

Особенности воспалительной реакции при экспериментальном некоронарогенном метаболическом инфаркте миокарда

Л.Д. Хидирова¹, Л.В. Вохминцева¹, Н.Н. Маянская¹, С.Д. Маянская^{2*}, В.И. Шарапов¹

¹ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет. Новосибирск, Россия;

²Казанская государственная медицинская академия. Казань, Россия

Inflammatory reaction in experimental non-coronary metabolic myocardial infarction

L.D. Khidirova¹, L.V. Vokhmintseva¹, N.N. Mayanskaya¹, S.D. Mayanskaya^{2*}, V.I. Sharapov¹

¹Novosibirsk State Medical University. Novosibirsk, Russia; ²Kazan State Medical Academy. Kazan, Russia

Цель. Изучить особенности воспалительной реакции у крыс Вистар с некоронарогенным метаболическим инфарктом миокарда (МИМ).

Материал и методы. Электрокардиографическая и гистологическая верификация МИМ. Определение биоцидной активности нейтрофилов крови, активности антиокислительной защиты, накопления продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), концентрации провоспалительных цитокинов, изменения спектра плазменных липопротеидов (ЛП).

Результаты. У крыс с МИМ обнаружено значительное увеличение биоцидной активности нейтрофилов, нарушение баланса между показателями про- и антиокислительной систем, происходила перестройка липопротеидного спектра плазмы в сторону повышения провоспалительных ЛП, повышалось выделение провоспалительных цитокинов.

Заключение. Обнаруженные изменения воспалительной реакции определяют особенности течения МИМ.

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

Aim. To study inflammatory reaction specifics in Vistar rats with non-coronary metabolic myocardial infarction (MMI).

Material and methods. Electrocardiographical and histological verification of MMI. Measurement of neutrophil biocide activity, antioxidant system activity, the levels of lipid peroxidation (LP) products and pro-inflammatory cytokines, and plasma lipoprotein (LP) profile assessment.

Results. In MMI rats, neutrophil biocide activity was increased, the balance between pro- and antioxidant systems was disturbed, plasma LP profile was affected, with increased pro-inflammatory LP levels, and pro-inflammatory cytokine concentrations were elevated.

Conclusion. The observed inflammatory reaction specifics determined the clinical course of MMI.

Key words: Non-coronary myocardial infarction, leukocyte biocide activity, cytokines, plasma lipoproteins.

Воспаление — сложная аварийная реакция организма на повреждение, лежит в основе большинства заболеваний человека, включая коронарогенные и некоронарогенные повреждения миокарда [6,7]. Рост темпа жизни, стрессовых ситуаций в современном обществе, сопровождающийся нейроэндокринными нарушениями обуславливает все боль-

шую распространенность не только коронарогенного, но и некоронарогенного инфаркта миокарда (ИМ) [7]. Показано, что метаболические некрозы сердечной мышцы у больных сахарным диабетом (СД) встречаются в 5 раз чаще, чем у больных, нестрадающих этим заболеванием [12]. Разнообразие течения острого ИМ, явный волнообразный харак-

© Коллектив авторов, 2009
e-mail: nmayamsk@mail.ru

[¹Хидирова Л.Д. — ассистент кафедры биохимии, ¹Вохминцева Л.В. — доцент кафедры биохимии, ¹Маянская Н.Н. — профессор кафедры биохимии, ²Маянская С.Д. (*контактное лицо) — зав. кафедрой кардиологии и ангиологии, ¹Шарапов В.И. — зав. кафедрой биохимии].

тер болезни, результаты клинических исследований свидетельствуют о важной, может быть ведущей, роли воспаления в патогенезе заболеваний [3]. 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 антиокислительные системы [6,8].

Патогенетические механизмы развития некоронарогенного повреждения миокарда остаются недостаточно изученными. Это определяет необходимость выяснения причин и условий развития воспалительных и деструктивно-дистрофических нарушений на клеточном уровне.

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

Материал и методы

В экспериментальных исследованиях использовали 116 крыс-самцов Вистар, полученных из вивария НГМУ, массой 180–220 г. 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, анализируя данные электрокардиографии (ЭКГ), а также с помощью гистологического контроля. Изменения на ЭКГ появлялись через 24 ч после первой инъекции адреналина. Через неделю после ежедневного введения адреналина на ЭКГ отмечалась депрессия сегмента ST, и появлялся отрицательный зубец T. Гистологическое исследование показало постепенно нарастающее развитие некротических и некробиотических процессов в миокарде с пиком обнаруженных нарушений на 7 сут. от начала эксперимента. В миокарде экспериментальных животных находили накопления лейкоцитов, группировавшихся вокруг очажков повреждения миокардиоцитов. Среди лейкоцитов преобладали нейтрофильные гранулоциты.

