

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Л.Д.Хидирова^{1*}, Н. Н. Маянская²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет.

630091, Новосибирск, Красный проспект, 52

² Казанская государственная медицинская академия. 420012, Казань, ул. Муштары, 11

Воспалительные реакции при повреждении миокарда в эксперименте

Л.Д. Хидирова^{1*}, Н. Н. Маянская²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет. 630091, Новосибирск, Красный проспект, 52

² Казанская государственная медицинская академия. 420012, Казань, ул. Муштары, 11

Цель. Изучить роль гормонально-метаболических изменений, характерных для инфаркта миокарда, в развитии воспалительных реакций при некоронарогенном повреждении миокарда в эксперименте.

Материал и методы. В исследовании использовали 80 крыс-самцов Вистар массой 180–220 г. Метаболический инфаркт миокарда у животных вызывали подкожным введением однократно или в течение недели ежедневно раствора адреналина intactным крысам или крысам с аллоксановым диабетом. Инфаркт миокарда подтверждали с помощью анализа данных ЭКГ, а также с помощью гистологического контроля. Для определения кислород-зависимой функциональной активности нейтрофилов и их биоцидного резерва использовали спонтанный и индуцированный зимозаном тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест). Определение содержания катионных белков в нейтрофилах периферической крови проводили с помощью лизосомально-катионного теста.

Результаты. Выявлено повышение кислород-зависимой биоцидной активности нейтрофилов с одновременным снижением резервов биоцидности. Показатели индуцированного зимозаном НСТ-теста повышались по мере нарастания изменений гормонального фона гораздо медленнее: аллоксан увеличивал их всего на 10%, однократное введение адреналина — на 35%, длительное введение адреналина на фоне аллоксана — на 54%. В то же время отмечено, что кислород-независимая активность нейтрофилов, определяемая по содержанию в них катионных белков, значительно снижается. Содержание в крови провоспалительных цитокинов нарастало по мере развития изменений в миокарде: тумор-некротизирующего фактора- α с $5,5 \pm 0,03$ до $12,6 \pm 1,23$ пкг/мл и интерлейкина- 1β с $6,0 \pm 0,18$ до $11,1 \pm 0,78$ пкг/мл.

Заключение. Экспериментальное моделирование гормональной перестройки, характерной для инфаркта миокарда, выявило связь воспалительных реакций, сопровождающих повреждение миокарда, с повышением выработки катехоламинов.

Ключевые слова: метаболический инфаркт миокарда, воспалительные реакции, биоцидность нейтрофилов.

РФК 2012;8(5):717–720

Inflammatory reactions in experimental myocardial damage

L.D. Khidirova^{1*}, N. N. Mayanskaya²

¹ Novosibirsk State Medical University. Krasny prospect 52, Novosibirsk, 630091 Russia

² Kazan State Medical Academy. Mushtari ul. 11, Kazan, 420012 Russia

Aim. To study the role of hormonal and metabolic changes specific to myocardial infarction in the development of inflammatory reactions in the experimental non-coronarygenic myocardial damage.

Material and methods. Wistar male rats weighing 180–220 g ($n=80$) were used in the study. Metabolic myocardial infarction in intact rats and rats with alloxan diabetes was induced by epinephrine injected subcutaneously as single dose or daily (7 days). Myocardial infarction was verified by ECG analysis, and by histological control. Nitroblue tetrazolium test (NBT-test) both spontaneous and zymosan induced NBT-test was used to determine the oxygen-dependent functional activity of neutrophils and their biocidal reserve. Determination of cationic proteins in neutrophils of peripheral blood was performed using lysosomal-cationic test.

Results. Increase in oxygen-dependent neutrophil biocidal activity was found as well as reduction in biocidal reserves. Indicators of zymosan induced NBT-test raised according to aggravation of hormonal changes much slower: alloxan increased them by 10% only, epinephrine single dose — by 35%, long-term epinephrine administration simultaneously with alloxan — by 54%. At the same time oxygen-independent neutrophil activity determined by intra-neutrophil cationic proteins level was significantly reduced. Blood levels of pro-inflammatory cytokines raised according to progression of the changes in myocardium: tumor necrosis factor- α (from 5.5 ± 0.03 to 12.6 ± 1.23 pg/ml) and interleukin- 1β (from 6.0 ± 0.18 to 11.1 ± 0.78 pg/ml).

