

І.В. Компанець, О.Г. Короткий, В.В. Нікольська, Л.І. Остапченко, С.В. Пилипенко

Продукція інтерферону лімфоцитами селезінки й тимуса щурів за умов тривалої гіпоацидності

Досліджено продукцію інтерферону лімфоцитами тимуса й селезінки щурів при гіпоацидності шлункового соку, змодельованої введенням омепразолу впродовж 28 діб. Показано, що при дії омепразолу в супернатантах клітинних культур тимоцитів і спленоцитів підвищується титр як спонтанного, так і індукованого фітогемаглютиніном А й циклофероном інтерферону, причому ефект є найбільш вираженим для тимоцитів. Це може свідчити про стимуляцію секреції інтерферону клітинами досліджених лімфоїдних органів. Можливо, при гіпоацидності посилюються синтез цитокіну, що може бути реакцією імунної системи на запальний процес у шлунково-кишковому тракті.

Ключові слова: інтерферон, лімфоцити, селезінка, тимус, омепразол, гіпоацидність

ВСТУП

Гіпергастринемія – патологічний стан, який виникає на тлі гіпоацидності, спровокованої дією інгібіторів H^+ , K^+ -АТФази плазматичної мембрани парієтальних клітин шлунка, наприклад, омепразолу [9, 11, 16].

Роль цитокінів у механізмах імунної відповіді, що розвивається в організмі при гіпергастринемії на тлі гіпоацидності, досліджена недостатньо. Згідно з літературними даними, за умов гіпоацидності у слизовій шлунка розвивається хронічний запальний процес, при якому утворюються лімфоїдні агрегати, посилюється секреція прозапальних цитокінів, зокрема, інтерферону- γ (ІФН- γ) і, меншою мірою фактору некрозу пухлин- α (ФНП- α) [13]. Попередні дослідження на моделі омепразолвикликаного гіпергастринемії показали підвищення вмісту прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІФН- γ , інтерлейкіну- 1β (ІЛ- 1β)) у сироватці крові щурів [3, 5, 16], у відповідь на запалення в шлунку. Остаточне не з'ясована реакція лімфоїдних органів на розвиток гіпоацидності. Актуально дослідити продукцію ІФН клітинами селезінки й тимуса, які відіграють провідну роль у процесах імунного реагування.

ІФН (I, II і III типів) – родина структурно споріднених цитокінів, які беруть участь у захисті організму від вірусних і бактеріальних інфекцій, мають протипухлинні властивості та викликають потужні імуномодулювальні ефекти: активацію й експансію регуляторних Т-лімфоцитів, стимуляцію продукції антитіл [10, 17].

Метою нашої роботи було дослідити продукцію ІФН лімфоїдними клітинами тимуса й селезінки щурів на тлі гіпоацидності, викликаного 28-добовим впливом омепразолу.

МЕТОДИКА

Дослідження було проведено на білих нелінійних щурах-самцях віком до 2 міс і масою 170–200 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Експерименти здійснювали згідно з міжнародними рекомендаціями (Страсбург, 1986). Тварин було розділено на 2 групи по 10 тварин у кожній. Шлункову гіпоацидність моделювали введенням омепразолу упродовж 28 діб, оскільки у попередніх дослідженнях було показано, що саме у цей термін у шлунку вперше проявляються цитоморфологічні зміни як реакція на запальний процес, викликаний гіпоацидністю

© І.В. Компанець, О.Г. Короткий, В.В. Нікольська, Л.І. Остапченко, С.В. Пилипенко

[1]. Щурам контрольної групи протягом 28 діб вводили внутрішньоочеревинно 0,2 мл води для ін'єкцій, щурам дослідної групи внутрішньоочеревинно вводили препарат «Омез®» («Dr.Reddy's», Індія) раз на добу у дозі 14 мг/кг (препарат був розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій) [5]. Евтаназію тварин здійснювали дислокацією шийних хребців через добу після останнього введення препарату, видаляли тимус і селезінку, отримували суспензію клітин, використовуючи середовище 199 («Sigma», США). Тимоцити виділяли [6], центрифугуючи суспензію клітин тимуса при швидкості 1500 г упродовж 10 хв. Спленоцити отримували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficoll-Paque (густина 1,077) («Sigma», США) [8]. Визначення кількості життєздатних клітин проводили фарбуванням 0,2%-м трипановим синім у камері Горяєва, життєздатні клітини в усіх експериментах становили не менше ніж 92 %.

