

ПРОЯВЛЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ХАРАКТЕРА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

[Л. Д. Хидирова](#)

*ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)*

Цель исследования: изучить особенности воспалительной реакции у крыс Вистар с некоронарогенным метаболическим инфарктом миокарда (МИМ). *Методы исследования:* электрокардиографическая и гистологическая верификация МИМ. Определение биоцидной активности нейтрофилов крови, активности антиоксидантной защиты, накопления продуктов перекисного окисления липидов, концентрации провоспалительных цитокинов, изменения спектра плазменных липопротеидов. *Результаты исследования.* У крыс с МИМ обнаруживалось значительное увеличение биоцидной активности нейтрофилов, нарушение баланса между показателями про- и антиоксидантной систем, происходила перестройка липопротеидного спектра плазмы в сторону повышения провоспалительных липопротеидов, повышалось выделение провоспалительных цитокинов: ТНФ- α , интерлейкинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 в сыворотке крови.

Ключевые слова: некоронарогенный инфаркт миокарда, биоцидность лейкоцитов, ПОЛ и АОЗ, цитокины, плазменные липопротеиды.

Хидирова Людмила Даудовна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: h_ludmila73@mail.ru

Введение. Воспаление, как сложная аварийная реакция организма на повреждение, лежит в основе большинства заболеваний человека, включая коронарогенные и некоронарогенные повреждения миокарда [5, 6]. 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 цитокины, компоненты системы комплемента, лизосомальные ферменты, про- и антиоксидантные системы [7].

Рост напряженности людей в современном обществе обуславливает все большую

распространенность не только коронарогенного, но и некоронарогенного инфаркта миокарда (ИМ) [6]. Вместе с тем патогенетические механизмы развития именно некоронарогенного повреждения миокарда остаются недостаточно изученными. Это определяет острую необходимость выяснения причин и условий развития воспалительных и деструктивно-дистрофических нарушений в клетках в этих условиях.

Целью настоящего исследования было выявление особенностей воспалительной реакции в динамике развития некоронарогенного повреждения миокарда в эксперименте.

Материал и методы исследования. В исследованиях использовали 117 крыс-самцов Вистар, полученных из вивария НГМУ, массой 180–220 г. Содержание и использование лабораторных животных полностью соответствовало правилам, принятым в данном учреждении, рекомендациям Национального совета по исследованиям и национальным законам. Метаболический инфаркт миокарда (МИМ) воспроизводили у животных подкожным введением ежедневно в течение недели раствора адреналина (0,2 мл 0,1 % раствора на крысу). ИМ подтверждали с помощью анализа данных электрокардиографии (ЭКГ), а также с помощью гистологического контроля. Изменения на ЭКГ появлялись уже через 24 часа после первой инъекции адреналина. Через неделю после ежедневного введения адреналина на ЭКГ отмечалась депрессия сегмента ST, и появлялся отрицательный зубец T. Гистологическое исследование выявило постепенно нарастающее развитие некротических и некробиотических процессов в миокарде с пиком обнаруженных нарушений на 7-е сутки от начала эксперимента. Кроме того, в миокарде экспериментальных животных обнаруживалось накопление лейкоцитов, группировавшихся вокруг очажков повреждения миокардиоцитов. Среди лейкоцитов преобладали нейтрофильные гранулоциты.

Животных забивали под эфирным наркозом путем декапитации на 1, 3, 7 и 14-е сутки эксперимента по 10–12 крыс на каждый срок. От экспериментальных животных брали для исследования цельную кровь, сыворотку крови и ткани сердца (для гистологического исследования).

Для определения кислород-зависимой функциональной активности нейтрофилов и их бицидного резерва использовали спонтанный тест с нитросиним тетразолиевым (сНСТ). Результат выражался в процентах диформаза положительных нейтрофилов (ДПН) на 100 нейтрофилов. Кроме того, в крови измеряли интенсивность хемилюминесценции (ХМЛ) нейтрофилов на биохемилюминометре СКИФ-0301 (СКТБ «Наука», Красноярск, Россия) с люминалом (5-амино-2.3-дигидрофалазиндион-1.4) в качестве люминофора [1].

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации в крови малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и дикетонов. В гемолизате эритроцитов определяли активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона, в сыворотке крови измеряли активность супероксиддисмутазы (СОД) [3].

