

© Павлов С. Б., Гончарова А. В., Кумечко М. В., *Фролова Т. В.

УДК 616. 71-007. 234-092. 9:616. 155. 2

Павлов С. Б., Гончарова А. В., Кумечко М. В., *Фролова Т. В.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКИ МІЖ РІВНЕМ ІНТЕРЛЕЙКІНІВ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ ТРОМБОЦИТІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПОРУШЕНЬ ОБМІНУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Харківська медична академія післядипломної освіти (м. Харків)

***Харківський національний медичний університет (м. Харків)**

Публикація є фрагментом науково-дослідної роботи Харківської медичної академії післядипломної освіти «Роль міжклітинних медіаторів у патогенезі розвитку остеопорозу», № держ. реєстрації 0111U003589.

Вступ. Провідну роль у патогенетичних механізмах розвитку остеопорозу відіграють порушення в системах регуляції гомеостазу. Одне з найважливіших місць при цьому відводиться міжклітинним медіаторам – цитокінам, порушення балансу яких має важливе значення в патогенезі порушень обміну кісткової тканини.

Запалення є тригером запуску змін метаболізму, фіналом яких стає переважання резорбції кісткової тканини над процесами її синтезу. Тісний зв'язок запалення як прояву активності імунної системи з механізмами системи гемостазу дозволяє розглядати тромбоцити в якості учасників цих явищ.

У тромбоцитах крім рецепторів і продуктів секреції, що виконують класичну роль у гемостазі та тромбоутворенні, є велика кількість різноманітних рецепторів і речовин, які продукуються цими клітинами і є активними у процесах запалення, імунітету і регенерації тканин [2]. Тромбоцити експресують багато імуномодуляторних молекул (наприклад, Р-селектин, CD40L) і цитокінів (наприклад, інтерлейкін-1 β (ІЛ-1 β), трансформуючий фактор росту- β) та мають можливість взаємодіяти з різними типами імунних клітин. І навпаки, тромбоцити можуть служити мішенню для імунної системи (наприклад, для антитіл, цитокінів, імунних клітин), що може навіть призводити до ряду імунних захворювань [4]. Такі цитокіни як інтерферон- γ , ІЛ-2, будучи медіаторами запалення, здатні активувати тромбоцити [5].

ІЛ-4 представляє собою плейотропний імуномодулюючий цитокін, що виділяється Т2 лімфоцитами-хелперами, еозинофілами і мастоцитами. Останні дані літератури свідчать про те, що ефекти ІЛ-4, які раніше вважалися протизапальними, мають подвійну природу, і він функціонує як регуляторний цитокін, а не як ефекторний. Продукти багатьох генів, які активуються ІЛ-4, носять прозапальний характер і беруть участь у запальних реакціях. ІЛ-4 значно активує VCAM-1, Е-селектин, MCP-1 і інтерлейкін-6,

що характеризує його як ключовий медіатор, який спрямовує зміни в ендотелії судин за проокислюючим та прозапальним шляхом [3].

У зв'язку з цим актуальність дослідження взаємозв'язку профілю цитокінів з функціональною активністю тромбоцитів при порушеннях метаболізму кісткової тканини є очевидною.

Мета дослідження – виявлення взаємозв'язків між вмістом ІЛ-4 і 6 і функціональною активністю тромбоцитів у щурів із поєднаним впливом іммобілізаційного стресу і запалення на обмін кісткової тканини.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводилося на 2 групах білих щурів-самок віком 6 міс. масою 240 ± 30 г. Контрольна група складала 20 тварин, група з моделлю порушення ремоделювання кісткової тканини – 20 тварин. Експериментальні маніпуляції проводилися відповідно до принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986), «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) [1] та вимогами «Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (2012).

Іммобілізаційний стрес створювали висадкою тварин в тісні пенали на 4 год щодня протягом місяця за методикою І. А. Коломейцевої (1988) зі змінами. Модель хронічного запалення відтворювали 10 ін'єкціями по 0,5 мл суміші жовчі великої рогатої худоби та свиней (жовч медична консервована виробництва України) внутрішньочеревно в проекції печінки щодня. Запалення починали викликати через місяць від початку створення іммобілізаційного стресу.

