки за механізмом проліферації. Дійсно, у щурів на тлі введення глутаргіну відсоток ядер клітин печінки, які перебували у G₂M-фазі, був меншим у всіх вікових категоріях тварин.

Література:

1. Серебренникова С.Н. Роль цитокинов в воспалительном процессе / С. Н. Серебренникова, И. Ж. Семинский // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 6. – С. 5-8.
2. Про- и противовоспалительные медиаторы у новорожденных с перинатальной патологией / Г. Н. Чистякова, И. И. Ремизова, И. А. Газиева, С. В. Бычкова, Е. В. Занина, Б. Т. Чарипова // Рос. вестник перинатологии и неопедиатрии. – 2014. – № 2. – С. 66-70.
3. Галкин А. А. Нейтрофилы и синдром системного воспалительного ответа / А. А. Галкин, В. С. Демидова // Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. – Том 2, Vol. 2. – 2015. – С. 25-31.
4. Receptors for the Liver Synthesized Growth Factors IGF–1 and HGF/SF in Uveal Melanoma: Intercorrelation and Prognostic Implications / M. A. Economou, C. All–

Ericsson, V. Bykov [et al.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science: Anatomy and Pathology / Oncology. – 2005. – Vol. 46, Is. 12. – P. 4372–4375.

5. Relationships Between IGF–1 and IGFBP–1 and Adiposity in Obese African–American and Latino Adolescents / L. T. Alderete, C. E. Byrd–Williams, C. M. Toledo–Corral [et al.] // J. Obesity. – 2010. – №5. – P. 1–6.

6. Ковалёв Г. А., Петренко А. Ю. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс // Вісн. Харк. нац. унів. – 2004. – № 617. – С. 15 – 18.