Для оценки активности воспалительного процесса, сопровождающего ИМ, проводили определение содержания цитокинов: интерлейкина 1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина 6 (ИЛ-6) и тумор некротизирующего фактора (ТНФ- α) в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием реагентов ProCon («Протеиновый контур», Санкт-Петербург, Россия).

В крови также определяли изменения спектра фракций плазменных липопротеидов (ЛП) с помощью набора «НОВОГЛЮК-КМ» — ЗАО «Вектор-Бест» .

В качестве контроля использовали интактных животных.

Статистический анализ результатов был произведен с помощью пакетов программ Statistica 6.0, программного обеспечения MS Excel XP. 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 исследований и их обсуждение. Учитывая накопление лейкоцитов и макрофагов в миокарде в процессе развития МИМ, следовало в первую очередь определить уровень биоцидной активности лейкоцитов. Исследования показали, что кислород-зависимая биоцидность лейкоцитов резко возрастает уже с первых суток введения адреналина и продолжает увеличиваться вплоть до окончания эксперимента (14-е сутки). Это подтверждено как результатами НСТ-теста, так и показателями изменения ХМЛ-активности крови (табл. 1).

Таблица 1

Средние показатели спонтанного НСТ-теста (в %) и ХМЛ-активности лейкоцитов крыс с гормональными моделями стресса (МИМ)

Условия опытов	Контроль	МИМ 1-е сутки	МИМ 7-е сутки	МИМ 14-е сутки
сНСТ	$5,3 \pm 0,33$	$16,8 \pm 3,08^*$	$18,8 \pm 1,49^*$	$12,4 \pm 1,13$
I _{max} (имп/100 ф/мин)	$4,8 \pm 0,06$	$7,1 \pm 0,09^*$	$8,4 \pm 0,10^*$	$12,0 \pm 0,11^*$
T _{max} (мин)	$5,3 \pm 0,37$	$9,2 \pm 0,75^*$	$10,18 \pm 0,67^*$	$8,8 \pm 0,72^*$

Примечание: I_{max} — количество импульсов на пике ХМЛ-ответа в минуту на 100 нейтрофилов; T_{max} — время достижения максимума (мин); число определений в каждой группе — по 12 животных; * — достоверные различия между показателями у крыс с МИМ и у контрольных животных, $p < 0,05$

Соответственно увеличивалось производство активированных кислородных метаболитов (АКМ). Как известно, гиперкатехоламинемия — один из основных патогенетических факторов развития как стрессорного, так и ишемического повреждения миокарда [5, 9]. При этом одной из основных причин клеточного повреждения считается инициация катехоламинами процессов ПОЛ, обусловленного наработкой АКМ [10].

Результаты исследования интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и системы антиоксидантной защиты (АОЗ) (табл. 2) показали, что у животных с МИМ уже с первых суток обнаруживалось повышение накопления продуктов ПОЛ: малонового диальдегида (МДА), ДК и дикетонов. Этот процесс нарастал параллельно с увеличением размеров повреждения миокарда. Одновременно на фоне повышенной продукции липоперекисей наблюдалось снижение активности каталазы, СОД, содержания восстановленного глутатиона, которое держалось вплоть до 14-х суток эксперимента (табл. 2).

Таблица 2

Изменение показателей ПОЛ, активности каталазы, концентрации восстановленного глутатиона (GSH) и активности СОД в крови в динамике

развития МИМ ($M \pm m$; $n = 10$)

Условия опытов	МДА (Ммоль/л)	ДК (Ед опт. пл./ мл)	Дикетоны (мг%)	Каталаза (моль/л/мин)	GSH (мг%)	СОД (усл.ед/л)
Контроль	$8,9 \pm 0,36$	$1,2 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,03$	$8,3 \pm 0,32$	$10,6 \pm 0,57$	$4,0 \pm 0,32$
МИМ 1-е сутки	$10,2 \pm 0,32^*$	$1,3 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,04^*$	$5,8 \pm 0,13^*$	$4,3 \pm 0,35^*$	$3,5 \pm 0,30$
МИМ 7-е сутки	$14,3 \pm 0,76^*$	$1,5 \pm 0,05^*$	$0,48 \pm 0,06^*$	$10,2 \pm 0,21^*$	$7,1 \pm 0,33^*$	$2,9 \pm 0,15^*$
МИМ 14-е сутки	$14,9 \pm 0,54^*$	$1,7 \pm 0,06^*$	$0,47 \pm 0,05^*$	$6,7 \pm 0,32^*$	$6,5 \pm 0,31^*$	$3,8 \pm 0,17$

