

Цвіговський В.М.

**ОСОБЛИВОСТІ ПРОДУКЦІЇ ІНТЕРЛЕЙКІНА - 1 В В КРОВІ ЩУРІВ ПІСЛЯ
ТРИВАЛОЇ ДІЇ ЗАГАЛЬНОГО Г-ОПРОМІНЕННЯ В СУМАРНІЙ ДОЗІ 1,0 ГР**
Одеський державний медичний університет

Вступ. Цитокіни являють собою клас білків неімуноглобулінового походження, які синтезуються переважно активованими клітинами імунної системи і в яких відсутня специфічність по відношенню до антигенів [1]. Встановлено, що цитокіни відіграють важливу роль в регуляції імунних і запальних реакцій, а також в процесах диференціювання і проліферації різних типів клітин, виконуючи біологічну функцію через взаємодію зі специфічними рецепторами, розташованими на поверхні клітин [2]. Результатом дії цитокінів може бути активація чи інгібування однієї, або відразу декількох функцій клітини. До цитокінів також відносяться інтерлейкіни (ІЛ) і зокрема ІЛ-1. Існують два різновиди ІЛ: 1α і 1β [3]. Оскільки на сьогодні відомо [4], що іонізуюча радіація в низьких дозах викликає досить істотні зміни імунного статусу організму людини, то дослідження функціонального стану цитокінової ланки клітинного імунітету за умов радіаційних уражень може мати не аби які значення як для фундаментальної науки, так і практичної медицини. Не дивлячись на актуальність цієї проблеми в доступній літературі практично відсутні дані які б торкались цього питання.

Мета дослідження. З'ясувати особливості продукції цитокіна ІЛ-1 β , та виявити вміст його у сироватці крові щурів після тривалого загального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 108 статевозрілих щурах-самцях лінії „Вістар”, масою 180-200 г., які утримувались в стандартних умовах віварію Одеського державного медичного університету. У відповідності до мети дослідження усіх тварин було розподілено на дві слідуєчі групи : 1) інтактні (контроль); 2) після тривалого загального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр. Опромінення експериментальних тварин проводили у спеціально виготовлених клітках-фіксаторах на гамма-терапевтичній установці АГАТ-Р № 83 за слідуєчих технічних умов: потужність дози 1,07 Гр/хв., розмір поля 20×20 см, відстань джерело-поле 75 см, одноразова доза 0,1 Гр, експозиція 5,6 сек., кількість повторів – 10, сумарна доза 1,0 Гр. Експериментальних тварин забивали під ефірним наркозом через 24, 48, 72, 99 і 120 годин після завершення дії радіаційного фактору. Після декапітації кров збирали до сухої чистої пробірки, після утворення згустку „обводили” сухою склянкою паличкою і центрифугували 10 хвилин при 350g. Отриману сироватку відбирали до чистої пробірки і заморожували при -20°С. Для визначення цитокіна використовували тест-систему фірми „Протеїновий контур”. Кількісну оцінку проводили методом побудови калібрувального графіку за допомогою програми „Microplate manager” яка відзеркалювала залежність оптичної щільності від концентрації стандартного розчину і дозволяла порівняння з ним досліджуваних зрізів.

Результати дослідження та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що тривала дія загального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр призводила до неоднозначних змін спонтанної і індукованої продукції ІЛ-1 β мононуклеарами периферійної крові (МНПК). Так, через 24 години по завершенні дії радіаційного фактору інтенсивність спонтанної продукції ІЛ-1 β посилювалась порівняно з контролем на 26,7%, а індукованої на 18,3% (табл. 1). Через 48 годин

після γ -опромінення активність спонтанної продукції продовжувала достовірно зростати як по відношенню до показників попереднього терміну, так і контролю і стосовно останнього при цьому дорівнювала 165,6%. У цей же час спостерігалось і досить істотне посилення індукованої продукції ІЛ-1 β МНПК по відношенню до показників на 24 години і контролю, при цьому перевершуючи останній на 45,3%. На третю добу після завершення дії іонізуючого фактору інтенсивність спонтанної та індукованої продукції інтерлейкіну ІЛ-1 β МНПК досягала максимальних значень порівняно з аналогічними показниками в усіх попередніх термінах досліджень і при цьому була вищою за її значення в інтактних тварин відповідно на 110,2 і 78,2%. Отже і в даному випадку найбільш глибокі зміни відзначались на третю добу після γ -опромінення.