Conclusion. Experimental model of hormonal changes specific to myocardial infarction detected a relationship between inflammatory reactions accompanying myocardial damage and increased catecholamine production.

Key words: metabolic myocardial infarction, inflammatory reactions, neutrophil biocide.

Rational Pharmacother. Card. 2012;8(5):717–720

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): h_ludmila73@mail.ru

Воспаление как сложная аварийная реакция организма на повреждение лежит в основе большинства заболеваний человека, включая коронарогенные и некоронарогенные повреждения миокарда [1]. Известно, что течение, развитие 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 [2]. Любая патология сопровождается изменением гормонального фона, которое заключается в повышении продукции глюкокортикоидов, адрена-

лина, тиреоидных гормонов и снижением продукции инсулина [3].

Учитывая, что при стрессе важнейшее значение имеет отношение между контринсулярными гормонами (11-оксикортикостероиды, 11-ОКС) и инсулином [4], были проведены предварительные исследования такого соотношения у крыс с экспериментальным окклюзионным инфарктом миокарда. При этом было обнаружено, что содержание 11-ОКС в первые сутки после операции в 5,6 раз превышало таковое инсулина, на третьи сутки — в 9 раз, и на 14 сутки — в 2,4 раза. Указанная динамика гормональных изменений подтверждает, что крысы с инфарктом миокарда находятся в состоянии тяжелого стресса.

Целью настоящего исследования было выявление роли гормонально-метаболических изменений, характерных для инфаркта миокарда, в развитии воспа-

Сведения об авторах:

Хидирова Людмила Даудовна — к.м.н., преподаватель

кафедры медицинской химии НГМУ

Маянская Наиля Назибовна — д.м.н., профессор кафедры

биологической химии КГМА

лительных реакций при некоронарогенном повреждении миокарда в эксперименте.

Материал и методы исследования

В исследованиях использовали 80 крыс-самцов линии Вистар массой 180–220 г. Метаболический инфаркт миокарда (МИМ) у животных вызывали подкожным введением однократно или в течение недели ежедневно раствора адреналина (0,2 мл 0,1% раствора) интактным крысам или крысам с аллоксановым диабетом (100–120 мг аллоксана на крысу подкожно). Инфаркт миокарда подтверждали с помощью анализа данных ЭКГ, а также с помощью гистологического контроля. От экспериментальных животных брали для исследования цельную кровь, сыворотку крови и ткань сердца. Для определения кислород-зависимой функциональной активности нейтрофилов и их биоцидного резерва использовали тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) - спонтанный (сНСТ) и индуцированный зимозаном (зНСТ-тест). В качестве стимулятора использовали 0,1% суспензию зимозана («Sigma», США). Результат выражался в процентах диформазан-положительных нейтрофилов (ДПН) на 100 нейтрофилов, либо в индексах стимуляции (ИС). Последний рассчитывался отношением процента индуцированных ДПН к проценту ДПН в сНСТ-тест [5].

Определение содержания катионных белков в нейтрофилах периферической крови проводили с помощью лизосомально-катионного (ЛКТ) теста цитохимическим методом [6].

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

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась при помощи статистического пакета Statistica 7.0 (Statsoft Inc.). Для каждого признака определялось среднеарифметическое значение (M) и его ошибки (m), минимальное и максимальное значение и среднеквадратичное отклонение в вариационных рядах. Оценку значимости различий между показателями вычисляли по критерию t -Стьюдента. При несоответствии нормальности распределения по тесту Колмогорова-Смирнова использовался непараметрический анализ по критерию Манна-Уитни. Для определения связи между варьирующими признаками был проведен корреляционный анализ, при помощи которого изучалась частота и степень сопряженности между изучаемыми признаками. Коэффициенты корреляции считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для верификации изменений, которые могли наблюдаться у животных, в этом эксперименте был проведен электрокардиографический и гистологический контроль.

