

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ РЕАКЦИИ ОРГАНОВ-МИШЕНЕЙ КРЫС ВИСТАР ПРИ ОСТРОМ БАКТЕРИАЛЬНОМ ЭНДОТОКСИКОЗЕ

А.М. Косырева, Д.И. Солдатов, С.Г. Васильева

Учреждение Российской академии медицинских наук
Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, г. Москва

Проводили изучение индивидуальных морфофункциональных различий реакции органов-мишеней крыс Вистар при остром эндотоксикозе, вызванном введением высокой дозы липополисахарида. С помощью кластерного анализа показателей, характеризующих морфологические изменения органов-мишеней и цитокиновый профиль, крысы Вистар были разделены на 2 подгруппы – с высоким и низким уровнем продукции Тх1-цитокинов. На 1-е сут после введения липополисахарида по сравнению с крысами с высоким уровнем продукции Тх1-цитокинов в группе крыс с низким уровнем продукции Тх1-цитокинов (ИЛ-2, ИФН- γ) дистрофические изменения печени и воспалительная реакция в легких были более выражены. На 7-е сут морфофункциональные различия реакции органов-мишеней были менее выражены и проявлялись, главным образом, на функциональном уровне.

Ключевые слова: индивидуальные различия, липополисахарид, морфология, цитокины

Липополисахарид (ЛПС) играет важную роль в развитии адаптивных реакций и инфекционно-воспалительных заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями [7, 9]. По данным литературы системная реакция организма на поступление ЛПС, основным продуцентом которого является грамотрицательная микрофлора, характеризуется гипертермией, лейкоцитозом, снижением артериального давления, повышением внутрисосудистого свертывания крови с развитием ДВС-синдрома, респираторного дистресс-синдрома, сердечно-сосудистой недостаточностью, дистрофическими изменениями печени, некронефрозом [5-7, 9, 10].

Индивидуальные различия реакции организма на воздействие стрессорных факторов особенно ярко проявляются при нагрузках, вызывающих развитие физиологического или патологического стресса [1, 3]. В литературе отсутствуют работы, посвященные изучению индивидуальных различий реакции органов-мишеней при остром эндотоксикозе, индуцированном введением ЛПС. Данные литературы по этому вопросу фрагментарны и ограничены несколькими публикациями [2, 11], в то время как изучение различий реакций на ЛПС особей с преобладанием Тх1 или Тх2-типа иммунного ответа позволит разработать подходы к прогнозированию течения заболеваний и обоснованию использования иммуномодулирующей терапии. Поэтому целью данного исследования было изучение индивидуальных морфофункциональных изменений органов-мишеней крыс Вистар при остром эндотоксикозе, вызванном введением высокой дозы ЛПС.

Материалы и методы

Работу проводили на крысах Вистар (n=39), самцах, массой тела 220-240 г. Опытной группе крыс внутрибрюшинно вводили ЛПС *E.coli* штамма O26:B6 ("Sigma", США) в дозе 20 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 1-е (n=10) и 7-е сут (n=15) после введения ЛПС. Контрольной группе крыс Вистар (n=14) внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента было получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека РАМН (протокол №5 от 12.03.2007).

Проводили морфологическое исследование печени и легких, которые являются органами-мишенями при воздействии ЛПС [7]. Кусочки печени заливали в парафин, изготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином, по Маллори. Фиксированные в 10% нейтральном формалине кусочки печени резали в криостате, полученные срезы окрашивали суданом III для выявления нейтральных липидов. Оценку выраженности дистрофических изменений печени проводили полуколичественно слепым методом.

Для получения бронхоальвеолярного смыва (БАС) животным под эфирным наркозом через трахею вводили 5 мл 199 среды. Сразу после введения культуральную среду отсасывали. В камере Горяева подсчитывали абсолютное содержание клеточных элементов в 1 мл жидкости БАС. В

мазках из жидкости БАС, окрашенных по Романовскому-Гимзе, проводили дифференцированный подсчет клеточных элементов (на 200 клеток), полученные данные выражали в процентах (эндопульмональная цитограмма по А.П. Авцыну и соавт., [8]).

Для изучения цитокинового профиля из селезенки животных выделяли спленоциты с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера. Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в количестве 5×10^6 /мл культивировали 24 ч в 1 мл RPMI 1640 (ПанЭко) с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сывороткой, 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина с добавлением конканавалина А (в конечной концентрации 5 мкг/мл) в 24-луночных культуральных панелях при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По окончании инкубации отбирали надосадки. В культуральной жидкости методом ИФА (тест-системы фирмы "Bio Source International") определяли концентрацию интерлейкинов (ИЛ)-2, -10, -12, интерферона-γ (ИФН-γ), фактора некроза опухолей-α (ФНО-α).