Примечание: * — здесь и далее достоверные отличия от соответствующих показателей у интактных животных, $p < 0,05$; n — число животных на каждом сроке наблюдения

В результате этого нарушался естественный баланс между про- и антиоксидантными системами организма, что является причиной деструктивного действия АКМ. При этом основной мишенью поражения являются клеточные мембраны. Кроме того, АКМ, по-видимому, самостоятельно могут являться индукторами коронарораспазма [2, 6, 10, 11]. Замыкается своеобразный порочный круг: повышение концентрации катехоламинов приводит к резкому усилению продукции АКМ, активации процессов ПОЛ, которые, в свою очередь, могут индуцировать коронарораспasm, истощение антиоксидантных факторов, что еще более усугубляет ишемию сердечной мышцы, в конечном итоге опять же приводя к усилению свободнорадикальных процессов в миокарде. Таким образом, активация эндогенных механизмов генерации АКМ приводит к напряжению АОЗ и развитию так называемого окислительного стресса, который является важным звеном патогенеза повреждения миокарда [3, 10, 12].

Как известно, лейкоциты и макрофаги, накапливающиеся в миокарде при его повреждении, являются основным источником таких воспалительных цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-6 и ТНФ- α [4]. ИЛ и особенно ТНФ- α вызывают резкие сосудистые расстройства в зоне воспаления [11]. Это связано с тем, что нейтрофилы и макрофаги не только образуют цитокины, но и сами же подвергаются их действию, а именно активируются и начинают вести себя еще более агрессивно по отношению к эндотелию сосудов.

Концентрация провоспалительных цитокинов в крови отражает тяжесть течения ИМ. К тому же гипоксия, сопровождающая ИМ, усиливает базальную и липополисахарид-(ЛПС)-индуцированную экспрессию ТНФ-рецепторов в лейкоцитах. Отсюда, целесообразно определение концентрации указанных цитокинов в динамике течения МИМ у экспериментальных животных.

Результаты исследования показали, что содержание ИЛ-1 β постепенно нарастало параллельно с увеличением деструктивных нарушений в миокарде у крыс с МИМ. На 3-и сутки концентрация ИЛ-1 β была выше, чем в контроле, почти на 40 % ($p < 0,01$), на 14-е сутки — на 85 % ($p < 0,01$) (табл. 3). Концентрация ТНФ- α в крови у этих животных также нарастала в соответствии с динамикой биоцидности нейтрофилов по мере развития изменений в миокарде. Так, в 1-е сутки МИМ содержание цитокина возрастало на 33 %, на 3-и сутки — почти вдвое. На 14-е сутки уровень ТНФ- α был уже в 2,3 раза выше, чем в контроле. Выработка ИЛ-6 начинает возрастать гораздо позже — на 3-и сутки МИМ. Так, на этом сроке содержание ИЛ-6 превышало контрольный уровень почти в 3 раза, на 14-й день — в 5,5 раз.

Изменения содержания цитокинов в сыворотке крови у крыс в динамике развития МИМ

Условия опытов	Контроль (10)	МИМ 1-е сутки (10)	МИМ 7-е сутки (10)	МИМ 14-е сутки (10)
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*
ТНФ- α (пкг/мл)	5,5 $\pm$ 0,03	7,3 $\pm$ 1,09*	10,7 $\pm$ 1,11*	12,6 $\pm$ 1,23*

Примечание: * — обозначены величины, достоверно отличающиеся от контроля, $p < 0,01$; в скобках указано число экспериментальных животных

Эти данные свидетельствуют о том, что у крыс с МИМ воспалительные изменения сохраняются до конца эксперимента. Метаболическая перестройка в организме крыс с МИМ в плазме крови оценивалась по изменению спектра плазменных ЛП (табл. 4).