Таблиця 1

Показники продукції ІЛ-1 β in vivo і in vitro (M \pm m; n=6; пг/мл)

Умови досліджу	ІЛ-1 β		
	Продукція МНПК		
	Спонтанна	Індукована	В сироватці крові
Контроль	350 \pm 12,7	1860 \pm 23,4	0
Через 24 години	443 \pm 35,2	2200 \pm 65,6	0
Через 48 годин	579,6 \pm 48,8	2702 \pm 58,1	0
Через 72 години	736 \pm 22,5	3314 \pm 62,8	0
Через 96 годин	649 \pm 32,5	3019 \pm 78,2	0
Через 120 годин	603 \pm 29,1	2892 \pm 83,8	0

P < 0,05 стосовно контролю в усіх випадках

Таблиця 2

Вплив тривалого γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр на показники клітинного імунітету (M \pm m; n=6)

Умови досліджу	СД 4 ⁺		СД 8 ⁺		СД 16 ⁺		СД 20 ⁺	
	%	мм ³	%	мм ³	%	мм ³	%	мм ³
Контроль	27,0 \pm 0,9	580 \pm 28,6	22,5 \pm 0,7	560 \pm 22,3	18,3 \pm 0,5	380 \pm 25,2	18,0 \pm 0,9	362 \pm 19,6
Через 24 години	21,7 \pm 0,3*	485 \pm 31,3*	19,8 \pm 0,4*	449 \pm 38,2*	17,3 \pm 0,8	374 \pm 31,0	15,8 \pm 0,4*	290 \pm 15,3*
Через 48 годин	19,0 \pm 0,7*	422 \pm 46,5*	16,5 \pm 0,3*	368 \pm 42,1*	14,2 \pm 1,1*	305 \pm 43,2*	13,1 \pm 0,6*	248 \pm 23,1*
Через 72 години	13,5 \pm 0,3*	348 \pm 58*	14,2 \pm 0,2*	334 \pm 32,5*	12,8 \pm 0,9*	275 \pm 26,2*	11,9 \pm 0,3*	201 \pm 12,5*
Через 96 годин	17,7 \pm 0,6*	403 \pm 43*	17,0 \pm 0,7*	424 \pm 47,2*	14,7 \pm 0,7*	308 \pm 27,0*	12,6 \pm 0,8*	262 \pm 10,8*
Через 120 годин	19,5 \pm 0,4*	406 \pm 51*	18,2 \pm 0,9*	436 \pm 68,1*	20,1 \pm 1,3	333 \pm 46*	13,8 \pm 0,2*	313 \pm 17,6*

* P < 0,05 стосовно контролю

Таблиця 3

Вплив тривалого тотального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр на спонтанну і індуковану продукцію ІЛ-1 β у перерахуванні на клітину-продуцент (n=6; пг)

Умови досліджу	Продукція	
	Спонтанна	Індукована
Контроль	3,2 \times 10 ⁻⁴	1,8 \times 10 ⁻³
Через 24 години	4,8 \times 10 ⁻⁴	2,2 \times 10 ⁻³
Через 48 годин	5,4 \times 10 ⁻⁴	2,4 \times 10 ⁻³
Через 72 години	6,4 \times 10 ⁻⁴	2,9 \times 10 ⁻³
Через 96 годин	5,8 \times 10 ⁻⁴	2,7 \times 10 ⁻³
Через 120 годин	5,5 \times 10 ⁻⁴	2,1 \times 10 ⁻³