Кров для дослідження агрегації тромбоцитів брали з серця.

Індукована агрегація тромбоцитів досліджувалася з використанням комп'ютеризованого аналізатора агрегації тромбоцитів «SOLAR 2110» (Білорусь). В якості індуктора використовували аденозиндифосфат (АДФ) в концентрації 2,5, 5,0 і 10,0 мкмоль/л. Запис агрегатограм проводився при 37°C протягом 10 хвилин. Подальший аналіз агрегаційної кривої включав в себе визначення наступних показників: 1) ступеня агрегації – максимального%

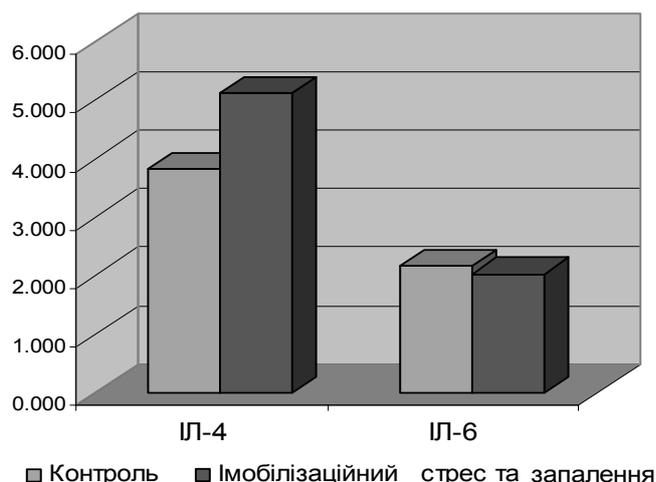


Рис. Рівні інтерлейкінів 4 і 6 у щурів з порушенням обміну кісткової тканини.

Таблиця 1

Показники агрегації тромбоцитів у щурів з експериментальним порушенням стану кісткової тканини (ІС + З) при концентрації АДФ 2,5 мкмоль/л

Групи тварин	Показники агрегації		
	Ступінь агрегації, %	Час досягнення максимальної швидкості агрегації, сек	Швидкість агрегації, %/хв.
Контроль	45.1 ± 10.55	85.2 ± 7.78	59.12 ± 21.49
ІС+З	62.54 ± 6.25	87.15 ± 6.71	99.55 ± 9.90*

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою контрольних тварин.

Таблиця 2

Показники агрегації тромбоцитів у щурів з експериментальним порушенням стану кісткової тканини (ІС + З) при концентрації АДФ 5,0 мкмоль/л

Групи тварин	Показники агрегації		
	Ступінь агрегації, %	Час досягнення максимальної швидкості агрегації, сек	Швидкість агрегації, %/хв.
Контроль	80.40 ± 9.25	132.66 ± 8.08	107.4 ± 10.41
ІС+З	74.82 ± 4.37	130.57 ± 6.67	100.80 ± 7.35

Таблиця 3

Показники агрегації тромбоцитів у щурів з експериментальним порушенням стану кісткової тканини (ІС + З) при концентрації АДФ 10,0 мкмоль/л

Групи тварин	Показники агрегації		
	Ступінь агрегації, %	Час досягнення максимальної швидкості агрегації, сек	Швидкість агрегації, %/хв.
Контроль	80.40 ± 9.25	132.66 ± 8.08	107.4 ± 10.41
ІС+З	74.82 ± 4.37	130.57 ± 6.67	100.80 ± 7.35

світлопропускання плазми, 2) часу досягнення максимальної швидкості агрегації – часу досягнення максимального % світлопропускання 3) швидкості агрегації, яка розраховувалася через 30 секунд після початку агрегації тромбоцитів.

Рівень інтерлейкінів у крові визначали після закінчення моделювання порушень кісткової тканини імуноферментним методом за допомогою наборів фірми «Вектор-Бест».

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням методів варіаційної статистики пакету програм Statistica 6.0.

