

Влияние гормонально-метаболических изменений на воспалительные реакции у крыс при повреждении миокарда в эксперименте

Хидирова Л. Д., кандидат медицинских наук, преподаватель кафедры биологической химии ГОУ ВПО Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск

Influence hormonal-metabolic changes to inflammatory reactions in rats during the damage of myocardium in the experiment

Hidirova L. D.

Резюме

В работе проведено исследование изменений воспалительной реакции у крыс с экспериментальной моделью метаболического инфаркта миокарда. Показано, что биоцидная активность эфферторов воспаления – нейтрофилов в этих условиях повышается в два – три раза ($p < 0.05$) с одновременным снижением резервов биоцидности в 1,7 - 2,3 раза ($p < 0.05$). Изменения биоцидности нейтрофилов сопровождалась повышением содержания в крови провоспалительных цитокинов, нарушением баланса между перекисным окислением липидов и антиоксидантной активностью. В этих условиях обнаружено увеличение содержания липопротеидов низкой и очень низкой плотности, а также снижение ЛПВП2 и повышение ЛПВП3. **Ключевые слова:** Инфаркт миокарда, биоцидность нейтрофилов, перекисное окисление липидов, плазменные липопротеиды.

Resume

The hormonal influence to the inflammatory reaction in rats with the experimental model of the metabolic myocardial infarction was investigated. It was shown that oxygen-dependent biocidity of the neutrophils under these conditions rised two- or threefold ($p < 0.05$) which accompanied reduction of biocidity reserves 1,7 - 2,3-fold ($p < 0.05$). Changes of neutrophils biocidity were accompanied by increase of the blood inflammatory cytokins content, by the disturbance of the balance between the lipids peroxidation and antioxidant activity. Under these conditions the increase of the low and very low density lipoproteins contents, and also a decrease LPVP2 and increase LPVP3 were found out.

Key words: metabolic myocardial infarction, biocidity of neutrophils, the lipids peroxidation, plasma lipoproteins.

Введение

Воспаление, как сложная аварийная реакция организма на повреждение, лежит в основе большинства заболеваний человека, включая коронарогенные и некоронарогенные повреждения миокарда [1, 2]. Известно, что течение, развитие, появление осложнений и исход воспаления определяется активностью основных эффекторных механизмов, среди которых важное место занимают полиморфно-ядерные лейкоциты (ПМЯЛ) крови, макрофаги, а также гуморальные факторы воспаления, такие как штокны, компоненты системы комплемента, про- и антиоксидантные системы [3, 4, 5]. Ранее показано, что инфаркт миокарда является сильнейшим стрессом для организма и сопровождается изменением гормонального фона, которое заключается в повышении продукции глюкокортикоидов, адреналина, тиреоидных гормонов и снижением продукции инсулина [6].

Рост напряженности людей в современном обществе обуславливает все большую распространенность не только коронарогенного, но и некоронарогенного инфаркта миокарда [2]. Вместе с тем патогенетические механизмы раз-

вития именно некоронарогенного повреждения миокарда остаются совершенно недостаточно изученными. Это определяет острую необходимость выяснения причин и условий развития воспалительных и деструктивно-дистрофических нарушений в клетках и тканях под влиянием эндокринно-метаболических факторов (гипонсулинемия, глюкокортикоиды, катехоламины, липопротеиды крови, баланс про- и антиоксидантных процессов в организме).

Целью настоящего исследования было выявление роли гормонально-метаболических изменений, характерных для инфаркта миокарда, в развитии воспалительных реакций при некоронарогенном повреждении миокарда в эксперименте.

Материал и методы исследования

В исследованиях использовали 100 крыс-самцов Вистар массой 180 - 220г. Все экспериментальные животные были поделены на четыре группы: 1-я группа - контрольные (интактные) животные. Группой сравнения служили крысы с легким аллоксан-индуцированным снижением продукции инсулина (100-120 мг аллоксана на крысу г/к) (2-я группа). Метаболический инфаркт миокарда вызывали подкожным однократным введением адреналина (0.1 мл 0.1% раствора на 100 г массы тела) интактным животным (3-я группа) или ежедневным введением адреналина в течение 6 дней на фоне снижения уровня инсулина (4-я группа). Инфаркт миокарда подтверждали с помощью анализа данных ЭКГ, а также с помощью гистологического контроля.