В разные сроки эксперимента на основании кластерного анализа по 15 параметрам, характеризующим органы-мишени и цитокиновый профиль, крысы опытной группы были разделены на 2 подгруппы. Проводили статистическую обработку полученных результатов, достоверность различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента, непараметрического U критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

С помощью кластерного анализа опытные группы крыс Вистар (на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС) были разделены на 2 подгруппы – с высокой и низкой продукцией Тх1-цитокинов. На 1-е сут после введения ЛПС подгруппа крыс с высокой продукцией цитокинов, опосредующих Тх1-тип иммунного ответа, характеризовалась повышенным уровнем ИЛ-2 и ИФН-γ, а также провоспалительного ФНО-α по сравнению с крысами с низким уровнем продукции указанных цитокинов (рис. 1).

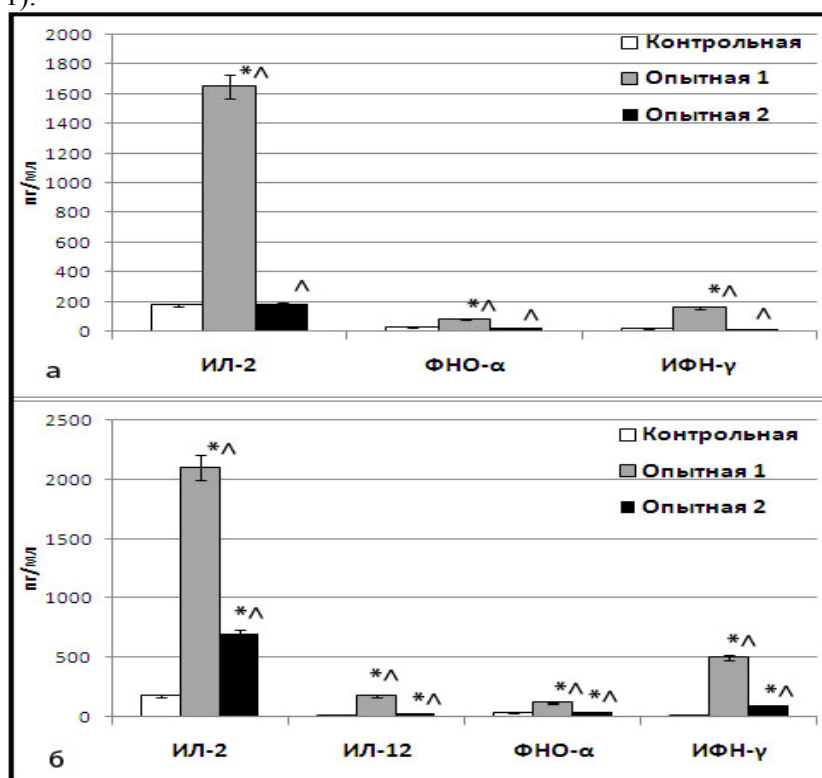


Рис. 1. Продукция цитокинов активированными конканавалином А спленоцитами крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС в зависимости от уровня продукции Тх1 цитокинов: а – на 1-е сут после введения ЛПС, б – на 7-е сут после введения ЛПС. Группы наблюдений: Контрольная группа; опытная 1 – группа крыс с высоким уровнем продукции Тх1-цитокинов; опытная 2 – с низким уровнем продукции Тх1-цитокинов.

* - различия достоверны по сравнению с контрольной группой, ^ - различия достоверны между опытными группами

В эти сроки показатели цитоза БАС в подгруппах крыс с высоким и низким уровнем продукции Тх1-цитокинов достоверно не различались (табл. 1). Через сутки после воздействия ЛПС у крыс с низким уровнем продукции Тх1-цитокинов было выявлено увеличение показателя цитоза и относительного числа нейтрофилов по сравнению с группой крыс с высоким уровнем цитокинов (табл. 1).

На 1-е сут после введения ЛПС в печени крыс выявлялась выраженная белковая и жировая дистрофия гепатоцитов, отмечалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, представленных клетками Купфера, эндотелием, клетками Ито, лимфоцитами и нейтрофилами (рис. 2а, в). В препаратах, окрашенных суданом III, в гепатоцитах выявлялись мелкокапельные суданофильные включения (рис. 2б).

