

УДК 571.27

## ЦИТОКИНОВАЯ РЕАКЦИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ТРАНСЛОКАЦИЮ НА МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ КИШЕЧНИКА У МЫШЕЙ И ОБЕЗЬЯН

Амаба С.Т.<sup>1</sup>, Конджария И.Г.<sup>1</sup>, Матуа А.З.<sup>1</sup>, Трапш Х.З.<sup>1</sup>, Дьяченко А.Г.<sup>2</sup>, Миквабия З.Я.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии, Академия наук Абхазии», Сухум, Абхазия,

<sup>2</sup>Сумской государственный университет, Сумы, Украина

### ХУЛОСА

**Мақсад.** Макака резус ва оқ сичқонларнинг ичакларида кимевий усул билан индуцирланган яллигланишида микробли транслокацияга бўлган цитокин жавобни ўрганиши эди. Материал ва услублар. Сичқонлар ва макака резусларнинг қон зардобини намуналари текиширилди. Яллигланишни чақирувчи омил сифатида сульфатирланган декстраннынг натрий тузи (ДСН, 3-5%) ишлатилди, ва уни ҳайвонларга 5-7 кун давомида оғзи орқали юборилди. Зардобдаги яллигланиш ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ) ва транслокация (16SpДНК, FITC-декстран, sCD14) омиллари иммунфермент усули билан (Вектор-Бест, Invitrogen (АҚШ) тўпламлари ердамида) ва реал вақтдаги (rt - PCR) полимераза занжирли реакция (ПЗР) HycultBiotech ҳамда ZymoRes тўплами ёрдамида аниқлаш ўтказилди.

**Натижалар.** Макака резусларга ДСНни юбориш фонида 16SpДНК ва CD14 (sCD14) иккинчи суткадан бошлаб ошгани қайд этилди, ва бу ўсишининг максимал даражаси бчи суткада кузатилиб тажрибани охиригача давом этди. Оқ сичқонларда FITC-декстран 3чи суткада ошди, максимал миқдори 7чи суткада қайд этилди ва 14 суткада пасайиш кузатилди.  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  каби цитокинлар реакцияси ДСН таъсиридан кейин биринчи/иккинчи суткадан бошлаб сезиларли ошганлиги билан тавсифланди, максимал миқдори макака резусда 5-7 суткада кузатилди, оқ сичқонларда эса 3-6 суткада қайд этилди.

**Хулоса:** 1. Икки хил ҳайвонларда микробли транслокация маркерларини яллигланиш чақирувчи омилни юборишга жавобан динамик ошиб кетиши кўрсатилди.

2. Яллигланиш индукторини қўллашдан сўнг ва бактериял транслокацияга жавобан цитокинлар реакциялари фаоллашди. Кўрсаткичларни динамик ўзгаришлари асосан Th1 цитокинлар профили билан

### SUMMARY

**Objective.** To study the cytokine response to microbial translocation in rhesus macaques and white mice with chemically induced intestinal inflammation.

**Materials and methods.** Blood serum samples from mice and rhesus macaques were studied. The sodium salt of sulfated dextran sulfate (DSN, 3-5%) was used as an inducer of intestinal inflammation and given to animals per os ad libitum for 5-7 days. Serum markers of inflammation ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ) and translocation (16SpDNA, FITC-dextran, sCD14) were determined by enzyme immunoassay (Vector-Best, Invitrogen (USA), HycultBiotech kits and real-time PCR (rt-PCR) with ZymoRes kit.

**Results.** Against the background of DSN administration to rhesus macaques 16SpDNA and soluble CD14 (sCD14) increased from the second day, reached a maximum by the 6th day and remained at a high level until the end of the experiment. In white mice, FITC-dextran increased from day 3, reached a maximum level by day 7, and decreased slightly by day 14. The cytokine response was characterized by significant production of  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  on the first/second day after DSN exposure, reaching a maximum on days 5-7 in rhesus macaques and on days 3-6 in white mice.

**Conclusions:** 1. The dynamic increase of microbial translocation markers into the vascular bed after the introduction of inflammatory inducer in both animal species was shown.

2. In response to inducer administration and bacterial translocation, cytokine response activation occurred. The dynamics of changes in the indices was characterized predominantly by Th1 cytokine profile.

**Keywords:** rhesus macaques, mice, sodium dextran sulfate, microbial translocation, cytokines.

тавсифланди.