Ізольовані з селезінки й тимуса лімфоцити у кількості $5 \cdot 10^6$ клітин / мл інкубували *in vitro* для індукції ІФН упродовж 24 год при 37°C у 5 мл живильного середовища, яке містило DMEM/F12, 10%-ну ембріональну сироватку теляти, 2 ммоль/л L-глутаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину і канаміцину, 10 мкг/мл флуконазолу. Паралельно лімфоцити інкубували *in vitro* з фітогемаглютиніном А (ФГА) у концентрації 20 мкг/мл і циклофероном у концентрації 50 мкг/мл. Клітини осаджували центрифугуванням при швидкості 200 г упродовж 5 хв, у супернатантах визначали титр сумарного ІФН мікрометодом за пригніченням цитопатогенної дії вірусу везикулярного стоматиту на перевивну культуру фібробластів щурів [15].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на персональному комп'ютері, оцінку достовірності здійснювали за допомогою програми Statistica 7.0 з використанням критерію t Стьюдента, відмінності вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було вивчено вплив гіпергастринемії на тлі викликані омепразолом шлункової гіпоацидності на продукцію сумарного ІФН лімфоцитами селезінки й тимуса щурів. У попередніх дослідженнях на моделі гіпоацидності встановлено, що при 28-добовому введенні щурам омепразолу у шлунку тварин з гіпоацидністю виникають дисбіотичні зміни, а у крові зростає концентрація гастрину та вміст ІФН- γ [5]. Нами встановлено, що при введенні щурам омепразолу секреція спонтанного ІФН тимоцитами посилюється: його титр у супернатанті їх клітинних культур підвищувався порівняно з контрольною групою у 2,5 раза (рисунок, а). Індукована циклофероном продукція ІФН була більш вираженою у тварин з гіпоацидністю, ніж у контролі. При інкубації ізольованих тимоцитів з цим препаратом досліджуваній показник зростав відносно спонтанного ІФН на 163 % у контрольній групі та у 2 рази у дослідній. Індукована фітогемаглютиніном (ФГА) продукція ІФН тимоцитами змінювалася протилежним чином: була більшою у контролі порівняно з гіпоацидністю. Титр ІФН у супернатанті клітинної культури тимоцитів, інкубованих з ФГА, збільшувався відносно спонтанного ІФН на 138 % у тварин контрольної та на 50 % у щурів дослідної груп відповідно.

Дослідження впливу омепразолу на лімфоцити селезінки щурів показало, що продукція ІФН цими клітинами посилюється, але в лімфоцитах тимуса вона стимулюється набагато більше. Титр спонтанного ІФН у супернатанті клітинної культури спленоцитів щурів, яким вводили омепразол, підвищувався на 31 % (див.рисунок, б). Водночас як для тимоцитів цей показник збільшувався на 150 %. Індукована обома використаними препаратами (циклофероном і ФГА) продукція цього цитокіну спленоцитами була більш вираженою при дії омепразолу, ніж у контролі.

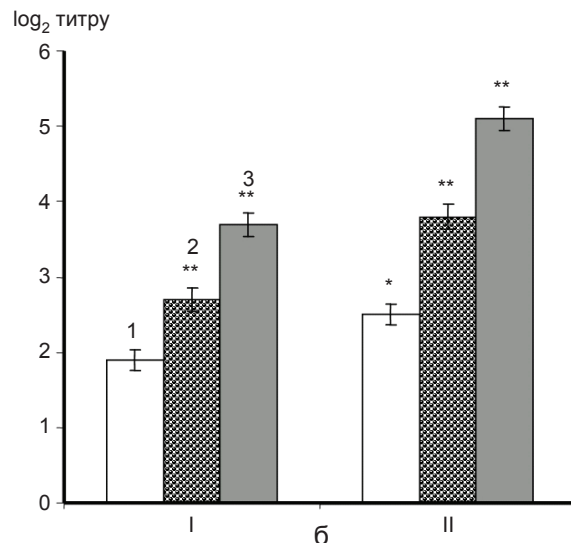
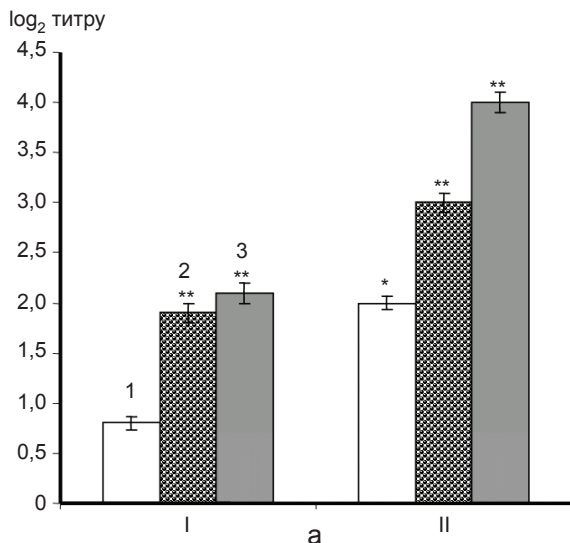
При інкубації з циклофероном титр ІФН у супернатантах клітинних культур спленоци-

