

Материал поступил в редакцию: 10-11-2014

Материал принят к печати: 17-12-2014

УДК 613.3;616:612.017.1

## The cytokine status in experimental heliotrinic hepatitis

**SABIROVA RA., KULMANOVA MU.**

*Tashkent Medical Academy, Tashkent, Republic of Uzbekistan*

**The aim.** To study cytokines in experimental hepatitis depending on the timing of study.

**Methods.** Experiments were carried on 60 white male rats weighing 100-120 g. Heliotrinic hepatitis (HH) was reproduced by oral injection of heliotrin solution, acidified with hydrochloric acid (pH 7.0) at the rate of 50 mg / kg (5 mg heliotrin per 100g) weight once a week for 42 days. Then animals were decapitated on the 60th, 90th and 120th days of the experiment.

Interleukin (IL-1b, IL-2, IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) were determined on ELISA analyzer of «Stat-Fax» (USA) firm using a set of test kits produced by LTD «Cytokine» (St. Petersburg).

**Results.** In the dynamics of the development experimental heliotrinic hepatitis set of induction of cytokines IL-1b, IL-2, IL-6, the most increase these cytokines in comparison with intact animals was on the 90th day of the experiment.

**Conclusion.** Immune dysfunction plays an important role in progression of pathophysiological processes, in course, severity and outcome of the disease in heliotrinic hepatitis.

**Keywords:** hepatitis, cytokines, heliotrinic

*J Clin Med Kaz 2014; 4(34): 46-48*

Автор для корреспонденции: Сабирова Рихси Абдукадировна, Ташкентская медицинская академия, г. Ташкент, Республика Узбекистан, E-mail: sabirovara@yandex.cjm

### ТӘЖІРИБЕЛІК ГЕЛИОТРИНДІ ГЕПАТИТ КЕЗІНДЕГІ ЦИТОКИН СТАТУСЫНЫҢ ЖАҒДАЙЫ

Сабирова Р.А., Кульманова М.У.

Ташкент медицина академиясы, Ташкент, Өзбекістан Республикасы

**Мақсаты.** Зерттеудің уақытына байланысты тәжірибелік гепатит кезіндегі цитокиндер мөлшерін зерттеу.

**Методы.** Тәжірибеде салмағы 100-120 г. болатын асыл текті емес ұрғашы ақ түсті 60 егеуқұйрық қолданылды. Гелиотринді гепатит дамуы үшін ішке 42 күн бойына аптасына 1 рет тұзды қышқылмен (рН 7,0) қышқылдатылған гелиотрин 50 мг/кг есебінен (100 г.ға 5 мг гелиотрин) берілді. Жануарларды тәжірибенің 60-шы, 90-шы және 120-шы күндері өлтірілді. Интерлейкиндер деңгейін (ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6) және альфа-некротоз факторын (ФНО- $\alpha$ ) «Stat-Fax» фирмасының иммуноферментті анализаторында (США) «Цитокин» ААК (Санкт-Петербург) шығарған тест-жүйесінің көмегімен анықтадық.

**Нәтижесі.** Тәжірибелік гелиотринді гепатиттің дамуы барысында ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6 цитокиндерінің индукциясы анықталды. Интактты жануарлармен салыстырғанда цитокиндің құрамының өсуі гелиотринді гепатиттің дамуының 90-шы күні айқын байқалды.

**Қорытынды.** Гелиотринді гепатит кезінде физиологиялық процесстердің бұзылуында иммунды дисфункциялардың маңызы зор. Аурудың ағымы мен нәтижесі иммунды дисфункцияның ауырлық дәрежесімен тығыз байланысты.

**Маңызды сөздер:** гепатит, цитокиндер, гелиотрин

### СОСТОЯНИЕ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕЛИОТРИНОВОМ ГЕПАТИТЕ

Сабирова Р.А., Кульманова М.У.