**Калит сўзлар:** макака резуслар, сичқонлар, декстрансульфат натрийси, микробли транслокация, цитокинлар.

Воспалительные заболевания кишечника определяются как хронические рецидивирующие воспалительные заболевания, которые поражают толстую кишку и другие отделы желудочно-кишечного тракта. Выделяют два основных типа ВЗК человека: болезнь Крона (БК), для которой характерно трансмуральное повреждение малого кишечника и толстой кишки, и язвенный колит (ЯК), при котором наблюдаются язвенные повреждения слизистой оболочки толстой кишки [5,12].

Регуляторные иммунные клетки постоянно взаимодействуют с кишечными бактериями и молекулами пищи, регулируя провоспалительные эффектор-ные клетки и стимулируя противовоспалительные пути [4]. В ряде случаев при нарушении регуляции развиваются те или иные реакции иммунного конфликта, индуцирующие повреждение тканей. Такие события, как разрушение эпителиального барьера, неконтролируемая бактериальная колонизация, нерегулируемая стимуляция иммунных эффекторов и нарушение гомеостатического баланса, могут способствовать возникновению заболевания. Следует отметить, что эти явления могут наблюдаться в любом месте кишечника. Микрофлора, которая колонизирует кишечник человека, отделена от иммунной системы монослоем тесно прилегающих друг к другу эпителиальных клеток. Тем не менее, небольшое количество бактериальных продуктов и (в меньшей степени) целых бактерий из просвета кишечника все же регулярно проникает через этот плотный эпителиальный клеточный барьер, попадая в подлежащие мукозные ткани, мезентериальные лимфоузлы, кровь или печень в ходе процесса, который носит название микробная транслокация и является критически важным для развития и поддержания компетенций иммунной системы [1,2]. Повреждение эпителиального барьера характеризуется повышением экспрессии цитокинов в крови. Результатом устойчивого повышения микробной транслокации может стать хроническая системная иммунная активация, которая неизбежно ведет к иммунному истощению и потере иммунных функций. Несмотря на временные и локальные воспалительные эффекты в тонкой или толстой кишке, неконтролируемое воспаление кишечника всегда оказывает системное воздействие на организм [3,7,8].

Хотя точная этиология ВЗК неизвестна, считается, что она включает комбинацию ряда факторов: генетическую предрасположенность, измененную экспрессию рецепторов распознавания бактериальных паттернов, изменения микробиоты, нарушения рационального питания, предшествующие острые воспалительные заболевания, вызванные вирусами, бакте-

риями, паразитами, нарушение регуляции кишечного иммунного ответа или аутоиммунными нарушениями [11,10].

Моделирование на животных может быть чрезвычайно полезным для выяснения этиологии воспалительных заболеваний кишечника и разработки новых видов терапии, которые могут вызвать ремиссию или предотвратить рецидив [18]. Ниже представлены результаты экспериментального колита, вызванного декстрансульфатом натрия (ДСН) у обезьян вида *Macaca mulatta* и белых мышей. Индуцированный таким образом колит является довольно близкой моделью острого кишечного повреждения, которое имитирует несколько типов поражений, развивающихся в стенке толстого и (в меньшей степени) тонкого кишечника, что согласуется с типичной патологией ВЗК [13,17].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ цитокинового ответа на повышение проницаемости кишечного барьера и микробной транслокации на модели ВЗК у мышей и обезьян.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные:

- белые б/п мыши, самцы, возраст 8- 12 недель, вес 18 - 22 г;

Контрольная группа – 10 шт;

Опытная группа (введение DSSperos) – 30 шт.

- обезьяны макаки резусы (*Macaca mulatta*), самцы, возраст 11 - 25 лет, вес 7 - 10 кг;

Контрольная группа - 2 особи;

Опытная группа - 5 особей.

В эксперименте в качестве индуктора острого воспаления кишечника использовали натриевую соль сульфатированного декстрана (ДСН).

Анализ маркеров воспаления и транслокации проводили иммуноферментным методом при помощи наборов Вектор-Бест, Invitrogen (США), NycultBiotech и ПЦР в реальном времени (rt - PCR) с набором ZymoRes соответственно.

Декстрансульфатнатриевую соль (DSS, MP Biomedicals, мол. вес 30-50 kD, Ref.160110) в виде 3 % и 5% стерилизованного раствора давали мышам и макакам резусам из опытной группы соответственно *per os ad libitum* вместо питьевой воды в течение 5-7 дней, после чего раствор DSS заменяли чистой водой.