Ответственный за ведение переписки -

Хидирова Людмила Даудовна,
630112, г.Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 63, кв.48.
тел. (383) 211-53-44 (дом);
89134888234 (сотовый);
e-mail: h_ludmila73@mail.ru

Таблица 1. Средние показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста (в %) в нейтрофилах крыс с МИМ на 14-е сутки эксперимента

Условия опытов	Контроль	Аллоксан	Адреналин однократно	Адреналин в течение 6 дней + Аллоксан
сНСТ	5,3±0,33	10,2±1,11*	16,8±3,08*	18,8±1,49*
зНСТ	16,2±1,11	17,9±1,43	21,9±2,89*	24,9±1,95*
НС	3,05±0,07	1,75±0,06*	1,3±0,03*	1,3±0,03*

Примечание: Число животных в каждой группе - 10;
звездочкой (*) отмечены достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$.

Таблица 2. Изменения концентрации продуктов ПОЛ в сыворотке крови у животных 4-й группы в динамике развития МИМ (адреналин + аллоксан) (в ед. опт. плот. на мл; М + m).

Условия опытов	МДА	ДК	Дикетоны
Контроль	8,9±0,36	1,19 ± 0,07	0,25 ± 0,03
МИМ 1-е сутки	10,2±0,32*	1,30 ± 0,06	0,37 ± 0,04*
МИМ 3-и сутки	14,3±0,76*	1,52 ± 0,05*	0,48 ± 0,06*
МИМ 14-е сутки	14,9±0,54*	1,67 ± 0,06*	0,47 ± 0,05*

Примечание. Число животных на каждом сроке эксперимента по 10; * - достоверные отличия от соответствующих показателей у контрольных животных, $p < 0,05$.

Таблица 3. Изменение активности каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и концентрации восстановленного глутатиона (GSH) в крови у крыс 4-й группы в динамике развития МИМ (адреналин + аллоксан) (М + m).

Условия опытов	Каталаза (моль/л/мин)	GSH (мг%)	СОД (усл.ед/л.)
Контроль (8)	8,3±0,32	10,6±0,57	4,01 ± 0,32
МИМ 1-е сутки (10)	5,79 ± 0,13*	4,27 ± 0,35*	3,48 ± 0,30
МИМ 3-и сутки (10)	10,2±0,21*	7,12±0,33*	2,96 ± 0,15*
МИМ 14-е сутки (10)	6,7±0,32*	6,5±0,31*	3,78 ± 0,17

Примечание. * - достоверные отличия от соответствующих показателей у интактных животных, $p < 0,05$;
В скобках - число экспериментов.

Таблица 4. Изменение содержания лизосомальных катионных белков (ЛКБ) в нейтрофилах крыс под влиянием аллоксана и адреналина (7-е сутки эксперимента).

Показатели	Контрольные крысы	Аллоксановые	Адреналин + Аллоксан
ЛКБ	0,8±0,04	0,9±0,04	0,6±0,04*

Примечание. Показатель ЛКБ выражен в условных единицах; число животных в каждой группе - по 10;
* - достоверные отличия от показателей у контрольных и аллоксановых животных.

Крыс забивали под эфирным наркозом путем декапитации на 1-е, 3-е и 14-е сутки эксперимента - по 10 крыс на каждый срок и брали для исследования цельную кровь, сыворотку крови и ткань сердца экспериментальных животных.

Для определения кислород зависимой функциональной активности нейтрофилов и их биохимического резерва использовали спонтанный тест с нитросиним тетразолиевым (сНСТ-тест) и индуцированный зимозаном НСТ-тест (зНСТ-тест). В качестве стимулятора использовалась 0,1% суспензия зимозана ("Sigma", США). Результат выражался в процентах диформаза положительных нейтрофилов (ДПН) на 100 нейтрофилов, либо в индексах стимуляции (ИС). Последний рассчитывался отношением процента индуцированных зимозаном ДПН к проценту ДПН в сНСТ-тесте [7].

Определение содержания катионных белков в нейтрофилах периферической крови проводили с помощью лизосомально-катионного (ЛКТ) теста цитохимическим методом [8].

Кроме того, для оценки активности воспалительного процесса, сопровождающего инфаркт миокарда, проводили определение содержания цитокинов интерлейкина 1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина 6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли (ФНО- α) в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием реагентов ProCon («Протеиновый контур», Санкт-Петербург, Россия).

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и дикетонов [9].

Состояние антиоксидантной защиты (АОЗ) определялось по активности каталазы [9], супероксиддисмутазы (СОД) [10] и содержанию восстановленного глутатиона [11].

В крови измеряли общее содержание суммарной фракции липопротеидов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП), а также и изменения спектра плазменных липопротеидов [12].

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась по общепринятым методикам с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0, Microsoft Excel 7.0 на ПК PC Pentium (III)-650 МГц MMX. Выборочные данные проверялись на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка для применения параметрических методов вариационного анализа с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего (n), где n – количество измерений. Уровень значимости $<0,05$ принимался за достоверный.

