

ЛИТЕРАТУРА

1. Вагапова В. Ш. // Морфология. — 2004. — № 4. — С. 26.
2. Маланин Д. А., Новочадов В. В., Самусев С. П. // Вестник ВолГМУ. — 2009. — № 2 (30). — С. 7—13.
3. Amis A. A., Firer P. E., Thomas N. P. // Knee. — 2003. — Vol. 10, № 3. — P. 215—220.
4. Grood E. S., Suntay W. J. // J. Biomech. Eng. — 1983. — Vol. 105, № 2. — P. 136—144.
5. Maquet P. // Clin. Orthop. — 1976 — Vol. 115. — P. 225—228.
6. Odensten M., Gillquist J. // J. Bone Joint Surg. — 1985. — Vol. 67. — P. 257—262.
7. Ostermeier S., Hurschler C., Stukenborg-Colsman C. // Arthroscopy. — 2004. — Vol. 22, № 3. — P. 308—319.

8. Sandmeier R. H., Burks R. T., Bachus K. N. // Am. J. Sports Med. — 2000. — Vol. 28, № 3. — P. 345—349.
9. Steensen R. N., Dopirak R. M., McDonald W. G. // Am. J. Sports Med. — 2004. — Vol. 32, № 6. — P. 1509—1513.
10. Trent P. S., Walker P. S., Wolf B. // Clin. Orthop. — 1976. — Vol. 117. — P. 263—270.
11. Wang C. J., Walker P. S. // J. Biomech. — 1973. — Vol. 19. — P. 587—596.

Контактная информация

Новиков Дмитрий Александрович — аспирант кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ с курсом травматологии, ортопедии ФУВ, e-mail: novikov_trauma@mail.ru

УДК 612.352.3:616.157 - 612.014.44

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ BCL-2 И BAD В ПЕЧЕНИ КРЫС И УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ПЕРСИСТЕНЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ФОНЕ КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

**И. П. Жураковский, М. В. Битхаева, С. А. Архипов,
Т. А. Кунц, М. Г. Пустоветова, И. О. Маринкин**

Новосибирский государственный медицинский университет

Выявлена зависимость экспрессии белков семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bad) в печени крыс Wistar от уровня цитокинов (IL-1 β , IL-1 β RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , INF- γ) в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции, вызванной золотистым стафилококком (штамм 209) на фоне круглосуточного освещения.

Ключевые слова: бактериальная инфекция, золотистый стафилококк, маркеры апоптоза, Bcl-2, Bad, цитокины, круглосуточное освещение.

BCL-2 AND BAD PROTEINS EXPRESSION IN RAT LIVER AND CYTOKINES LEVEL IN BLOOD SERUM AT PERSISTING BACTERIAL INFECTION DURING ROUND-THE-CLOCK ILLUMINATION

I. P. Zhurakovsky, M. V. Bitkhaeva, S. A. Arkhipov, T. A. Kunts, M. G. Pustovetova, I. O. Marinkin

It was revealed that expression of Bcl-2 protein family (Bcl-2, Bad) in Wistar rat liver depends on cytokines (IL-1 β , IL-1 β RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , INF- γ) level in blood serum at persisting bacterial infection caused by Staphylococcus aureus (strain 209) during round-the-clock illumination.

Key words: bacterial infection, Staphylococcus aureus, apoptosis markers, Bcl-2, Bad, cytokines, round-the-clock illumination.

Длительное существование фокальной персистирующей инфекции вызывает определенное изменение функционирования основных гомеостатических систем и, как следствие, структурную перестройку органов и тканей. Имеются работы, в которых показано, что фокальная персистирующая инфекция, локализуемая вне печени, способна приводить к развитию неспецифического реактивного гепатита и фиброзным изменениям в печени [1]. Вместе с тем взаимосвязи между процессами, регулирующими апоптоз клеток печени, и изменениями цитокинового профиля остаются до конца не изученными. Особенный интерес, в этой связи, представляет изучение особенностей течения хронического воспалительного процесса на фоне воздействия раз-

личных дополнительных дестабилизирующих факторов, одним из которых является световой десинхроноз.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявление зависимости экспрессии белков Bcl-2 и Bad в печени крыс Wistar от уровня цитокинов в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции на фоне круглосуточного освещения.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на 18 половозрелых крысах-самцах Wistar с исходной массой 180—220 г. У 12 животных с помощью золотистого стафилококка (штамм 209) был воспроизведен остеомиелит большеберцовой кости.

Световой десинхроноз вызывали содержанием крыс при круглосуточном освещении в течение 2 недель через 1,5 месяца после момента инфицирования. Животных выводили из эксперимента через 2 и 3 месяца с момента воспроизведения модели. В качестве контроля использовали 6 интактных животных. Эксперимент выполнялся с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей.

Материал фиксировали в 12%-м формалине. Из залитых в парафин объектов делали серийные срезы толщиной 7 мкм, которые, для обзорной световой микроскопии, окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозинном. Для изучения экспрессии в клетках печени белков Vcl-2 и Bad использовали двухэтапный иммуногистохимический метод. Анализ интенсивности специфического окрашивания анти- и проапоптотических белков-регуляторов и площади, на которой они выявлялись, проводилась с помощью светооптического микроскопа и морфометрического комплекса на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13с фирмы Baumer и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для каждой группы оценивалось по 48 изображений, площадь одного из которых составляла 21455 мкм².