Ташкентская медицинская академия, г. Ташкент, Республика Узбекистан

**Цель.** Изучение уровня цитокинов при экспериментальном гепатите в зависимости от сроков исследования.

**Методы.** Эксперименты проведены на 60 белых беспородных крысах самцов массой 100-120 г., гелиотриновый гепатит (ГГ) воспроизводили пероральным введением раствора гелиотрина, подкисленного соляной кислотой (рН 7,0) из расчета 50 мг/кг (5 мг гелиотрина на 100 г) массы один раз в неделю на протяжении 42 дней, животных забивали на 60-, 90-й и 120-й дни от начала эксперимента.

Уровень интерлейкинов (ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) определяли на иммуноферментном анализаторе фирмы «Stat-Fax» (США) с использованием набора тест-систем производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

**Результаты.** В динамике развития экспериментального гелиотринового гепатита установлена индукция цитокинов ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6, наиболее выраженное увеличение их содержания по сравнению с интактными животными установлено на 90-й день развития гелиотринового гепатита.

**Заключение.** В нарушении физиологических процессов при гелиотриновом гепатите, важную роль играют иммунные дисфункции, от степени выраженности которых зависят течение и исход заболевания.

**Ключевые слова:** гепатит, цитокины, гелиотрин.

## ВВЕДЕНИЕ

Цитокины - белковые продукты преимущественно активированных клеток иммунной системы, лишенные специфичности в отношении антигенов и обуславливающие межклеточные коммуникации при иммунном ответе [1], однако если имеется гиперпродукция цитокинов возможно повреждение печени. Большинство цитокинов образуются в печени при действии различных факторов. Провоспалительные цитокины ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 и ИЛ-6 секретируются клетками Купфера при гепатитах. Этот эффект сопряжен с синтезом белков острой фазы и повышением адгезии нейтрофилов в синусоидах. Считают, что ИЛ-1 определяет механизмы некроза и нарушения транспортных систем, ИЛ-6 стимулирует

синтез белков острой фазы, ИЛ-8 служит потенциальным хемоаттрактантом для нейтрофилов [2].

В последние десятилетия открытие цитокинов и их регулирующей роли в иммунном ответе определили приоритеты исследований в этом направлении при различных патологических процессах. Свойства цитокинов и функционирование цитокиновой сети подробно описаны в литературе [3-5], однако отсутствуют данные об изменении содержания цитокинов при гелиотриновом гепатите в зависимости от сроков исследования.

**Цель исследования:** изучение уровня цитокинов при экспериментальном гепатите в зависимости от сроков исследования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Дизайн исследования при проведении опытов руководствовались международными нормами, принятыми при работе с экспериментальными животными. В работе использовано 60 белых беспородных крыс-самцов массой 100-120 г. Гелиотриновый гепатит (ГГ) воспроизводили пероральным введением раствора гелиотрина, подкисленного соляной кислотой (рН 7,0) из расчета 50 мг/кг (5 мг гелиотрина на 100 г) массы один раз в неделю на протяжении 42 дней по методике Н. Х. Абдуллаева и соавт. [6]. Летальность составила 8%. Животных забивали на 60-, 90-й и 120-й дни от начала эксперимента.

Цитокины в сыворотке крови изучали с помощью иммуноферментного анализа. Уровень интерлейкинов

(ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) определяли на иммуноферментном анализаторе фирмы «Stat-Fax» (США) с использованием набора тест-систем производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Единица измерения- пг/мл.

Результаты исследования обрабатывали с помощью прикладных программ Statistica 6, Biostat. Данные представлены в виде средних арифметических значений (M) и стандартных отклонений (m). Для сравнения выборок применяли t-критерий Стьюдента или парный критерий Вилконсона. Значимость считали достоверной при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования цитокинов в сыворотке крови при гелиотриновом гепатите представлены в таблице. Содержание ИЛ-1b на 60-, 90- и 120-й дни увеличивается 1,6; 2 и 1,8 раза соответственно по сравнению интактной группой.

Содержание ИЛ-2 во все сроки исследования достоверно увеличено 1,4; 2,1 и 1,7 раза соответственно по сравнению с интактной группой. Такая же картина установлена при исследовании содержания ИЛ-6,

увеличение данного цитокина на 60-, 90- и 120-й день развития гелиотринового гепатита по сравнению с интактной группой составило 1,5; 1,9 и 1,7 раза соответственно. Наиболее выраженное увеличение содержания ИЛ-1b, ИЛ-2 и ИЛ-6 наблюдается на 90-й день развития гелиотринового гепатита: по сравнению с интактными животными и оно составило 2; 2,1 и 1,9 раза соответственно.