тів щурів контрольної групи збільшувався на 95 % відносно спонтанного ІФН, а в тварин з гіпоацидністю – на 104 %. Інкубація цих клітин з ФГА призводила до збільшення досліджуваного показника на 42 % у контролі та 52 % при гіпоацидності.

Таким чином, ми показали, що у щурів при шлунковій гіпоацидності, яка викликана введенням омепразолу, посилюється секреція сумарного ІФН лімфоцитами тимуса й селезінки. Було виявлено підвищення титру не тільки індукowanego, а й спонтанного ІФН. Імовірно, процеси, які виникають в організмі у відповідь на гіпоацидність, індують синтез ІФН у клітинах лімфоїдних органів. До того ж, за цих умов підвищується здатність лімфоїдних клітин виробляти ІФН у відповідь на індукцію (дію циклоферону та ФГА). Отже, ми припускаємо, що в тимоцитах і спленоцитах при дії омепразолу стимулюється синтез ІФН. На користь цього свідчать експериментальні дані, отримані іншими авторами, які проводили дослідження на мишах: було показано, що при гіпохлоргідрії у 12 разів посилюється експресія ІФН- γ у лімфоцитах слизової шлунка [13].

На нашу думку, синтез ІФН лімфоцитами при гіпоацидності посилюється внаслідок розвитку дисбактеріозу. Як було показано на обраній нами моделі гіпоацидності, в результаті тривалого пригнічення омепразолом шлункової секреції у шлунку з'являється умовно-патогенна мікрофлора [5, 7]. У відповідь на це в лімфоцитах слизової вірогідно стимулюється синтез ІФН. Експериментально підтверджено, що компоненти клітинної стінки бактерій, взаємодіючи з Toll-подібними рецепторами на лімфоцитах, індують синтез ІФН- γ [18]. Не виключено, що запальний процес, котрий, як було показано Вороніною та співавт. [1], виникає при зміні складу шлункової мікрофлори, впливає на стан клітин лімфоїдних органів.

Ми також припускаємо, що секреція ІФН тимоцитами і спленоцитами щурів підвищується в результаті дії самого гастрину. Експериментально доведено посилення його синтезу в G-клітинах шлунка при зниженні секреції соляної кислоти [11]. Цей гормон є фактором росту шлункового епітелію і також викликає розвиток запалення. На обраній нами моделі омепразолвикликаній



Титр інтерферону (ІФН) у супернатантах клітинних культур лімфоцитів тимуса (а) і селезінки (б) щурів із гіпоацидністю шлункового соку, викликаного 28-добовим введенням омепразолу: I – тварини контрольної групи; II – тварини, яким вводили омепразол; 1 – без індуктора, 2, 3 – лімфоцити інкубували *in vitro* з фітогемаглютиніном А і з циклофероном відповідно. *P<0,05 порівняно з контролем (клітини інтактних тварин), **P<0,05 порівняно з клітинами, не інкубованими з індукторами ІФН

гіпергастринемії продемонстровано гіперплазію парієтальних клітин слизової оболонки шлунка на тлі запалення [1]. Згідно з даними літератури, метапластичні зміни у слизовій шлунка супроводжуються розповсюдженням запальних інфільтратів і посиленням експресії ІФН- γ у лімфоцитах [12]. У мишей при хронічному запаленні шлункового епітелію внаслідок гіпохлоргідрії посилюється секреція ІФН- γ [13]. Останній індукує експансію клітин фундального відділу шлунка, що в решті-решт призводить до гіперплазії [13].

Крім вищезгаданого, ми пов'язуємо стимуляцію продукції ІФН лімфоцитами тимуса і селезінки щурів з гіпоацидністю з підвищенням вмісту прозапальних цитокінів ІФН- γ , ФНП- α , та ІЛ-1 β у сироватці крові, яке було показано у попередніх дослідженнях [3, 5, 16]. Лімфоцити, які інфільтрують у шлунок у відповідь на запалення, зумовлене дисбактеріозом, секретують прозапальні цитокіни. Результатом цього є поява у кровотоці ІФН- γ , ФНП- α , та ІЛ-1 β . Це, ймовірно, призводить до змін функціонального стану лімфоїдних органів (тимуса й селезінки), проявом яких є посилення продукції ІФН їх клітинами.