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні рівня ІЛ-4 було виявлено, що у щурів з моделлю порушення метаболізму кісткової тканини він підвищився порівняно з контролем на 34,11 % ($p < 0,05$) (рис.).

Рівень ІЛ-6 у щурів з порушеннями кісткової тканини не відрізнявся від рівня контрольних тварин.

При дослідженні показників функціональної активності тромбоцитів – процесу їх агрегації – при концентрації індуктора агрегації АДФ 2,5 мкмоль / л ступінь агрегації тромбоцитів і час досягнення максимальної швидкості агрегації у тварин з моделлю порушень майже не відрізнялися від параметрів контрольних тварин (табл. 1). Швидкість агрегації у щурів з порушенням обміну кісткової тканини достовірно збільшилася на 59,39 % ($p < 0,05$).

При таких значеннях концентрації індуктора агрегації АДФ 5,0 і 10 мкмоль / л ступінь агрегації тромбоцитів, час досягнення максимальної швидкості агрегації і власне швидкість агрегації у тварин з моделлю порушень також не відрізнялися від параметрів контрольних тварин (табл. 2, 3).

У тварин контрольної групи існує негативна кореляція між ступенем агрегації при концентрації індуктора 10 мкмоль / л і рівнем ІЛ-6 ($R = -0,97$) ($p < 0,05$). У групи з порушенням обміну кісткової тканини була виявлена негативна кореляція між ступенем агрегації при концентрації індуктора 5 мкмоль / л і рівнем ІЛ-4 ($R = -0,63$) ($p < 0,05$), між швидкістю агрегації при концентрації індуктора 5 мкмоль / л і рівнем ІЛ-4 ($R = -0,56$) ($p < 0,05$), а також між часом досягнення максимальної швидкості агрегації при концентрації індуктора 10 мкмоль / л і рівнем ІЛ-6 ($R = -0,79$) ($p < 0,05$).

Таким чином, при порушенні обміну кісткової тканини, змодельованому за

допомогою поєданого впливу іммобілізаційного стресу і запалення, виявлено підвищення рівня ІЛ-4, підвищення швидкості агрегації при концентрації АДФ 2,5 мкмоль / л, а також наявність взаємозв'язку між ступенем агрегації при концентрації індуктора 5 мкмоль / л і рівнем ІЛ-4 і швидкістю агрегації при цій концентрації індуктора і рівнем ІЛ-4, а також між часом досягнення максимальної швидкості агрегації при концентрації індуктора 10 мкмоль / л і рівнем ІЛ-6. Кореляції між параметрами агрегації тромбоцитів і рівнями інтерлейкінів переважно негативні і досить сильні.

Факт підвищення рівня інтерлейкіну-4 в даному дослідженні відповідає даним літератури про його високі рівні в тканинах пацієнтів з хронічними запальними захворюваннями, де він може грати важливу роль в прогресуванні патології [3]. Підвищення швидкості агрегації при концентрації АДФ 2,5 мкмоль / л також підтверджується даними літератури, де описується посилення адгезії і агрегації при запальних процесах внаслідок накопичення АДФ в запалених тканинах [5].

При зростанні рівня ІЛ-4 у групи тварин з моделлю порушень обміну кісткової тканини існує можливість зниження параметрів функціональної активності тромбоцитів. Виявлені випадки взаємозв'язку рівня інтерлейкінів з параметрами функціональної активності тромбоцитів підтверджують наявність точок взаємодії між функціонуванням системи гемостазу та розгортанням каскаду цитокінів.

Однотимчасний вплив тривалого стресу і запалення викликає виснаження резервів адаптації організму, який реагує на дії зростанням рівня імуномодулюючого цитокіну і лабільністю функцій, що забезпечують судинно-тромбоцитарний гемостаз.

Висновки. У щурів з моделлю поєданого впливу іммобілізаційного стресу і запалення на обмін кісткової тканини виявлено підвищення рівня інтерлейкіну-4, підвищення швидкості агрегації та наявність кореляції між вмістом інтерлейкінів 4 і 6 і функціональною активністю тромбоцитів.