Животных забивали под эфирным наркозом путем декапитации на 1, 3, 7 и 14 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 биоцидного резерва использовали спонтанный тест с нитросиним тетразолиевым (сНСТ). Результат выражался в процентах диформазан положительных нейтрофилов (ДПН) на 100 нейтрофилов. В крови измеряли интенсивность хемилюминесценции (ХМЛ) нейтрофилов на биохемилюнометре “СКИФ-0301 (СКТБ “Наука”, Красноярск, Россия) с люминалом (5-амино-2,3-дигидрофталазиндион-1,4) в качестве люминофора [1].

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации в крови малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и диетонатов. В гемолизате эритроцитов определяли активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона, в сыворотке крови измеряли активность супероксиддисмутазы (СОД) [4].

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

В крови также определяли изменения спектра 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 и 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 сут. введения адреналина и продолжает увеличиваться вплоть до окончания эксперимента (14 сут.). Это

Таблица 1

Средние показатели сНСТ (в %) и ХМЛ активности лейкоцитов крыс с гормональными моделями стресса (МИМ) (n=12)

Условия опытов	Контроль	МИМ 1 сут.	МИМ 7 сут.	МИМ 14 сут.
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*
Tmax (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 мин на 100 нейтрофилов; Tmax – 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.

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±0,36	1,2±0,07	0,25±0,03	8,3±0,32	10,6±0,57	4,0±0,32
МИМ 1 сут.	10,2±0,32*	1,3±0,06	0,37±0,04*	5,8±0,13*	4,3±0,35*	3,5±0,30
МИМ 7 сут.	14,3±0,76*	1,5±0,05*	0,48±0,06*	10,2±0,21*	7,1±0,33*	2,9±0,15*
МИМ 14 сут.	14,9±0,54*	1,7±0,06*	0,47±0,05*	6,7±0,32*	6,5±0,31*	3,8±0,17

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

подтверждено как результатами НСТ-теста, так и показателями изменения ХМЛ-активности крови (таблица 1). Соответственно увеличивалось производство активированных кислородных метаболитов (АКМ). Как известно, гиперкатехоламинемия – один из основных патогенетических факторов развития как стрессорного, так и ишемического повреждения миокарда [6,9,10]. При этом одной из основных причин клеточного повреждения считается инициация катехоламинами процессов ПОЛ, обусловленного наработкой АКМ [11].

Результаты исследования интенсивности ПОЛ и антиокислительной защиты (АОЗ) (таблица 2) показали, что у животных с МИМ уже с первых суток обнаруживались повышение накопления продуктов ПОЛ: 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 сут. эксперимента (таблица 2).

В результате этого нарушался естественный баланс между про- и антиокислительными системами организма, что является причиной деструктивного действия АКМ. При этом основной мишенью поражения являются клеточные мембраны.

Кроме того, АКМ, по-видимому, самостоятельно могут служить индукторами коронарораспазма [2,10,11]. Замыкается своеобразный порочный круг: повышение концентрации катехоламинов приводит к резкому усилению продукции АКМ, активации процессов ПОЛ, которые, в свою очередь, могут индуцировать коронарораспазм, истощение факторов АОЗ, что еще более усугубляет ишемию миокарда, 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 служит важным звеном патогенеза повреждения миокарда [2,3,10,12].

Как известно, лейкоциты и макрофаги, накапливающиеся в миокарде при его повреждении, являются основным источником таких воспалительных цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-6 и TNF- α [3,5,6]. Интерлейкины и, особенно, TNF- α вызывают резкие сосудистые расстройства в зоне воспаления [6]. Это связано с тем, что нейтрофилы и макрофаги не только образуют, но и сами же подвержены 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, усили-

Таблица 3

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

Условия опытов	Контроль ($n=10$)	МИМ 1 сут. ($n=10$)	МИМ 7 сут. ($n=10$)	МИМ 14 сут. ($n=10$)
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*
TNF α (пкг/мл)	5,5±0,03	7,3±1,09*	10,7±1,11*	12,6±1,23*

Примечание: * – обозначены величины, достоверно отличающиеся от контроля, $p < 0,01$; n – число экспериментальных животных.