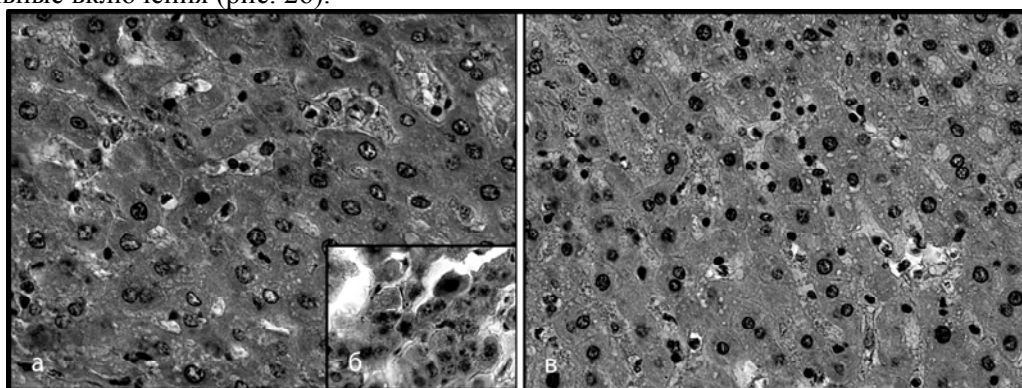


Рис. 2. Морфологическая характеристика печени крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС в зависимости от уровня продукции Тх1-цитокинов. 1-е сут после введения ЛПС (а,б,в): группа крыс с высоким уровнем продукции Тх1-цитокинов (а) – дистрофические изменения гепатоцитов менее выражены; группа крыс с низким уровнем продукции Тх1 цитокинов (в) – умеренные дистрофические изменения гепатоцитов. 7-е сут после введения ЛПС Окрашка гематоксилином и эозином – а, в; Окрашка суданом III - б. а, в, б – ув. 900.

По данным полуколичественной оценки выраженности дистрофических изменений в печени у крыс с низким уровнем продукции Тх1-цитокинов по сравнению с подгруппой животных с высоким уровнем продукции Тх1-цитокинов дистрофические изменения были более выраженными (табл. 1).

На 7-е сут после введения ЛПС подгруппа крыс с высоким уровнем продукции Тх1-цитокинов характеризовалась повышенным уровнем ИЛ-2 и ИФН- γ , иммунорегуляторного ИЛ-12, а также провоспалительного ФНО- α по сравнению с крысами с низким уровнем продукции указанных цитокинов (рис. 1). На 7-е сут после воздействия ЛПС между сравниваемыми опытными подгруппами достоверных различий по показателям цитоза и эндопульмональной цитограммы выявлено не было (табл. 1). В эти сроки в печени крыс сравниваемых подгрупп наблюдалась тенденция к обратному развитию патологических изменений. На гистологическом уровне качественных различий между подгруппами выявлено не было. Дистрофические изменения гепатоцитов были слабо выражены (рис. 2г, д), отмечалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов.

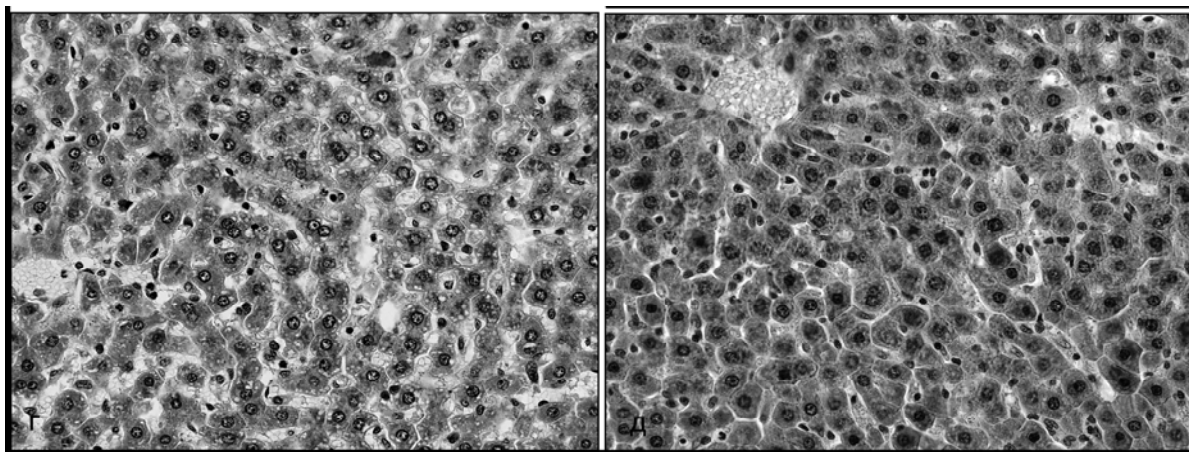


Рис. 2. Морфологическая характеристика печени крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС в зависимости от уровня продукции Тх1-цитокинов г, д: группа крыс с высоким (г) и низким (д) уровнем продукции Тх1-цитокинов – дистрофические изменения гепатоцитов слабо выражены, увеличено число неэпителиальных клеточных элементов. Окраска гематоксилином и эозином – г, д; г, д – ув. 640