Таблица 4

Изменения спектра плазменных ЛП у крыс на 7-е сутки развития МИМ

Группы животных	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП2	ЛПВП3
Контроль (12)	6,9 $\pm$ 0,50	13,4 $\pm$ 1,04	40,2 $\pm$ 1,81	39,4 $\pm$ 1,72
МИМ 7-е сутки (10)	13,6 $\pm$ 0,80*	14,0 $\pm$ 1,31	30,4 $\pm$ 2,23*	46,7 $\pm$ 2,30*

Примечание: относительное содержание фракций плазменных ЛП выражено в процентах от общего количества, принятого за 100 %; в скобках указано число экспериментальных животных; * — достоверные отличия от показателей у контрольных крыс, $p < 0,05$

Результаты экспериментального исследования показали, что некоронарогенное повреждение миокарда у крыс сопровождалась целым рядом метаболических изменений, среди которых особо следует отметить значительные изменения спектра плазменных ЛП: относительное содержание фракций плазменных липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) под влиянием адреналина увеличивалось в 1,5–2 раза. Что касается липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), выявлено перераспределение в сторону снижения ЛПВП2 и повышения ЛПВП3 у животных под влиянием длительного введения адреналина. Относительное уменьшение ЛПВП2 и увеличение ЛПВП3 может быть результатом нарушения другого этапа трансформации подклассов ЛПВП, который заключается в следующем: ЛПВП2 взаимодействуют с ремнантами хиломикронов (ХМ), затем обогащенные триглицеридами ЛПВП2 подвергаются в капиллярах печени атаке со стороны печеночной триглицеридлипазы с расщеплением триглицеридов, освобождением эфиров холестерина и превращением ЛПВП2 в ЛПВП3.

Известно, что ЛПВП в базальных условиях являются противовоспалительным фактором, способным разрушать окисленные липиды, генерирующие воспалительный ответ. Однако во время острого воспаления, наблюдавшегося при метаболическом повреждении миокарда, ЛП изменяются и сами становятся провоспалительными. Такая «хамелеоно-подобная» природа ЛПВП зависит от их сложной композиции. Эти данные демонстрируют ключевую роль ЛПВП в модуляции воспаления и его осложнения в виде атерогенеза и дальнейшего развития некротических и некробиотических процессов в миокарде.

Обнаруженный дисбаланс между интенсивностью ПОЛ и активностью АОЗ системы позволяет рекомендовать как можно более раннее и более широкое применение антиоксидантов у больных острым ИМ. В целях улучшения диагностики воспалительных изменений, сопровождающих повреждение миокарда, рекомендуется у больных ИМ любого генеза исследовать в крови содержание провоспалительных цитокинов и активности маркерных лизосомальных ферментов, что позволит более точно определять стадию развития повреждения в миокарде и начало периода восстановления.

Полученные в результате исследований данные позволят дать рекомендации для ранней диагностики и предупреждения поражений сердца при обнаружении гормонально-метаболических нарушений.

Выводы

1. Длительное введение адреналина экспериментальным животным вызывает активацию кислород-зависимой биоцидности нейтрофилов и усиливает интенсивность ПОЛ. В свою очередь, нарушение баланса между процессами ПОЛ и активностью АОЗ вызывает повреждение миокарда.
2. У экспериментальных животных с некоронарогенным повреждением миокарда повышенная активация нейтрофилов сопровождается увеличением выделения провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ТНФ- α .
3. Длительное введение адреналина, имитирующее гиперкатехоламинемия, сопровождается увеличением в плазме крови ЛПОНП и перестройкой спектра плазменных ЛП в сторону снижения ЛПВП2 и повышения ЛПВП3.

Список литературы

1. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов / Под ред. Д. Н. Маянского. — Новосибирск, 2005. — Т. II. — С. 5-24.
2. Зенков Н. К. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. — М. : МАИК «НАУКА/ИНТЕРПЕРИОДИКА», 2001. — 343 с.
3. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. — Минск : Изд-во «Беларусь», 2000. — Т. 2. — 463 с.
4. Маянский Д. Н. Лекции по клинической патологии / Д. Н. Маянский. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 249 с.
5. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф. З. Меерсон. — М. : Медицина, 2009. — 272 с.
6. Ольбинская Л. И. Коронарная и миокардиальная недостаточность / Л. И. Ольбинская, П. Ф. Литвицкий. — 2 изд. — М. : Медицина, 2011. — С. 272.
7. Пигаревский В. Е. Новое в клинико-морфологической оценке функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов / В. Е. Пигаревский // Клин. морфология нейтрофильных гранулоцитов. — Л., 2008. — С. 3-11.
8. Соколов Е. И. Эмоции, гормоны и атеросклероз / Е. И. Соколов. — М. : «Наука», 2006. — 294 с.
9. Polymorphonuclear leucocytes as potential source of free radicals in the ischaemic-reperfused myocardium / D. Bagchi, D. K. Das, R. M. Engelman [et al.] // Eur. Heart J. — 2009. — Vol. 11. — P. 800-813.
10. Control of motility, exocytosis and the respiratory burst in human neutrophils / M. Baggiolini, P. Kheren, D. A. Deranleau [et al.] // Biochem. Soc. Trans. — 2001. — Vol. 19 — P. 56-59.
11. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation / B. J. Van Lenten,