Слід зазначити, що стимуляція секреції ІФН лімфоцитами тимуса і селезінки може відбуватися за різними механізмами. Відомо, що тимус дуже чутливий до зрушень в імунонейроендокринній системі, особливо до змін вмісту різних цитокінів в організмі та гормонального фону [2]. На нашу думку, порушення складу шлункової мікрофлори і зміна продукції цитокінів, при гіпоацидності, впливає на стан тимоцитів, внаслідок чого посилюється секреція ними ІФН. Показано, що при тривалій дії омепразолу у тимусі підвищувався відносний вміст лімфоїдних клітин поряд зі зменшенням відносної маси органа [4]. Автори пов'язували такі зміни з посиленням проліферації Т-лімфоцитів, які будуть надходити в органи периферичної імунної системи для участі в імунній відповіді. Отже, лімфоцити тимуса реагують на запальний процес, що виникає на тлі гіпоа-

цидності внаслідок дисбактеріозу у шлунку, виробляючи підвищені кількості ІФН. Можливо, це буде одним з ініціюючих факторів запуску процесів імунного реагування, пов'язаного з тимусозалежними зонами вторинних лімфоїдних органів.

Селезінка – вторинний лімфоїдний орган, який є головним джерелом циркулюючих лімфоцитів [2]. Вона є високочутливою до змін імунологічного статусу організму. Ми показали, що при гіпоацидності посилюється секреція спонтанного та індукованого ІФН спленоцитами щурів, хоча є менш вираженою (на 31 %), ніж для тимоцитів (на 150 %). Це узгоджується з даними, що були отримані в попередній роботі [4]: при 28-добовій дії омепразолу у щурів спостерігаються помірно збільшення селезінки та зростання вмісту в ній лімфоїдних клітин.

Можливо, процеси, які ініціюються чужорідними антигенами при дисбактеріозі внаслідок гіпоацидності (зокрема, продукція прозапальних цитокінів, посилення міграції дозрілих Т-лімфоцитів з тимуса, підвищення продукції ІФН- γ) призводять до активації імунної відповіді. Це проявляється у стимуляції вироблення ІФН лімфоцитами селезінки та, ймовірно, супроводжується експансією на периферію лімфоцитів, сенсibiliзованих антигенами.

Таким чином, підвищення секреції ІФН лімфоцитами на омепразолвикликаній моделі гіпоацидності слід вважати реакцією імунної системи на запальний процес у шлунку, до якої залучені не тільки клітини лімфоїдної тканини, асоційованої зі шлунком, а й клітини лімфоїдних органів тимуса й селезінки.

**И.В. Компанец, О.Г. Короткий,
В.В. Никольская, Л.И. Остапченко,
С.В. Пилипенко**

ПРОДУКЦИЯ ИНТЕРФЕРОНА ЛИМФОЦИТАМИ СЕЛЕЗЕНКИ И ТИМУСА КРЫС ПРИ УСЛОВИИ УСЛОВНОЙ ГИПОАЦИДНОСТИ

Исследована продукция интерферона лимфоцитами тимуса и селезенки крыс при гипoaцидности желудочного сока,

моделюємою введенням омепразола в течение 28 сут. Показано, що при действии омепразола в супернатантах клеточных культур тимоцитів и спленоцитів підвищується титр як спонтанного, так и индуцированного фітогемаглютиніном А и циклофероном інтерферона, причем ефект являється найбільше вираженим для тимоцитів. Это свідечує о стимуляції секреції інтерферона клетками изучених лімфоїдних органів. При гіпоацидності посилюється синтез цитокину, что может быть реакцией иммунной системы на воспалительный процесс в желудочно-кишечном тракте.

Ключевые слова: інтерферон, лімфоцити, селезенка, тимус, омепразол, гіпоацидність.

**I.V. Kompanets, O.G. Korotkiy, V.V. Nikolska,
L.I. Ostapchenko, S.V. Pilipenko**

THE INTERFERON PRODUCTION BY RAT SPLEEN AND THYMUS LYMPHOCYTES IN CONDITONS OF HYPOACIDITY

The interferon production by rat spleen and thymus lymphocytes in conditions of gastric juice hypoacidity, evoked by 28 days of omeprazole treatment, was studied. It was shown that the spontaneous and induced by PHA and cycloferone interferon titer increases in thymocyte and spleenocyte cell cultures under the action of omeprazole. This effect was more expressed in thymocytes. It might be a result of stimulation of interferon secretion by lymphoid cells. Probably the interferon synthesis intensifies in conditions of hypoacidity. This effect may be considered as the reaction of immune system on inflammation in gastro-intestinal tract.