Электрокардиографический контроль выявил следующие изменения у экспериментальных животных. Через 24 ч после введения адреналина по ЭКГ наблюдалось некоторое ускорение тахикардии до 240 уд в мин, изменений сегментов не выявлялось. Через неделю после ежедневного введения адреналина или адреналина на фоне аллоксана на ЭКГ отмечалась депрессия сегмента ST и выявлялся непостоянный, отрицательный зубец T, что, по-видимому, свидетельствовало о наличии диффузного или мелкоочагового характера поражения миокарда, который свидетельствовал о развитии МИМ.

Гистологический контроль срезов из сердечной мышцы крыс с МИМ показал, что морфологические изменения через сутки после введения адреналина выражались некоторым набуханием кардиомиоцитов, появлением венозной гиперемии, усилением агрегации тромбоцитов в коронарных сосудах. Через неделю после начала введения адреналина наблюдались выраженные расстройства гемодинамики за счет образования агрегатов форменных элементов крови в артериолах. Процесс носил диффузный характер. Кроме того, было выявлено поражение кардиомиоцитов, которое носило островковый характер, отмечалась частичная потеря поперечно-полосатой исчерченности. Полиморфноклеточная инфильтрация с преобладанием лейкоцитов концентрировалась вдоль границ островков измененных кардиомиоцитов.

У крыс с МИМ кислород-зависимую функциональную активность нейтрофилов исследовали с помощью НСТ-теста (табл. 1). Результаты исследования показали, что уже одно только снижение продукции инсулина с помощью аллоксана увеличивало величину сНСТ-теста почти вдвое. Однократное введение адреналина повышало показатели сНСТ-теста уже более чем в 3 раза. Длительное повышение катехоламинов на фоне сниженной продукции инсулина увеличивало показатели сНСТ-теста в 3,5 раза. 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%.

Наиболее информативным в отношении нейтрофильных резервов биоцидности является анализ динамики индекса стимуляции, который рассчитывается отношением показателей зНСТ-тест/сНСТ-тест.

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

Условия опытов	Контроль (n=12)	Аллоксан (n=12)	Адреналин (n=12)	Адреналин + Аллоксан (n=12)
сНСТ, %	5,3±0,33	10,2±1,11*	16,8±3,08*	18,8±1,49*
эНСТ, %	16,2±1,11	17,9±1,43	21,9±2,89*	24,9±1,95*
ИС, %	3,05±0,07	1,75±0,06*	1,3±0,03*	1,3±0,03*

*p<0,05 по сравнению с контролем

Таблица 2. Изменение содержания лизосомальных катионных белков в нейтрофилах крыс под влиянием аллоксана и адреналина (7-е сутки эксперимента)

Показатель	Контроль (n=11)	Аллоксан (n=10)	Адреналин + Аллоксан (n=10)
СЦК, усл.ед.	0,8±0,04	0,9±0,04	0,6±0,04*
ВАК, на 100 нейтрофилов	2,1±0,06	6,7±0,12*	1,8±0,04*
САК, на 100 нейтрофилов	44,6±3,17	52,2±2,30	32,4±2,15*
НАК, на 100 нейтрофилов	53,4±3,28	40,4±3,03*	65,8±4,28

*p<0,05 по сравнению с контролем. СЦК – средний цитохимический коэффициент, НАК – низкоактивные клетки, САК – среднеактивные клетки, ВАК – высокоактивные клетки

Таблица 3. Изменения содержания цитокинов в сыворотке крови у крыс в динамике развития МИМ

Условия опытов	Контроль (n=7)	МИМ 1 сут (n=7)	МИМ 3 сут (n=7)	МИМ 14 сут (n=7)
ТНФ α пкг/мл	5,5±0,03	7,3±1,09*	10,7±1,11*	12,6±1,23*
Ил-1 β (пкг/мл)	6,0±0,18	7,4±0,67	8,3±0,64*	11,1±0,78*
Ил-6 (пкг/мл)	2,0±0,08	2,8±0,08	5,8±0,13*	11,0±0,38*

*p<0,05 по сравнению с контролем

Структурно-функциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов изучалось по кислород-независимой биоцидности с помощью цитохимического ЛКТ-теста. Результаты этого исследования представлены в табл. 2.