Перспективи подальших досліджень. У перспективі слід вивчити роль інших цитокінів при їх взаємодії у патогенетичних механізмах розвитку остеопорозу.

Література

1. Общие этические принципы экспериментов на животных: материалы I национального конгресса по биоэтике. – К.: НАН Украины, 2001. – 16 с.
2. Horstman L. L. Role of platelets in neuroinflammation: a wideangle perspective / L. L. Horstman, W. Jy, Y. S. Ahn [et al.] // Journal of Neuroinflammation. – 2010. – Vol. 7. – P. 10-17.
3. Lee Y. W. Gene expression profile in interleukin-4-stimulated human vascular endothelial cells / Y. W. Lee, S. Y. Eum, K. C. Chen [et al.] // Molecular Medicine. – 2004. – Vol. 10, № 1-6. – P. 19-27.
4. Li C. Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries [Електронний ресурс] / C. Li, J. Li, Y. Li [et al.] // Advances in Hematology. – Vol. 2012. – Article ID 384685, 14 p. – Режим доступу до журн.: <http://www.hindawi.com/journals/ah/2012/384685/>.
5. Stokes K. Y. Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction / K. Y. Stokes, D. N. Granger // J. Physiol. – 2012. – Vol. 590. 5. – P. 1023-1034.

УДК 616. 71-007. 234-092. 9:616. 155. 2

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКИ МІЖ РІВНЕМ ІНТЕРЛЕЙКІНІВ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ ТРОМБОЦИТІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПОРУШЕНЬ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Павлов С. Б., Гончарова А. В., Кумечко М. В., Фролова Т. В.

Резюме. У щурів з моделлю поєданого впливу іммобілізаційного стресу і запалення на обмін кісткової тканини виявлено підвищення рівня ІЛ-4, підвищення швидкості агрегації та наявність взаємозв'язків між вмістом ІЛ- 4 і 6 і функціональною активністю тромбоцитів. Підвищення швидкості агрегації виявлено при концентрації АДФ 2,5 мкмоль / л, взаємозв'язки відзначалися між ступенем агрегації при концентрації індуктора 5 мкмоль / л і рівнем ІЛ-4 і швидкістю агрегації при цій концентрації індуктора і рівнем ІЛ-4, а також між часом досягнення максимальної швидкості агрегації при концентрації індуктора 10 мкмоль / л та рівнем ІЛ-6. Виявлені кореляції між параметрами агрегації тромбоцитів і рівнями інтерлейкінів є переважно негативними і досить сильними. Зростання рівня імуномодулюючого цитокіну та лабільність функцій, забезпечуючих судинно-тромбоцитарний гемостаз є виявленням виснаження резервів адаптації організму у відповідь на вплив тривалого стресу і запалення.

Ключові слова: кісткова тканина, цитокіни, агрегація тромбоцитів.

УДК 616. 71-007. 234-092. 9:616. 155. 2

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЕМ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НАРУШЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

Павлов С. Б., Гончарова А. В., Кумечко М. В., Фролова Т. В.

Резюме. У крыс с моделью сочетанного воздействия иммобилизационного стресса и воспаления на обмен костной ткани обнаружено повышение уровня ИЛ-4, повышение скорости агрегации и наличие взаимосвязей между содержанием ИЛ-4 и 6 и функциональной активностью тромбоцитов. Повышение скорости агрегации обнаружено при концентрации АДФ 2,5 мкмоль / л, взаимосвязи отмечались между степенью

агрегации при концентрации индуктора 5 мкмоль / л и уровнем ИЛ-4 и скоростью агрегации при этой концентрации индуктора и уровнем ИЛ-4, а также между временем достижения максимальной скорости агрегации при концентрации индуктора 10 мкмоль / л и уровнем ИЛ-6. Выявленные корреляции между параметрами агрегации тромбоцитов и уровнями интерлейкинов являются преимущественно отрицательными и достаточно сильными. Увеличение уровня иммуномодулирующего цитокина и лабильность функций, обеспечивающих сосудисто-тромбоцитарный гемостаз является проявлением истощения резервов адаптации организмы в ответ на действие длительного стресса и воспаления.