**Таблица 1.** Содержание цитокинов(пг/мл) в крови в динамике развития гелиотринового гепатита, M $\pm$ m

Показатели	Интактная группа	Гелиотриновый гепатит, день		
		60 -й	90-й	120-й
ИЛ-1b	29,1 $\pm$ 2,28	46,8 $\pm$ 2,76	57,05 $\pm$ 2,54	52,7 $\pm$ 1,27
ИЛ-2	23,9 $\pm$ 1,8	34,23 $\pm$ 2,46	50,5 $\pm$ 4,92	40,1 $\pm$ 3,78
ИЛ-6	26,02 $\pm$ 1,84	40,4 $\pm$ 1,49	50 $\pm$ 3,37	44,6 $\pm$ 2,8
ФНО- $\alpha$	3,98 $\pm$ 0,26	7,93 $\pm$ 0,4	12,18 $\pm$ 0,93	10,3 $\pm$ 0,72

*Примечание. Во всех случаях  $P < 0,05$  по сравнению с интактными животными*

Установлено увеличение содержания ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови во все сроки развития гелиотринового гепатита. На 60-е и 120-е сутки эксперимента уровень данного цитокина по сравнению с интактными животными возрастает 2 и 2,6 раза соответственно. Наиболее

выраженное увеличение данного цитокина установлено на 90-день эксперимента, оно составило 3,1 раза по сравнению с интактными животными.

## ОБСУЖДЕНИЕ

ФНО- $\alpha$  вместе с ИЛ-6 усиливает пролиферацию и дифференциацию В-лимфоцитов, а с ИЛ-2 и ИЛ-8 - пролиферацию Т-лимфоцитов. Повышение уровня ФНО- $\alpha$  на протяжении продолжительного времени угнетает активность Т-хелперов 1-го типа (Тх1), а следовательно, и клеточный иммунный ответ [7,8]. ФНО усиливает цитотоксичность моноцитов и макрофагов, является одним из главных медиаторов цитотоксичности НК-клеток против вирус-индуцированных клеток. В последние годы установлено, что ФНО- $\alpha$  индуцирует апоптоз зрелых Т-лимфоцитов [7]. Наличие этого цитокина в крови отмечено на ранних этапах патологического процесса. Он имеет выраженное плейотропное действие, вовлекается как в эффекторное, так и гуморальное звено иммунной реактивности человека [9,10].

Установленная [11] между уровнем ФНО- $\alpha$ , INF- $\gamma$  и содержанием цитолитических ферментов, морфологическими изменениями печени зависимость указывает на повреждение печени. ФНО- $\alpha$  при участии INF- $\gamma$  способен оказывать прямое цитотоксическое действие на гепатоциты обоих механизмов. Кроме того, аутокринная активация макрофагов под влиянием ФНО- $\alpha$  сопровождается выработкой

избыточных количеств РФК и оксида азота, обладающих цитотоксическим эффектом [12-14].

Установленное нами повышение содержания ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1b, ИЛ-2 и ИЛ-6 в сыворотке крови во все сроки развития гелиотринового гепатита, особенно на 90-й день его развития, указывает на их ключевую роль в повреждении печени. Именно с их действием Маевская М.В., Бугверов А.О. [15] связывают такие клинические признаки заболевания, как потеря массы тела, холестаза, фиброз, гипергаммаглобулинемия, синтез острофазовых белков. Считают, что интерлейкин-6 и ФНО- $\alpha$  вовлечены в развитие холестаза и синтез острофазовых белков. Первое патофизиологическое событие при алкогольном повреждении печени – это продукция ФНО- $\alpha$ , который стимулирует выработку других цитокинов. Последние участвуют в привлечении воспалительных клеток в зону повреждения, что в результате приводит к гибели гепатоцитов. Вместе с тем инициируются репаративные процессы, к которым относится и фиброгенез. У пациентов с прогрессирующим повреждением печени баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами изменяется в пользу первых, что препятствует естественному контролю организма над воспалением и фиброгенезом [15].