У крыс с МИМ в соответствии с динамикой биоцидности нейтрофилов содержание в крови провоспалительных цитокинов ТНФ α и интерлейкина-1 β с первых суток эксперимента нарастало по мере развития изменений в миокарде (табл. 3). Выработка ИЛ-6 начинала возрастать гораздо позже – на третьи сутки МИМ.

Обсуждение

Повышенное содержание катехоламинов в мышце сердца обуславливает чрезмерное увеличение потребления им кислорода и субстратов метаболизма, намного превосходящего возможности их доставки с кровью даже по максимально расширенным коронарным артериям [6, 7]. Таким образом, можно сделать заключение, что с помощью гормональных перестроек, имитирующих стрессорные изменения, воспроизводятся изменения, характерные для метаболического инфаркта миокарда.

Гормональные перестройки в организме экспериментальных животных ведут к значительному снижению биоцидных резервов в нейтрофилах крови. На-

более 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.

Как видно из таблицы 2, у крыс с МИМ отмечалось резкое снижение (на 33%) среднего цитохимического коэффициента уже на третьи сутки после окончания введения адреналина на фоне снижения продукции инсулина под влиянием аллоксана. Снижение показателей среднего цитохимического коэффициента сопровождалось уменьшением высоко- и среднеактивных клеток с параллельным увеличением низкоактивных клеток, что свидетельствует о дегрануляции нейтрофилов, подтверждающейся косвенно, и повышением активности лизосомальных ферментов в крови, источником которых могут быть, помимо поврежденной сердечной мышцы, также клетки крови, в первую очередь – клетки-фагоциты: нейтрофилы и моноциты.

Заключение

Экспериментальное моделирование гормональной перестройки, характерной для инфаркта миокарда, выявило связь воспалительных реакций, сопровождающих повреждение миокарда, с повышением вы-

работки катехоламинов в организме животных. Определенное значение в этом имеют также сопутствующие метаболические изменения. Все указанные некротические и воспалительные процессы были выражены значительно острее, если у крыс предварительно снижали уровень инсулина введением им небольших доз аллоксана.

Конфликт интересов. Авторы не сообщили об отсутствии потенциального конфликта интересов по данной статье.

Литература

1. Kamyshnikov V.S. Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics. Minsk: Belarus'; 2000. Russian (Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: Беларусь; 2000).
2. Klimov A.N., Nikul'cheva N.G. Lipids, lipoproteins and atherosclerosis. St. Petersburg: Piter; 1995. Russian (Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. СПб: Питер; 1995).
3. Panin L.E., Mayanskaya N.N. Lysosomes: role in adaptation and recovery. Novosibirsk: Nauka; 1987. Russian (Панин Л.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. Новосибирск: Наука; 1987).
4. Mayanskiy D.N. Lectures on clinical pathology. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. Russian (Маянский Д.Н. Лекции по клинической патологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008).
5. Meerson F.Z. The pathogenesis and prevention of stress and ischemic heart damage. Moscow: Meditsina; 1984. Russian (Мерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина; 1984).
6. Pigarevskiy V.E. New in clinical and morphological assessment of the functional state of neutrophil granulocytes. Clinical morphology of neutrophilic granulocytes. Leningrad: Nauka; 1988. Russian (Пигаревский В.Е. Новое в клинико-морфологической оценке функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов. Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л.: Наука; 1988).
7. Bagchi D., Das D.K., Engelman R.M. et al. Polymorphonuclear leucocytes as potential source of free radicals in the ischaemic-reperfused myocardium. Eur Heart J 1990; 11: 800–813.

Поступила: 06.06.2012
Принята в печать: 17.07.2012