Исследование цитокинового профиля проводилось наборами реагентов для иммуноферментного определения концентрации (IL-1 β , IL-1 β RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , INF- γ) в сыворотке крови - производства ЗАО «Вектор Бест» (г. Новосибирск) с использованием Wellwasf 4 Mk2 фирмы Thermo scientific (Finland) и спектрофотометра Multiscan Spectrum фирмы Thermo scientific (Finland).

Статистическая обработка полученных в ходе исследования данных проводилась с использованием программного пакета для статистической обработки SPSS v 13.0 for Windows. Учитывая малое количество случаев в выборке, применяли непараметрические критерии. Сравнение независимых групп проводили с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна-Уитни. Различия между значениями сравниваемых параметров расценивались как статистически значимые при достижении уровня статистической значимости (p) менее чем 0,05 ($p < 0,05$). Полученные в ходе исследования данные представлены как средняя (M) \pm стандартная ошибка средней (m). С целью выявления наиболее информативного комплекса признаков осуществлялся корреляционный анализ путем вычисления коэффициента корреляции с помощью непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами было установлено, что персистенция бактериальной инфекции в большеберцовой кости сопровождается раз-

витием признаков неспецифического реактивного гепатита, который сохранял свою активность на протяжении всего эксперимента. Проведенное на этом фоне изучение экспрессии белков-регуляторов апоптоза позволило выявить определенную динамику изменений, касающихся экспрессии белков семейства Vcl-2 (табл. 1).

Таблица 1

Относительная площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими анти-(Vcl-2) и проапоптотический белок (Bad) в %, и интенсивность окрашивания клеточных элементов, экспрессирующих эти маркеры, у. е., ($M \pm m$)

Показатель	Инт.	ВД 2 мес.	ВД 3 мес.
Площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими Vcl-2	26,30 \pm 0,83	28,60 \pm 0,81	17,10 \pm 0,62*
Площадь, занимаемая гепатоцитами, экспрессирующими Bad	19,1 \pm 0,7	31,10 \pm 0,72*	31,6 \pm 0,8*
Интенсивность окрашивания клеточных элементов, экспрессирующих Vcl-2	28,6 \pm 0,6	41,30 \pm 0,71*	40,00 \pm 0,71*
Интенсивность окрашивания клеточных элементов, экспрессирующих Bad	30,70 \pm 0,41	45,90 \pm 0,61*	31,30 \pm 0,89

Примечание. Здесь и далее: Инт. — интактные животные, ВД 2 мес. — через 2 месяца после создания очага хронической инфекции на фоне светового десинхроноза, ВД 3 мес. — через 3 месяца после создания очага хронической инфекции, восстановительный период после светового десинхроноза.

*Достоверные отличия по сравнению с показателями интактной группы.

Так, через 2 мес. после создания очага хронической инфекции было отмечено, что проапоптотический белок Bad стал выявляться в значительно большем количестве гепатоцитов. При этом количество гепатоцитов, экспрессирующих Vcl-2, не изменилось. Интенсивность специфического окрашивания как к маркеру Vcl-2, так и Bad статистически значимо повысилась.

Известно, что Vcl-2 и его гомологи (Vcl-xL, Mcl-1 и др.) выполняют функцию защиты клеток от апоптоза. Фактор Vcl-2 поддерживает инактивированное состояние проапоптотического белкового комплекса, в состав которого входят прокаспаза-9 (Araf-3), адаптер Araf-1, флавопротеин A1F, цитохром c (Araf-2), фактор Smac [2, 6]. В то время как белок Bad относят к группе апоптозопосредующих факторов (наряду с Bax, Bak, Bik, Bid). Для переключения клетки в режим апоптоза необходимо связывание Vcl-2, что нейтрализует ингибирующее действие последнего. Такое связывание может осуществляться большинством из проапоптотических белковых факторов Vcl-2-семейства [2, 4].

Результаты исследования, полученные нами через 3 мес. после создания очага хронической бактериальной

инфекции, свидетельствуют о снижении относительной площади гепатоцитов, экспрессирующих Vcl-2, на фоне увеличения относительной площади клеточных элементов, экспрессирующих Vad. Это позволяет сделать предположение, что к одному из вероятных механизмов запуска апоптоза гепатоцитов при персистенции бактериальной инфекции можно отнести процесс гетеродимеризации Vcl-2, обусловленный одновременным снижением экспрессии белка Vcl-2 и повышением экспрессии в гепатоцитах белка Vad. Указанный процесс гетеродимеризации Vcl-2 может быть сопряжен с изменением степени фосфорилирования/дефосфорилирования белка-индуктора Vad. Как известно, в этих условиях Vad дефосфорилируется, образуются гетеродимеры Vcl-2/Vad и запускается процесс апоптоза за счет высвобождения митохондриальных факторов, при этом в конечном итоге происходит активация каспазы-9 [3, 5].