Key words: interferon, lymphocytes, spleen, thymus, omeprazole, hypoacidity.

SSC Institute of Biology Taras Shevchenko National Medical University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вороніна О.К., Гришук В.М. Динаміка змін в слизовій оболонці шлунка щурів при гіпергастринемії різної тривалості // Тези доп. III Всеукр. наук. конф. «Психологічні та вісцеральні функції в нормі і патології». – К., 4–6 жовтня 2006 р. – С. 24.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Одесса: Астропринт, 1999. – 603 с.
3. Короткий О.Г., Карповець Т.П., Пилипенко С.В., Берегова Т.В., Остапченко Л.І. Концентрація фактору некрозу пухлин альфа в сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотиків // Мед. хімія. – 2009. – 11, № 4. – С. 89–91.
4. Короткий О.Г., Пилипенко С.В., Компанець І.В., Остапченко Л.І. Реакція лімфоїдних органів щурів на ве-

дення мультипробіотика «Симбітер» ацидофільний» концентрований за умов тривалого зниження шлункової секреції соляної кислоти // Вісн. проблем біології і медицини. – 2010. – Вип. 3. – С. 55–60.

5. Короткий О., Пилипенко С., Цирюк О., Остапченко Л., Берегова Т. Вплив мультипробіотиків на вміст інтерферону-гамма в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності // Вісн. Київ. нац. ун-ту. Біологія. – 2009. – вип. 54. – С. 47–49.
6. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Иммунологическая функция тимуса // Успехи совр. биологии. – 1985. – 97, № 1. – С. 36–49.
7. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Вплив омепразол-викликаної гіпергастринемії на базальну шлункову секрецію у щурів // Вісн. проблем біології і медицини. – 2007. – Вип. 3. – С. 38–43.
8. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand. J.Clin. Lab. Invest. – 1968. – 21. – P. 28–30.
9. Brett S. Science review: The use of proton pump inhibitors for gastric acid suppression in critical illness // Critical Care. – 2005. – 9. – P. 45–50.
10. Content J. Mechanisms of induction and action of interferons // Verh. K. Acad. Geneesk. Belg. – 2009. – 71, № 1–2. – P. 51–71.
11. Creutzfeldt W., Lamberts R. Is hypergastrinaemia dangerous to man? // Scand. J. Gastroenterol. – 1991. – 180. – P. 179–191.
12. Jain R.N., Al-Menhali A.A., Keeley Th.M., Ross T.S., Chew C.S. and Samuelson L.C. Hypergastrinemia and hypertrophic gastritis in Hip1r-deficient mice // The FASEB J. – 2007. – 21. – P. 925–930.
13. Kang W., Rathinavelu S., Samuelson L.C., Merchant J.L. Interferon gamma induction of gastric mucous neck cell hypertrophy // Lab. Invest. – 2005. – 85, № 5. – P. 702–715.
14. Korotkiy O., Karpovets T., Pilipenko S., Bereгова T., Ostapchenko L. Proinflammatory cytokines concentrations in blood serum of rats with the long-term suppression of gastric secretion of hydrochloric acid in conditions of injection of probiotic // 35th FEBS Congress Goteborg (Gothenburg), Sweden, June 26 – July 1, 2010. – P. 65.
15. Nikolskaya V.V., Nikolskii I.S., Shulkevich T.P. Stimulation of the interferon synthesis in mice with various tumors by the thymic factor thymoinduction // 3rd Balkan Congress of Immunology. – Athens, Greece, 2001. – P. 77.
16. Prewett E.J., Hudson M., Nwoko C.U., Sawyer A.M., Pounder R.E. Nocturnal intragastric acidity during and after a period of dosing with either ranitidine or omeprazole // Gastroenterology. – 1991. – 100, № 4. – P. 873–877.
17. Takaoka A., Yanai H. Interferon signalling network in innate defence // Cell. Microbiol. – 2006. – 8, № 6. – P. 907–922.
18. Uematsu S., Akira S. Toll-like receptors and type I interferons // J. Biol. Chemistry. – 2007. – 282, № 21. – P. 15319–15324.

*ННЦ Ін-т біології Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка
E-mail: ir_kot@ukr.net*

Матеріал надійшов до редакції 14.12.2012