Точки исследования: 1, 3, 5, 7, 10, 14 сутки для мышинной модели и 1, 2, 3, 6, 14, 16 и 42 сутки – для обезьяньей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повреждение кишечного мукозного барьера и, как следствие, возрастание проницаемости способствует усиленной транслокации компонентов микробных

клеток, таких как ЛПС и 16S рДНК, в системный кровоток, что индуцируют цитокиновую реакцию. Эндотоксин грамотрицательных бактерий ЛПС активирует ядерный фактор транскрипции NF- $\kappa$ B после связывания с мембранными CD14 (mCD14) и комплексом миелоидной дифференцировки (MD - 2) - TLR4. Результатом этих событий является продукция IL- 6, IL- 1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$  и интерферонов I типа. Для предотвращения чрезмерной стимуляции моноцитов в организме продуцируется молекула - приманка растворимый CD14 (sCD14), которая подобно mCD14 способна связывать ЛПС - комплекс, но сигнал не передает. sCD14 широко используется в качестве маркера ЛПС - индуцированной активации моноцитов. sCD14 является суррогатным маркером микробной транслокации и достаточно корректным предиктором клинического развития и исхода различных

заболеваний (6, 9, 14). Концентрация этого фактора в крови интактных обезьян вида *Macaca mulatta* составляла в среднем 1,8 мкг/мл. Введение ДСН привело к быстрому и значительному росту содержания sCD14. В отдельные дни были зафиксированы уровни, превышающие 8 мкг/мл. Высокая концентрация sCD14 в крови экспериментальных животных сохранялась до конца исследования.

Лабораторным маркером микробной транслокации было динамическое повышение уровня 16S рДНК. По результатам эксперимента повышение проницаемости кишечного мукозного барьера у обезьян под действием ДСН ведет к транслокации 16S рДНК. Концентрация 16S рДНК начинала повышаться со вторых суток и достигала максимальных уровней к 6 суткам (10 - 17 копий в 1 мкл), снижаясь до фоновых значений к концу эксперимента (рис. 1).

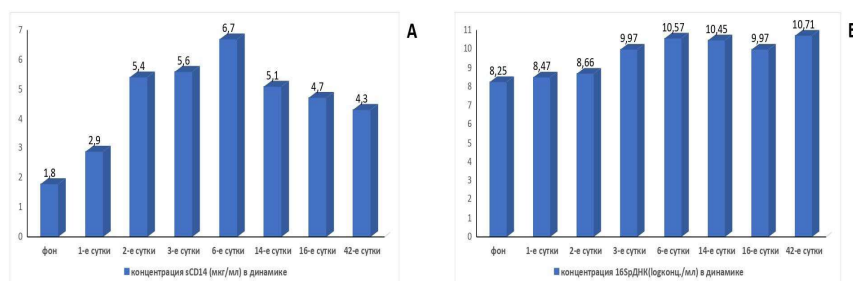


Рис. 1. Показатели 16SpДНК и sCD14 у макак-резусов с индуцированным ВЗК в динамике.

Провоспалительные цитокины являются местными провоспалительными медиаторами, которые продуцируют макрофаги и лимфоциты, а также эпителиальные и мезенхиальные клетки, и которые участвуют в развитии и патогенеза воспаления и иммунитета. Эти медиаторы играют, по-видимому, важнейшую роль в патогенезе ВЗК, включая язвенный колит и болезнь Крона. Повышенная кишечная проницаемость с последующей инфильтрацией иммунных эффекторных клеток увеличивает, как полагают, мукозную продукцию провоспалительных цитокинов как эпителиальными, так и иммунными клетками (15, 16).

Мы изучали продукцию провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1 $\beta$ , IL - 10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  в ответ на воздействие ДСН. Обнаружено значительное увеличение уровня в крови всех изученных цитокинов.

В наших исследованиях цитокиновый ответ на введение ДСН у обезьян характеризовался значительным увеличением в крови уровня всех изученных цитокинов (IL - 6, IL - 1 $\beta$ , TNF -  $\alpha$ , IFN -  $\gamma$ ). Эта стимуляция обнаруживается очень рано, в первый - второй день после воздействия, достигая максимума на 6 день. Уровень экспрессии большинства медиаторов значительно превышает контрольные значе-

ния: TNF -  $\alpha$  - в 1,5 раза, IFN -  $\gamma$  и IL - 1 $\beta$  - в 2 раза, IL - 6 - почти в 3 раза. После отмены ДСН эти медиаторы остаются на высоком уровне, постепенно снижаясь к концу опыта (рис. 2).