Ключевые слова: костная ткань, цитокины, агрегация тромбоцитов.

UDC 616. 71-007.234-092. 9:616.155.2

The Relationship between Interleukins and Functional Activity of Platelets in the Model of Bone Disorder

Pavlov S. B., Goncharova A. V., Kumechko M. V., Frolova T. V.

Abstract. In the rat model of combined effect of immobilization stress and inflammation on bone tissue metabolism increased levels of interleukin-4 (IL-4), increasing of platelet aggregation speed and the relationships between the content of interleukins 4 and 6 and functional activity of platelets have been revealed.

Cytokine imbalance is important in the pathogenesis of bone turnover .

Inflammation starts metabolic changes that lead to the predominance of bone resorption over the processes of its synthesis. A close relationship of the immune system with the mechanisms of the hemostatic system in the inflammatory process allows to discuss the role of platelets in the pathogenesis of osteoporosis.

In platelets besides the receptors and products of secretion performing classical role in haemostasis and thrombus formation, there are a large number of different substances produced by these cells and receptors that are active in the processes of inflammation, immunity and tissue regeneration. Platelets express many immunomodulatory molecules (e. g., P-selectin, CD40L) and cytokines (e. g., IL-1 β , transforming growth factor- β) and are able to interact with different types of immune cells. Interferon- γ and IL-2, as mediators of inflammation are able to activate platelets.

Interleukin – 4 is a pleiotropic immunomodulatory cytokine secreted by T2 lymphocytes-helper cells, eosinophils and mast cells. The effects of IL-4, which were previously considered as anti-inflammatory, really have a dual nature, and IL-4 functions as a cytokine regulator, but not as an effector. IL-4 significantly activates VCAM -1, E – selectin , MCP -1 and IL-6, characterizes it as a key mediator that directs changes in the vascular endothelium with prooxidative and proinflammatory pathways.

In this regard, the relevance of studies on the relationship cytokine profile with the functional activity of platelet disorders of bone metabolism is obvious.

The *aim* of research is to identify the relationships between the content of IL-4 and 6, and platelet functions in rats with a combined action of immobilization stress and inflammation on bone turnover.

Object and methods. The study was conducted on two groups (each of 20 animals) of white female rats aged 6 months. Immobilization stress created by putting animals in close boxes for 4 hours daily during a month. A month after forming of immobilization stress the model of chronic inflammation reproduced by 10 injections of 0.5 ml of the bile of cattle into liver projection intraperitoneally daily. As an inducer of aggregation adenosine diphosphate (ADP) was used in the concentrations of 2.5, 5.0 and 10.0 mol / l.

Results. In rats with the model of bone disorder level of IL -4 increases at 34, 11 % compared to control ($p < 0,05$), the aggregation rate at a concentration of ADP 2.5 mmol / L also increases, and the relationship between the level of IL -4 and the degree of aggregation and between the level of IL- 4 and the aggregation rate at a concentration of inducer 5 mmol/l and the relationship between the level of IL -6 and the time of achieving of the aggregation rate maximum at a concentration of the aggregation inducer 10 μ mol/l. Correlations between the parameters of platelet aggregation and levels of interleukins predominantly negative and quite strong. The cases of correlation between the levels of interleukin and platelet function parameters confirm the presence of points of interaction between the functioning of the hemostatic system and cascade of cytokines.

The combined effect of prolonged stress and inflammation causes a depletion of reserves of organism adaptation that responds to the impact by rising levels of immunomodulatory cytokine and reduce the possibility of functions that provide vascular-platelet hemostasis.

Conclusions. In rats with a model of the combined influence of immobilization stress and inflammation on bone turnover revealed increasing levels of IL-4, the rate of aggregation increasing and correlation between interleukin 4 and 6 and the functional activity of platelets. Such changes indicate the depletion of organism adaptation reserves.

Key words: bone, cytokines, platelet aggregation.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 21. 05. 2014 р.