Результаты и обсуждение

Значительная активация симпатoadrenalno-вой системы [2, 5, 6, 13], обнаруженная при инфаркте миокарда является ведущим фактором увеличения метаболических запросов сердечной мышцы. В таких условиях можно ожидать развития некоронарного повреждения миокарда, которое можно назвать метаболическим инфарктом миокарда (МИМ) [1].

В связи с этим представлялось важным исследовать динамику развития некротических изменений в миокарде и сопровождающих их воспалительных реакций при нагрузке катехоламинами и снижении синтеза инсулина под влиянием аллоксана. Гистологический контроль срезов из сердечной

мышцы крыс с МИМ показал, что некротические изменения, после введения адреналина развивались постепенно, достигая максимума к 7-м суткам от начала эксперимента. Так же постепенно происходило и накопление в миокарде нейтрофилов и мононуклеаров.

Учитывая накопление нейтрофилов при МИМ, следовало определить их функциональную активность. Уже одно только снижение продукции инсулина с помощью аллоксана увеличивало величину сНСТ-теста почти вдвое. Однократное введение адреналина повышало показатели сНСТ-теста более чем в 3 раза. Длительное введение (в течение 6 дней) катехоламинов на фоне сниженной продукции инсулина увеличивало показатели сНСТ-теста в 3,5 раза (табл. 1). Показатели индуцированного зимозаном НСТ-теста повышались по мере нарастания изменений гормонального фона гораздо медленнее: аллоксан увеличивал показатели зНСТ-теста всего на 10%, однократное введение адреналина – на 35%, длительное введение адреналина на фоне аллоксана – на 54%. Отсюда, индексы стимуляции нейтрофилов, характеризующие их резервы биохимичности резко снижались по мере развития некротических процессов в миокарде. Наиболее сильное падение индекса стимуляции отмечалось у крыс, которым на фоне нарушенной продукции инсулина под влиянием аллоксана в течение 6 дней вводили адреналин, т.е. именно у тех животных, у которых были более всего выражены деструктивные изменения в миокарде. Таким образом, гормональные перестройки в организме экспериментальных животных вели к значительному снижению биохимических резервов нейтрофилов крови [10].

Кроме того, гормональные перестройки в организме экспериментальных животных вели к повышению накопления продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (табл. 2).

Этот процесс нарастал параллельно с увеличением размеров повреждения миокарда. Одновременно на фоне повышенной продукции липоперексидей наблюдалось снижение антиоксидантной защиты (табл. 3), что еще более уменьшало возможность противостоять повреждающему миокард действию продуктов ПОЛ [14, 15]. Нарушение сбалансированного состояния между процессами ПОЛ и активностью антиоксидантной системы защиты приводит к "окислительному стрессу", индуцирует экзцитоз преформированных и вновь синтезированных медиаторов [16, 17, 21].

Результаты исследования показали также, что у крыс с нарушением гормональной регуляции развитие метаболического инфаркта миокарда сопровождалось снижением по сравнению с контролем, количества катионных белков в нейтрофилах (табл. 4).

Установлено, что величины показателей ЛКБ коррелировали со степенью развития некротических изменений в миокарде. Низкое содержание катионных белков в нейтрофилах свидетельствовало о их функциональной неполноценности. Дегрануляционная способность нейтрофилов, обеспечивающая их кислород независимую биохимичность, восстановилась только к концу наблюдения - к 14 суткам.

У крыс с МИМ в соответствии с динамикой биохимичности нейтрофилов содержание в крови провоспалительных цитокинов ФНО- α и интерлейкина-1 β с первых суток эксперимента нарастало по мере развития изменений в миокарде

Таблица 5. Изменения содержания цитокинов в сыворотке крови у крыс в динамике развития МИМ

Условия опытов	Контроль (10)	МИМ 1-е сутки (10)	МИМ 3-и сутки (10)	МИМ 14 суток (10)
ФНО- α (пкг/мл)	5,5 \pm 0,03	7,3 \pm 1,09*	10,7 \pm 1,11*	12,6 \pm 1,23*
Ил-1 β (пкг/мл)	6,0 \pm 0,18	7,4 \pm 0,67	8,3 \pm 0,64*	11,1 \pm 0,78*
Ил-6 (пкг/мл)	2,0 \pm 0,08	2,8 \pm 0,08	5,8 \pm 0,13*	11,0 \pm 0,38*

Примечание: В скобках – число животных;

* - достоверные отличия от показателей у контрольных животных, $p < 0,05$.