P < 0,05 стосовно контролю в усіх випадках

Через чотири доби після завершення дії іонізуючого фактору спостерігалось зниження активності спонтанної і індукованої продукції інтерлейкіну ІЛ-1 β МНПК

порівняно з аналогічними показниками третьої доби, але вона залишалась вищою як за значення на першу і другу добу, так і контроль переважаючи останній відповідно на 85,6 і 62,3%. На п'яту добу після γ -опромінення інтенсивність спонтанної і індукованої продукції інтерлейкіну ІЛ-1 β продовжувала знижуватись відносно її значень на четверту добу, але при цьому була вища ніж на першу і другу добу і стосовно до контролю відповідно дорівнювала 172,3 і 155,5%. Індукована активність і рівень ІЛ-1 β у сироватці крові не проявлялась. Підвищена спонтанна і індукована продукція ІЛ-1 β МНПК є свідченням про наявність ендогенної активації мононуклеарів периферійної крові.

У зв'язку з тим, що лімфоцитами продуцентами ІЛ-1 β є СД 4 $^{+}$ -, СД 8 $^{+}$, СД 16 $^{+}$ - і СД 20 $^{+}$ - лімфоцити, вище перераховані субпопуляції були досліджені на різних етапах після радіаційного ураження (табл.2). В результаті таких досліджень встановлено, що через 24 години після γ -опромінення спостерігалось достовірне зниження відносної і абсолютної кількості СД 4 $^{+}$ -, СД 8 $^{+}$ - і СД 20 $^{+}$ - лімфоцитів порівняно з аналогічними показниками інтактних тварин. Виключення в даному випадку складала тільки кількість СД 16 $^{+}$ - лімфоцитів, яка практично не відрізнялась від показників контролю. Через 48 годин після γ -опромінення відносна і абсолютна кількість СД 4 $^{+}$ -, СД 8 $^{+}$ -, СД 16 $^{+}$ - і СД 20 $^{+}$ - лімфоцитів продовжувала знижуватись як по відношенню до попередніх показників, так і контролю і стосовно до останнього відповідно дорівнювала 70,3 і 72,8%, 73,4 і 64,8, 77,6 і 80,2%. 72,5 і 68,6%. Звертає на себе увагу і той факт, що найбільш виразних змін на даному етапі досліджень зазнавала відносна і абсолютна кількість СД 8 $^{+}$ - і СД 20 $^{+}$ - лімфоцитів. На третю добу після завершення дії загального γ -опромінення спостерігались найбільш глибокі зміни кількості усіх форм лімфоцитів порівняно з їх показниками на першу і другу добу та з контролем. Слід підкреслити, що в даному випадку найбільш глибокого зниження зазнала відносна і абсолютна кількість СД 4 $^{+}$ - і СД 20 $^{+}$ - лімфоцитів і при цьому стосовно до контролю вона відповідно дорівнювала 50,1 і 60,1% і 66,4 і 55,4%. На четверту добу по завершенні дії тривалого γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр спостерігалась тенденція до збільшення відносної і абсолютної кількості усіх популяцій лімфоцитів порівняно з їх показниками на третю добу, але їх значення залишались нижчими від рівня першої і другої доби і інтактних тварин. Через п'ять діб після γ -опромінення тенденція до збільшення СД 4 $^{+}$ -, СД 8 $^{+}$ -, СД 16 $^{+}$ - і СД 20 $^{+}$ - лімфоцитів зберігалась, але рівня інтактних тварин досягали тільки СД 20 $^{+}$ - лімфоцити. Сума клітин продуцентів ІЛ-1 β для інтактних тварин дорівнювала 1882, через 24 години після γ -опромінення їх кількість становила 1598, через 48 годин – 1338, через 72 години – 1158, через 96 годин – 1397, через 120 годин – 1488. При перерахуванні спонтанної і індукованої продукції ІЛ-1 β на клітину продуцент (Т-, В- і Нк-клітини) були отримані наступні результати (табл. 3). Через 24 години після γ -опромінення спонтанна продукція ІЛ-1 β переважала рівень інтактних тварин на 50,3%, а індукована на 20,1%; через 48 годин - на 68,7 і 35,3%; через 72 години - на 98,6 і 60,3%; через 96 годин - на 81,2 і 48,2% і через 120 годин – на 72,8 і 15,4%. Як свідчать наведені результати досліджень, при перерахуванні на клітину продуцент виявлені тенденції в порушенні спонтанної і індукованої продукції ІЛ-1 β збереглись на усіх етапах пострадіаційного періоду, а поступове зниження після третьої доби, очевидно, є свідченням виснаження функціональних резервів клітин відповідати продукцією ІЛ-1 β на антигенний стимул. У той же час відсутність ІЛ-1 β у сироватці крові периферійної крові усіх експериментальних груп можна пояснити наявністю розчинних форм рецептора до ІЛ-1 β , чи наявністю антитіл до ІЛ-1 β . Іншим можливим поясненням цього може бути продукція МНПК рецепторного антагоніста ІЛ-1 β (РАІЛ), який конкуруючи з ІЛ-1 β за зв'язування з рецептором ІЛ-1 І типу, інгібує аутокринну регуляцію МНПК, продукуємим ІЛ-1 β .