Таблица 4

Изменения спектра плазменных ЛП у крыс на 7 сут. развития МИМ

Группы животных	ЛОНП	ЛНП	ЛВП2	ЛВП3
Контроль (n=12)	6,9±0,50	13,4±1,04	40,2±1,81	39,4±1,72
МИМ 7-е сутки (n=10)	13,6±0,80*	14,0±1,31	30,4±2,23*	46,7±2,30*

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

вает базальную и липополисахарид — (ЛПС)-индуцированную экспрессию ТНФ- α -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 нарастает параллельно с увеличением деструктивных нарушений в миокарде у крыс с МИМ. На третьи сутки концентрация ИЛ-1 β была выше, чем в контроле на ~ 40% ($p < 0,01$), на 14 сут. — на 85% ($p < 0,01$) (таблица 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 первые сутки МИМ содержание цитокина возрастало на 33%, на третьи сутки — почти вдвое. На 14 сут. уровень ТНФ- α был уже в 2,3 раза выше, чем в контроле. Выработка ИЛ-6 начинает возрастать гораздо позже — на третьи сутки МИМ. На этом сроке содержание ИЛ-6 превышало контрольный уровень почти в 3 раза, на 14 сут. — в 5,5 раз. 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 (таблица 4).

Результаты экспериментального исследования показали, что некоронарогенное повреждение миокарда у крыс сопровождалось целым рядом метаболических изменений, среди которых особо следует отметить значительные изменения спектра плазменных ЛП: относительное содержание липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП) под влиянием адреналина увеличивалось в 1,5-2 раза. Что касается липопротеидов высокой плотности (ЛВП), обнаружено перераспределение в сторону снижения ЛВП2 и повышения ЛВП3 у животных под влиянием длительного введения адреналина. Относительное уменьшение ЛВП2 и увеличение ЛВП3 может быть результатом нарушения другого этапа трансформации подклассов ЛВП, который заключается в следующем: ЛВП2 взаимодействуют с ремнантами хиломикрон, затем обога-

щенные триглицеридами (ТГ) ЛВП2 подвергаются в капиллярах печени атаке со стороны печеночной триглицеридлипазы с расщеплением ТГ, освобождением эфиров холестерина и превращением ЛВП2 в ЛВП3.

Известно, что ЛВП 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 “хамелеоноподобная” природа ЛВП зависит от их сложной композиции. Эти данные демонстрируют ключевую роль ЛВП в модуляции воспаления и его осложнения в виде атерогенеза и дальнейшего развития некротических и некробиотических процессов в миокарде [13].

Полученные в результате исследований данные могут быть использованы в клинической кардиологии, поскольку не только позволяют рекомендовать подобные исследования для ранней диагностики и предупреждения поражений сердца при гормонально-метаболических нарушениях, но также дают патогенетическое обоснование для внесения принципиально новых методов коррекции некоронарогенных повреждений миокарда у больных с эндокринологической патологией.

Выводы

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.

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 .

Длительное введение адреналина, имитирующее гиперкатехоламинемия, сопровождается увеличением в плазме крови ЛОНП и перестройкой спектра плазменных ЛП в сторону снижения ЛВП2 и повышения ЛВП3.

Литература

1. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов. Под ред. Маянского Д.Н. Новосибирск 1995; II: 5-24.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. МАИК "НАУКА/ИНТЕРПЕРИОДИКА" 2001; 343 с.
3. Игитова М.Б., Воробьева Е.В., Осипова И.В., Гольцова Н.П. Роль системного воспаления в развитии кардиоваскулярной и акушерской патологии. Кардиоваск тер профил 2009; 1: 81-7.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: Изд-во "Беларусь" 2000; 2: 463 с.
5. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. Москва: "Мир" 1993; 1: 381 с.
6. Маянский Д.Н. Лекции по клинической патологии. Москва: "ГЭОТАР-Медиа" 2008; 249 с.
7. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. Москва "Медицина" 1984; 272 с.
8. Ольбинская Л.И., Литвицкий П.Ф. Коронарная и миокардиальная недостаточность. Москва "Медицина" 1986; 272 с.
9. Соколов Е.И. Эмоции, гормоны и атеросклероз. Москва "Наука" 1991; 294 с.
10. 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: 800-13.
11. Baggiolini M, Kheren P, Deranleau DA, et al. Control of motility, exocytosis and the respiratory burst in human neutrophils. Biochem Soc Trans 1991; 19: 56-9.
12. Braunwald E. Approach to the patients with heart disease. In the book: Harrison's principles of internal medicine 1994; 939-41.
13. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, et al. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. Trends Cardiovasc Med 2001; 1(3-4): 155-61.

Поступила 30/11-2009