(табл. 5). Выработка ИЛ-6 начала возрастать гораздо позже – на третьи сутки МИМ.

Гормональная модель МИМ у крыс сопровождалась также целым рядом метаболических изменений, среди которых особо следует отметить увеличение содержания суммарной фракции липопротеидов низкой и очень низкой плотности, а также значительные изменения спектра плазменных липопротеидов. При этом выявлено перераспределение в сторону снижения ЛПВП2 и повышения ЛПВП3. Липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) в базальных условиях являются противовоспалительным фактором, способным разрушать окисленные липиды, генерирующие воспа-

лительный ответ. Однако ЛПВП во время острого воспаления изменяются и сами становятся провоспалительными. Такая "хамелсоно-подобная" природа ЛПВП зависит от сложной композиции ЛПВП. Эти данные демонстрируют ключевую роль ЛПВП в модуляции воспаления и его осложнения в виде атерогенеза [1, 18,19,20].

Таким образом, в модели адреналин-индуцированного инфаркта миокарда удалось выявить связь воспалительных реакций, сопровождающих повреждение миокарда, с повышением уровня катехоламинов в организме животных. Определенное значение в этом имеют также сопутствующие метаболические изменения. ■

Литература:

1. Маянский ДН. Лекция по клявической патологич-М: «ГЭОТАР-Медиа». 2008
2. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.-М.: «Медцина»; 1984
3. Благосклонная Я.В., Шляхто Е.В., Красильникова Е.И. Метаболический сердечно-сосудистый синдром. Русской Медицинской журнал 2001; 9 (2): 67-81.
4. Климов А.Н., Нязульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз Санкт-Петербург, 1995
5. Ольбинская Л.И., Литвицкий П.Ф. Коронарная и миокардиальная недостаточность. М.:Медцина; 1986
6. Кузмов А.Д., Якобсон Г.С. Инфаркт миокарда. Клявические и патофизиологические аспекты. Новосибирск; 1992
7. Маянский ДН, Щербаков В.И., Макарова О.П. Комплексная оценка функций фагоцитов при воспалительных заболеваниях. Методические рекомендации. Новосибирск: МЗ РСФСР, 1985
8. Пятаревский В.Е. Новое в клявико-морфологической оценке функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов. Кляв. морфология нейтрофильных гранулоцитов. 1988
9. Камышников В.С. Справочник по клявико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: «Беларусь»; 2000
10. Kawaguchi T, Suzuki K, Matsuda Y, et al, Serum-manganese-superoxide dismutase: normal values and increased levels in patients with acute myocardial infarction and several malignant diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. J. Immunol. Methods 1990; 127: 249-254
11. Gunzler WA, Flohe L. Glutathione peroxidase. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.-Boca Raton: CRC Press; 1986
12. Лабораторные методы исследования в клявике (под ред. В.В.Меньшикова). М.: «Медцина»; 1987
13. Соколов Е.И. Эмоции, гормоны и атеросклероз. М.: "Наука": 1991
14. Явелов И. С., Новое свидетельство ненужности внутривенной инфузии смеси глюкозы, инсулина и калия при остром инфаркте миокарда: результаты мета-анализа исследования CREATE-ECLA и OASIS-6 - 2008 Кардиология 2008. - Т. 48, № 1. - С. 76
15. Сисакян С. А., Феномен предотвращения острого адреналинового некроза миокарда искусственной вентиляцией легких в эксперименте - 2007 Российский кардиологический журнал 2007. - №1. - С. 71-73
16. Bagchi D, Das DK, Engelman RM, et al Polymorphonuclear leucocytes as potential source of free radicals in the ischaemic-reperfused myocardium. Eur Heart J 1990;11:800-813.
17. Baggolini M, Kheren P, Deranleau D.A, et al. Control of motility, exocytosis and the respiratory burst in human neutrophils. Biochem. Soc. Trans. 1991; 19: 56-59.
18. Van Lenten BJ; Navab M; Shih D; Fogelman AM; Lusis AJ. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. Trends Cardiovasc Med 2001;1(3-4):155-161.
19. Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradies G. J Physiol Heart Circ Physiol. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. 2009 Oct;297(4):H1487-93. Epub 2009 Aug 14.
20. Sattar N, Murray HM, Welsh P, Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER) Study Group. Division of Cardiovascular and Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK. Are markers of inflammation more strongly associated with risk for fatal than for nonfatal vascular events? 2009 Epub 2009 Jun 23.
21. Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradies G. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. Physiol Heart Circ Physiol 2009 Oct;297(4):H1487-93. Epub 2009 Aug 14.