## ВЫВОДЫ

В нарушении физиологических процессов при гелиотриновом гепатите важную роль играют иммунные дисфункции от которых зависят течение и исход заболевания. Информативными маркерами последних являются цитокины. Биологическая роль этих регуляторных

пептидов неоспорима в развитии воспалительных и репаративных процессов в тканях.

Работа выполнена по гранту ФС-СС-0-61467 ФДСС 12-14.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Jarilin A.A. Osnovy immunologii (Fundamentals of Immunology), M.: Medicina, 1999, 608 p.
2. Okovityj S.V. Klinicheskaja farmakologija gepatoprotektorov (Clinical farmakologiya hepatoprotectors), Farm-indeks Praktik, 2002, No.3, pp.28-38.
3. Nazarov P.G. Reaktanty ostroj fazy vospaleniya (Acute phase reactants of inflammation), SPb, Nauka, 2001.
4. Sistema citokinov: teoreticheskie i klinicheskie aspekty (System cytokines: theoretical and clinical aspects). pod red. V.A. Kozlova, S.V. Sennikova. Novosibirsk: Nauka, 2004.
5. The Cytokine Handbook. Ed. by A. Thomson. London: Acad. Press, 1992.
6. Abdullaev N. H., Klejner S. I., Ruzibakiev R. M. Vlijanie razlichnyh pesticidov na funkcional'noe sostojanie pecheni v zavisimosti ot dlitel'nosti ih vozdeystvija (Effect of different pesticides on the functional state of the liver depending on the duration of their effects), Med zhurn Uzbekistana, 1985, No.7, pp.45-7.
7. Diagnostichne znachennja citokinovogo profilju krovi pri hronichnih gepatitah (Diagnostic value of blood cytokine profile in chronic hepatitis), Metod. Rekomendacii, Ukl.С. М. Nejko, Iv.-Frankivs'k, 2003, 22pp.
8. Herbein G., O'Brien W. A. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis, Proc Soc Exp Boil Med, 2000, 223, pp.241-57.
9. Jakobisjak M. Immunologija (Immunology). Per. iz pol'skogo. Nova kniga, 2004, pp.672.
10. Mezenceva M. V., Narovljanskij A. N., Ospel'nikova T. P., Ershov F. I. Produkcija citokinov kletkami krovi pri gerpese, gepatite S i drugih formah patologii (Cytokine production by blood cells with herpes, hepatitis C and other forms of pathology), Vopr virusol, 2002, No.47(1), pp.44-47.
11. Mammaev S.N., Bagomedova N.V., Bogomolov P.O. i dr. Citokinovaja sistema pri nealkogol'nom steatogepatite (Cytokine system with nonalcoholic steatohepatitis), Original'nye issledovanija, 2007, No.4, pp.31-39.
12. Lukina E.A. Sistema mononuklearnih fagocitov i biologicheskie jeffekty provospalitel'nyh citokinov (Mononuclear phagocyte system and the biological effects of proinflammatory cytokines), Ros zhurn gastrojenterol gepatol koloproktol, 1998, No.8 (5), pp.7-13.
13. Simpson K.J., Lukacs N.W., Colletti L. et al. Cytokines and the liver. J Hepatol, 1997, No.27 (6), pp.1120-1132.
14. Xu Y., Jones B.E., Neufeld D.S., Czaja M.J. Glutathione modulates rat and mouse hepatocyte sensitivity to tumor necrosis factor- $\alpha$  toxin-city. Gastroenterology. 1998, No.115 (5), pp.1229-1237.
15. Maevskaja M.V., Bueverov A.O. Citokiny v patogeneze alkogol'nogo gepatita i vozmozhnosti terapii (Cytokines in the pathogenesis of alcoholic hepatitis and therapeutic options). Ros zhurn gastrojenterol gepatol koloproktol, 2009, No.19 (2), pp.14-19.