M. Navab, D. Shih [et al.] // Trends Cardiovasc Med. — 2001. — Vol. 1, N 3-4. — P. 155-161.

MANIFESTATIONS OF INFLAMMATORY PROCESSES AT RATS WITH EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

[*L. D. Khidirova*](#)

SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk c.)

The objective of research is to study features of inflammatory reaction at Vistar rats with non-coronarogenic metabolic myocardial infarction (MMI). *Research methods:* electrocardiographic and histologic verification MMI. Determination of biocidal activity of neutrophils of blood, activity of antioxidant protection, accumulation of products of lipids peroxidation, concentration of pro-inflammatory cytokines, changes of a range of plasma lipoproteids. Results of research. Significant increase in biocidal activity of neutrophils, violation of balance between indicators of pro- and antioxidant systems was found in rats with MMI, there was a reorganization of lipoprotein range of plasma towards increase of pro-inflammatory lipoprotein, allocation of pro-inflammatory cytokines increased: TNF- α , interleukin of IL-1 β and IL-6 in blood serum.

Keywords: non-coronarogenic myocardial infarction, biocidal features of leukocytes, PO and AOP, cytokines, plasma lipoproteids.

About authors:

Khidirova Lyudmila Daudovna — the candidate of medical sciences, the assistant to department of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine of at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: h_ludmila73@mail.ru

List of the Literature:

1. Diagnostic value leukocytic of tests / Under the editorship of D. N. Mayansky. — Novosibirsk, 2005. — V. II. — P. 5-24.
2. Zenkov N. K. Oxidizing stress. Biochemical and pathophysiological aspects / N. K. Zenkov, V. Z. Lankin, E. B. Menshchikova. — M.: MAIK «SCIENCE/INTERPERIODIKA», 2001. — 343 P.
3. Kamyshnikov V. S. Reference book on cliniko-biochemical laboratory diagnostics / V. S. Kamyshnikov. — Minsk: Publishing house «Belarus», 2000. — V. 2. — 463 P.
4. Mayansky D. N. Lectures on clinical pathology / D. N. Mayansky. — M.: GEOTAR-media, 2008. — 249 P.
5. Meerson F. Z. Pathogenesis and prevention stress and ischemic injuries of heart / F. Z. Meerson. — M.: Medicine, 2009. — 272 P.
6. Olbinskaya L. I. Coronary and miokardialn insufficiency / L. I. Olbinskaya, P.F. Litvitsky. — 2 iss. — M.: Medicine, 2011. — P. 272.
7. Pigarevsky V. E. New in a clinical morphological assessment of functional state of neutrophilic granulocytes / V. E. Pigarevsky // Clin. morphology neutrophilic

- granulocytes. — L., 2008. — P. 3-11.
8. Sokolov E. I. Emotions, hormones and atherosclerosis / E. I. Sokolov. — M.: «Science», 2006. — 294 P.
 9. Polymorphonuclear leucocytes as potential source of free radicals in the ischaemic-reperfused myocardium / D. Bagchi, D. K. Das, R. M. Engelman [et al.] // Eur. Heart J. — 2009. — Vol. 11. — P. 800-813.
 10. Control of motility, exocytosis and the respiratory burst in human neutrophils / M. Baggiolini, P. Kheren, D. A. Deranleau [et al.] // Biochem. Soc. Trans. — 2001. — Vol. 19 — P. 56-59.
 11. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation / B. J. Van Lenten, M. Navab, D. Shih [et al.] // Trends Cardiovasc Med. — 2001. — Vol. 1, N 3-4. — P. 155-161.