Данные изменения происходят на фоне изменения профиля цитокинов, что можно рассматривать как отражение состояния иммунной системы, наблюдаемого при персистенции бактериальной инфекции (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация цитокинов в сыворотке крови, пг/мл ($M \pm m$)

Цитокины	Инт	ВД 2 мес.	ВД 3 мес.
IL-1 β	3,9 \pm 0,33	5,20 \pm 0,83	4,30 \pm 0,21
IL-1 β RA	110,30 \pm 8,56	134,0 \pm 17,3	162,10 \pm 16,51*
IL-2	19,70 \pm 3,37	16,30 \pm 1,05	14,50 \pm 0,56
IL-4	3,20 \pm 0,05	3,80 \pm 0,03*	3,50 \pm 0,11
IL-6	5,00 \pm 0,12	5,80 \pm 0,43*	5,70 \pm 0,07*
IL-10	23,6 \pm 0,7	31,60 \pm 4,46	26,50 \pm 0,88*
IL-17	16,50 \pm 0,46	19,90 \pm 1,61	19,00 \pm 0,68*
IL-18	19,0 \pm 0,39	22,00 \pm 1,55	21,80 \pm 0,88*
IFN- γ	17,5 \pm 0,9	32,60 \pm 4,36*	19,20 \pm 0,64
TNF- α	5,80 \pm 0,21	6,00 \pm 0,39	6,50 \pm 0,23*

Через 2 мес. после воспроизведения бактериальной инфекции на фоне светового десинхроноза при поведении корреляционного анализа были получены результаты, указывающие на существование высоко значимой отрицательной зависимости, между концентрацией IL-18 в сыворотке крови животных этой группы и площадью клеточных элементов печени, экспрессирующих Vcl-2 ($r = -0,928$; $p = 0,008$). Кроме того, были выявлены высокозначимые положительные корреляционные связи между интенсивностью специфического окрашивания и концентрацией IL-10 ($r = 0,943$; $p = 0,005$), IL-17 ($r = 0,829$; $p = 0,042$), IL-1 β ($r = 0,829$; $p = 0,042$).

Через 3 мес. после воспроизведения бактериальной инфекции, в восстановительный период после светового десинхроноза, при поведении корреляционного анализа были получены результаты, указывающие на существование высокозначимой положительной зависимости между концентрацией INF- γ и относительной

площадью клеточных элементов, экспрессирующих Vcl-2 ($r = 0,870$; $p = 0,024$), а также высокозначимой положительной зависимости между концентрацией IL-17 в сыворотке крови животных этой группы и относительной площадью гепатоцитов со специфической окраской к маркеру Vad ($r = 0,886$; $p = 0,019$). Кроме того, были выявлены высокозначимые положительные зависимости между интенсивностью специфического окрашивания Vcl-2 и концентрациями IL-4 ($r = 0,899$; $p = 0,015$) и IL-17 ($r = 0,886$; $p = 0,019$).

Изменения концентрации цитокинов в сыворотке крови у экспериментальных животных, выявленные в настоящем исследовании, подтверждают то положение, что, являясь начальным звеном активации иммунного ответа, они не только определяют эффективность и тип иммунного реагирования на инфекционные агенты, принимая непосредственное участие в иммунологической защите, но и участвуют в регуляции апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать, с одной стороны, о том, что члены семейства белков Vcl-2 непрерывно взаимодействуют друг с другом, находясь в динамическом равновесии между гомо- и гетеродимерами, что может служить причиной высвобождения митохондриальных факторов с активацией в конечном итоге каспазы-9 и развития апоптотических изменений клеточных элементов печени. С другой стороны, о возможной зависимости этих процессов от уровня «цитокиновой среды», представляющей собой матрицу взаимодействующих и часто меняющихся сигналов, носящих сложный характер из-за большого разнообразия цитокиновых рецепторов, и из-за того, что каждый цитокин может активировать или подавлять несколько процессов, включая свой собственный синтез и синтез других цитокинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жураковский И. П., Архипов С. А., Пустоветова М. Г. и др. // Сибирский медицинский журнал. — 2011. — Т. 26, № 3 (вып. 2). — С. 140—144.
2. Akhtar R. S., Geng Y., Klocke B. J., Latham C. B., et al. // J Neurosci. — 2006. — Vol. 26. — P. 7257—7264.
3. Akhtar R. S., Geng Y., Klocke B. J., et al. // Cell Death Differ. — 2006. — Vol. 13. — P. 1727—1739.
4. Drakopanagiotakis F., Xifteri A., Polychronopoulos V., et al. // Eur Respir J. — 2008. — Vol. 32. — P. 1631—1638.
5. Franke C., Noldner M., Abdel-Kader R., et al. // Neurobiol Dis. — 2007. — Vol. 25, Iss. 2. — P. 438—445.
6. Kim R., Emi M., Tanabe K. // Cancer Chemother. Pharmacol. — 2005. — Vol. 21. — P. 1—9.

Контактная информация

Жураковский Игорь Павлович — к. м. н., ст. н. с., ГБОУ ВПО НГМУ Минздравсоцразвития РФ, e-mail: murash2003@yandex.ru