Висновки.

- 1.Тривала дія загального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр призводила до посилення спонтанної і індукованої продукції МНПК ІЛ-1 β з максимумом проявів на 72 годину. Вміст ІЛ-1 β сироватці крові не визначався.

2. Встановлено, що в опромінених тварин спостерігалось зниження кількості CD 4⁺ -, CD 8⁺ -, CD 16⁺ - і CD 20⁺ - лімфоцитів продуцентів ІЛ-1β.
3. Інтенсивність спонтанної і індукованої продукції ІЛ-1β в перерахуванні на клітину продуцент в опромінених щурів посилювалась, досягаючи максимальних значень на 72 годину. Після цього відбувалось її зниження, але у усіх випадках воно достовірно переважало контроль.

Ключові слова: цитокін, гама-опромінення, імунитет.

Література.

1. Симбирцев А. С. Биология семейства интерлейкина-1 человека // Иммунология. – 1998. – № 3. – С. 9 - 17.
2. Комалов З. С., Арипова Т. У., Маджидов А. В. Функциональная активность естественных киллеров и продукция интерлейкинов 1 и 2 у жителей Узбекистана // Иммунология. - 2000. - №6. - С. 51 - 54.
3. Ярилин А. А. Цитокины в тимусе. Выработка и рецепция цитокинов // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т.2, № 1. – С. 3 - 13.
4. Артамонов Н. О., Бусыгина Н. А., Губский В. И. Научно-исследовательский анализ проблем нарушений иммунного статуса человека под воздействием экстремальных факторов аварии на Чернобыльской АЭС // Иммунология. – 1993. – № 2. – С. 38 - 60.

Summary.

V.M.Tsvigovsky.

PERCULIARITIES OF INTERLEUKINE –1BETA PRODUCTION IN THE BLOOD OF RATS AFTER A PROLONGED ACTION OF TOTAL IRRADIATION IN THE DOSE OF 1 GR

It has been estimated that a prolonged action of gamma-irradiation in the dose 1 Gr caused enforcement of spontaneous and induced production by peripheral blood mononuclears IL-1beta on all the stage of the experiment. Maximum changes has been observed after 72 hours of irradiation. Together with it they observed the decrease of CD 4⁺ -, CD 8⁺ -, CD 16⁺ -, CD20⁺ - lymphocytes, producers of IL-1beta. Such changes led to the increase of spontaneous and induced production of IL-1beta reaccounted for each cell - producer.