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у крыс с низким уровнем Тх1-цитокинов воспалительные и дистрофические изменения в органах-мишенях (печени и легких) более выражены и характеризуются увеличением числа нейтрофилов в жидкости БАС и более выраженными и распространенными дистрофическими изменениями печени по сравнению с крысами, у которых уровень продукции Тх1-цитокинов был выше.

Введение высокой дозы ЛПС вызывает развитие воспалительных и дистрофических изменений органов-мишеней [7]. Полученные нами результаты исследования морфофункциональных изменений органов-мишеней (печени и легких) и цитокинового профиля при воспалительной реакции в ответ на введение ЛПС показывают, что выраженность повреждающего действия ЛПС зависит от уровня продукции Тх1-цитокинов.

На 1-е сут после воздействия ЛПС популяция крыс Вистар разделилась на 2 подгруппы в зависимости от уровня цитокинов – с высоким уровнем продукции Тх1-цитокинов (высокий уровень ИЛ-2, ИФН- γ и провоспалительного ФНО- α) и с низким уровнем продукции Тх1-цитокинов (не отличающийся от контрольных значений уровень перечисленных цитокинов). По данным L. Li и соавт. [12] высокие дозы ЛПС активируют иммунный ответ по Тх1-типу. По нашим данным однородная популяция крыс Вистар на одинаковую высокую дозу ЛПС реагирует по-разному: часть животных отвечает на ЛПС более выраженной поляризацией иммунного ответа по Тх1-типу, часть особей реагируют менее выражено.

На 1-е сут после введения ЛПС в подгруппе крыс с низким уровнем продукции Тх1-цитокинов наблюдались более выраженные дистрофические изменения печени. По данным литературы одним из основных органов-мишеней для ЛПС является печень, причем в ответ на воздействие ЛПС повреждаются и/или активируются как гепатоциты, так и неэпителиальные клеточные элементы, представленные макрофагами (клетки Купфера), клетками Ито, эндотелиоцитами, лимфоцитами и нейтрофилами [7]. По данным цитологического исследования жидкости БАС в легких этой подгруппы крыс воспалительный процесс также более выражен и характеризуется увеличением числа нейтрофилов. Н. Takizawa [13] также показал, что внутрибрюшинное введение ЛПС усиливает миграцию нейтрофилов через стенки капилляров межальвеолярных перегородок легких.

На 7-е сут различий в реакции органов-мишеней на введение ЛПС между группами крыс с высоким и низким уровнем продукции Тх1-цитокинов выявить не удалось.

Выводы

Таким образом, у особей с низкой продукцией Тх1-цитокинов выявлены более выраженные повреждения органов-мишеней. Эти данные согласуются с результатами исследований, представленных в работе О.В. Макаровой и Л.П. Михайловой [4], которые установили, что клиничко-морфологические особенности течения саркоидоза определяются выраженностью

поляризации иммунного ответа преимущественно по Th1 или Th2-типу. Полученные экспериментальные данные следует учитывать при разработке критериев прогнозирования течения инфекционно-воспалительных заболеваний, вызванных грамотрицательной микрофлорой, и методов коррекции иммунологических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баевский Р.М. Прогнозирование состояния на грани нормы и патологии. – М.: Медицина, 1979. – 289 с.
2. Диатроптов М.Е. Морфофункциональные изменения иммунной системы мышей Balb/c и C57bl/6 при введении липополисахарида. Автореферат дисс. канд. мед. наук. – 2006.
3. Казначеев В.П. Клинические аспекты полярной медицины. – М.: Медицина, 1986. – 208 с.
4. Макарова О.В. Иммуноморфология гранулематозного воспаления при Th1- и Th2-типе иммунного ответа / Л.П. Михайлова // Архив патологии. – 2008. – №6. – С. 37-45.
5. Морфофункциональная характеристика реакции иммунной системы крыс Вистар при воздействии сублетальной дозы липополисахарида / А.М. Яблонская и др. // Иммунология. – 2009. – №3. – С. 154-158.
6. Печень и почки при эндотоксинемии / О.Д. Мишнев и др. – М.: РГМУ, 2003. – 211 с.
7. Писарев В.Б. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога / Н.В. Богомолова, В.В. Новочадов. – Волгоград: Изд-во Вол.ГМУ, 2008. – 208 с.
8. Эндопульмональная цитограмма / А.П. Авцын и др. // Сов. мед. – 1982. – №7. – С. 8-14.
9. Эндотоксиновая агрессия как причина послеоперационных осложнений в детской хирургии (новые перспективы профилактики) / М.В. Мешков и др. – М.: Новые лечебно-диагностические технологии, 2007. – 143 с.
10. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress / X. Marechal et al. // Shock. – 2008. – Vol. 29, N 5. – P. 572-576.
11. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains / H. Watanabe et al. // Shock. – 2004. – Vol. 22, N 5. – P. 460-466.
12. Li L. Regulation of innate immunity signaling and its connection with human diseases // Curr. Drug Targets Inflamm. – 2004. – Vol. 3, N 1. – P. 81-86.
13. Takizawa H. Role of inflammatory cells in the development of airway inflammation // Nippon. Rinsho. – 2003. – Vol. 61, N 12. – P. 2107-2112.