Проницаемость кишечного барьера у мышей оценивали при помощи FITC-d - декстрана (флюоресцеин - изотиоцианат декстран, ФИТЦ - декстран, мол. вес 4 KDa, Sigma - Aldrich, США). Мышей на 4 часа оставляли без воды и пищи, после чего перорально через канюлю вводили 0,2 мл раствора FITC-d в ФСБ (50 мг/мл). Через 3 ч собирали кровь, удаляли клетки, разводили сыворотки 1:5 ФСБ и измеряли интенсивность флюоресценции каждого образца на флуориметре LB 942 BertholdTechnol (ФРГ) (возбуждение 492 нм, эмиссия 525 нм). Концентрация FITC-d определялась по стандартной калибровочной кривой, построенной по интенсивности флюоресценции шести двухкратных серийных разведений маркера, начиная со значения 20 мкг/мл (рис. 3).

Введение индуктора воспаления ДСН привело к повышению кишечной проницаемости, которая стала увеличиваться с 3-х суток введения, достигла максимального уровня на 7-е сутки и незначительно снизилась к концу наблюдения - на 14 сутки.

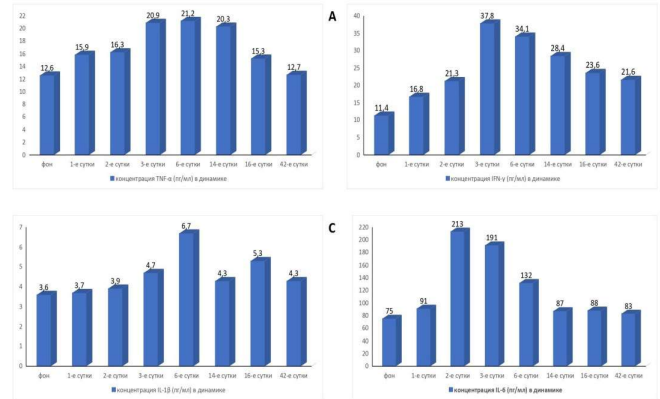


Рис. 2. Показатели IL-6, IL-1β, TNF-α, IFN-γ у макак резусов с индуцированным ВЗК в динамике.

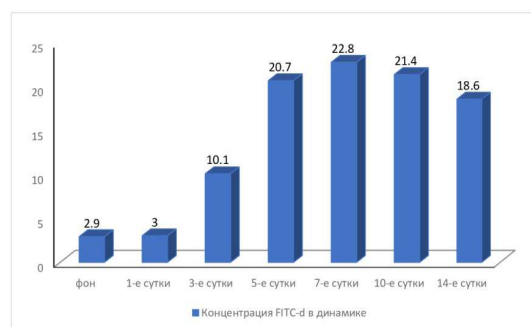


Рис. 3. Показатели FITC-d у мышей с индуцированным ВЗК в динамике.

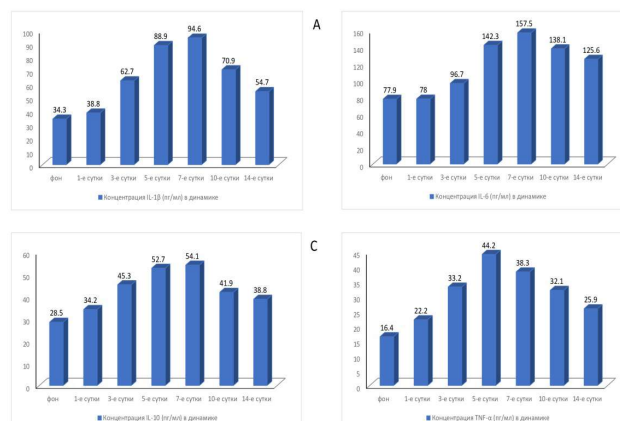


Рис. 4. Показатели IL - 1β, IL - 6, IL - 10, TNF - α у мышей с индуцированным ВЗК в динамике.

Цитокиновый ответ на введение ДСН у мышей характеризовался так же значительным увеличением в крови уровня всех изученных цитокинов (IL - 1β, IL - 6, IL - 10, TNF - α). Эта стимуляция так же обнаруживается очень рано, в первый-второй день после воздействия, достигая максимума на 5 - 7 сутки. Уровень экспрессии большинства медиаторов значительно превышает фоновые значения: TNF - α, IL - 1β – в 3 раза, IL - 6, IL - 10 – в 2 раза. После отмены ДСН на 5 сутки эти медиаторы остаются на высоком уровне, постепенно снижаясь к концу опыта на 14 сутки (рис. 4).