INDIVIDUAL DIFFERENCES OF TARGET ORGANS REACTION OF WISTAR RATS TO ACUTE BACTERIAL ENDOTOXICOSIS

A.M., Kosyreva., D.I. Soldatov, S.G. Vasil'eva

Individual morphofunctional differences of target organs of Wistar rats to acute endotoxiosis, induced by lipopolisaccharide (LPS) administration in high dose were investigated. By cluster analysis of target organs and cytokines characteristics Wistar rats were divided into two groups – with high and low production level of Th1 cytokines. In 24 hours after LPS administration hepatic dystrophic changes and lung inflammation in rats with low level of Th1 cytokines (IL-2, IF- γ) were more expressed than in rats with high level of Th1 cytokines. In 7 days individual morphofunctional differences were less expressed and mainly were found out on functional level.

Key words: individual differences, lipopolisaccharide (LPS), morphology, cytokines

Косырева А.М. – старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН, к.б.н., babushka84@list.ru

Солдатов Д.И. – аспирант лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН, morfolhum@mail.ru

Васильева С.Г. – аспирант лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН, pingvin4ik@mail.ru

Таблица 1

Индивидуальные различия реакции легких и печени крыс Вистар при введении высокой дозы липополисахарида

Показатели			Цитологическая характеристика жидкости бронхоальвеолярного смыва			Выраженность дистрофических изменений печени (в баллах)	
			Цитоз $\times 10^6/\text{мл}$	Эндопульмональная цитограмма в %			
Группа наблюдений				Макрофаги	Лимфоциты	Нейтрофилы	
Контрольная			1)* 0,025±0,005	6) 89,64±0,52	11) 7,18±0,35	16) 3,18±0,67	-
Опытная (ЛПС 20 мг/кг)							
Уровень продукции Тх1 цитокинов	1-е сут	Высокий	2) 0,120±0,05	7) 71,19±3,27	12) 3,85±1,08	17) 20,86±2,67	21) 2,14±0,26
		Низкий	3) 0,041±0,01	8) 38,64±7,54	13) 4,20±2,57	18) 53,96±8,89	22) 3,07±0,18
	7-е сут	Высокий	4) 0,025±0,003	9) 65,16±5,04	14) 7,51±2,69	19) 27,33±7,74	23) 1,82±0,19
		Низкий	5) 0,039±0,001	10) 63,15±4,48	15) 7,87±5,67	20) 28,99±5,80	24) 1,39±0,44
Достоверность различий			$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$ $p_{1-4} > 0,05$ $p_{1-5} > 0,05$ $p_{4-5} > 0,05$	$p_{6-7} < 0,05$ $p_{6-8} < 0,05$ $p_{7-8} < 0,05$ $p_{6-9} < 0,05$ $p_{6-10} < 0,05$ $p_{9-10} > 0,05$	$p_{11-12} > 0,05$ $p_{11-13} > 0,05$ $p_{12-13} > 0,05$ $p_{11-13} > 0,05$ $p_{11-14} > 0,05$ $p_{14-15} > 0,05$	$p_{16-17} < 0,05$ $p_{16-18} < 0,05$ $p_{17-18} < 0,05$ $p_{16-19} < 0,05$ $p_{16-20} < 0,05$ $p_{19-20} > 0,05$	$p_{21-22} < 0,05$ $p_{23-24} > 0,05$

* - номер группы наблюдений