## ВЫВОДЫ

На полученных нами мышинной и обезьяньей животных моделях ВЗК, индуцированного декстран-сульфатом натрия, удалось воспроизвести симптомы ВЗК у обоих видов животных. На обеих моделях было получено лабораторное подтверждение возрастания проницаемости кишечного барьера, усиления микробной транслокации компонентов бактериальных клеток в сосудистое русло в ответ на введение ДСН. В обеих моделях наблюдалась схожая динамика нарастания молекулярных маркеров этих эффектов (уровня ФИТЦ - декстрана у мышей и 16S рДНК

- у макак резусов). Цитокиновый ответ на введение ДСН характеризовался ранней, но длительной стимуляцией IL - 1 $\beta$ , IL - 6, IL - 10, TNF -  $\alpha$ . Длительность воспаления, вызванного ДСН, сопоставима с тем временем, которое необходимо для перехода острого воспаления в хроническое. Цитокиновая реакция на индукцию ВЗК у обоих видов животных имела близкую к человеку динамику, но модель на обезьянах имеет множество очевидных преимуществ, среди которых тесное родство членов отряда приматов по биохимическим параметрам и иммунобиологическим свойствам.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агабабова А.А., Авакян Л.А. Значение бактериальной транслокации и её роль в формировании симбиотических отношений с макроорганизмом // Национальная академия наук Армении. 2008; Т. 108. № 3. С.262-269.
2. Кувшинов А.Г. Закономерности развития бактериальной транслокации при ранних ишемических и реперфузионных повреждениях тонкой кишки, вызванных острым нарушением магистрального кровотока: автореферат на соискание ученой степени канд. мед. наук // «Хирургия». Иркутск. 2004; С. 3-26.
3. Титов В.Н. Синдром транслокации, липополисахариды бактерий, нарушения биологических реакций воспаления и артериального давления // Клиническая лабораторная диагностика. Москва. 2010; № 4. С. 21-37.
4. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more." Current opinion in immunology. 2006; vol.18(6): p.738-744. doi:10.1016/j.coi.2006.06.003
5. Baumgart D.C., Sandborn W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. Lancet (London, England). 2007; vol.369(9573) : p.1641-1657. doi:10.1016/S0140-6736(07)60751-X
6. Balagopal A., Philp F.H., Astemborski J. et al. Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C." Gastroenterology. 2008; vol. 135(1): p.226-233. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.022
7. Brenchley J.M., Douek D.C. Microbial translocation across the GI tract. Annual review of immunology. 2012; vol. 30(1) : p.149-173. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075001
8. Dyavar S.R., Velu V., Titanji K. et al. Programmed death-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. The Journal of Clinical Investigation. 2012; vol.122(5): p.1712-1716. doi:10.1172/JCI60612
9. French A.L., Evans C.T., Agniel D.M. et al. Microbial translocation and liver disease progression in women coinfectd with HIV and hepatitis C virus. The Journal of infectious diseases. 2013; vol. 208(4) : p.679-689. doi:10.1093/infdis/jit225
10. Gastroenterologiya. Natsional'noe rukovodstvo: kratkoe izdanie (National guideline: short edition) [in Russian]. Moscow:GEOTAR-Media; 2015; p.480.
11. Guan Q., Zhang J. Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Mediators of Inflammation. 2017; 2017:4810258.doi:10.1155/2017/4810258
12. Khor B., Gardet A., Xavier R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature.2011; vol. 474(7351): p.307-317. doi:10.1038/nature10209
13. Kawada M., Arihiro A., Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease." World journal of gastroenterology. 2007; vol. 13(42): p.5581-5593. doi:10.3748/wjg.v13.i42.5581
14. Miller S.I., Ernst R.K., Bader M.W. Lipopolysaccharide (LPS), TLR4 and infectious disease diversity. Microbiology.2005; vol. 3 (1): p.36-46. doi:10.1038/nrmicro1068
15. Neurath M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. Immunology. 2014; vol. 14 (5): p.329-342. doi:10.1038/nri3661
16. Souza H.S., Fiocchi C.V. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. Gastroenterology & hepatology.2016; vol. 13(1): p.13-27. doi:10.1038/nrgastro.2015.186
17. Strober W., Fuss I.J., Blumberg R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. Annual review of immunology. 2002; vol. 20: p.495-549. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816
18. Uhlig H.H., Powrie F. Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. European journal of immunology. 2009; vol. 39 (8): p.2021-2026. doi:10.1002/eji.200939602