

## ОСОБЕННОСТИ ВОВЛЕЧЕНИЯ КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ГОРМОНАЛЬНО-ОБУСЛОВЛЕННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Наиля Назибовна Маянская<sup>1\*</sup>, Людмила Даудовна Хидирова<sup>2</sup>,  
Светлана Дмитриевна Маянская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет,  
<sup>2</sup>Новосибирский государственный медицинский университет

### Реферат

**Цель.** Изучить особенности изменения эффекторных механизмов воспаления у крыс линии Вистар с некоронарогенным метаболическим инфарктом миокарда.

**Методы.** Воспроизведение метаболического инфаркта миокарда осуществляли введением раствора эпинефрина (адреналина) крысам линии Вистар. Верификацию метаболического инфаркта миокарда проводили при помощи электрокардиографии и гистологического исследования. Определяли бицидную активность нейтрофилов крови с применением теста с нитросиним тетразолием и оценкой хемилюминесценции, регистрировали содержание цитокинов (интерлейкина-1 $\beta$ , -6 и фактора некроза опухоли альфа) в сыворотке крови иммуноферментным методом. Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по концентрации в крови малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и diketонов. В гемолизате эритроцитов определяли активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона, в сыворотке крови измеряли активность супероксиддисмутазы. В качестве контроля использовали интактных животных.

**Результаты.** У крыс с метаболическим инфарктом миокарда кислород-зависимая бицидность лейкоцитов (тест с нитросиним тетразолием и показатели хемилюминесценции) резко возрастала уже с 1-х суток введения эпинефрина и продолжала увеличиваться вплоть до окончания эксперимента (14е сутки). Соответственно увеличивалось образование активных кислородных метаболитов, которые инициировали интенсификацию перекисного окисления липидов. Одновременно происходило нарушение баланса между показателями про- и антиоксидантной систем. В сыворотке крови нарастала концентрация провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли альфа, интерлейкинов-1 $\beta$  и -6.

**Вывод.** Длительное введение эпинефрина экспериментальным животным вызывает повышение бицидной активности нейтрофилов, сопровождающееся увеличением выделения активных кислородных метаболитов, провоспалительных цитокинов, интенсификацией перекисного окисления липидов и снижением компенсации со стороны антиоксидантной защиты, что в совокупности может быть мощным триггером повреждения миокарда.

**Ключевые слова:** некоронарогенный инфаркт миокарда, бицидность лейкоцитов, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, цитокины.

**FEATURES OF CELLULAR AND MOLECULAR INFLAMMATORY MECHANISMS INVOLVEMENT IN HORMONE-MEDIATED MYOCARDIAL EXPERIMENTAL INJURY** N.N. Mayanskaya<sup>1</sup>, L.D. Hidirova<sup>2</sup>, S.D. Mayanskaya<sup>1</sup>. *<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia, <sup>2</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.* **Aim.** To study the features of inflammatory effector mechanisms variation in Wistar rats with metabolic non-coronary myocardial infarction. **Methods.** Metabolic myocardial infarction was reproduced in Wistar rats by adrenalin injection. Metabolic myocardial infarction was verified by electrocardiography and histological examination. Biocidal activity of blood neutrophils was determined by nitro blue tetrazolium test and chemiluminescence, cytokine serum levels (interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha) were determined by ELISA. Lipid peroxidation was assessed by measuring malondialdehyde, diene conjugates and diketones blood concentrations. Catalase activity and reduced glutathione level were determined in erythrocyte hemolysate, serum activity of superoxide dismutase was also measured. Intact animals were examined as a control group. **Results.** In rats with metabolic myocardial infarction, oxygen-dependent leukocyte biocidity (determined by nitro blue tetrazolium test and chemiluminescence) increased dramatically from the first day of the adrenalin administration and continued to increase until the end of the experiment (day 14). Accordingly, the production of active oxygen metabolites, which intensified the lipid peroxidation, was increasing. Simultaneously an imbalance between pro-and antioxidant system parameters was detected. Serum concentration of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6) increased. **Conclusion.** Long-term administration of adrenalin to experimental animals causes an increase in the neutrophils biocidal activity, accompanied by release of reactive oxygen species, pro-inflammatory cytokines, lipid peroxidation intensifying and decreased compensation by antioxidant defense system, which together can be a powerful trigger of myocardial damage. **Keywords:** non-coronary myocardial infarction, leukocytes biocidity, lipid peroxidation, antioxidant protection, cytokines.

Воспаление как аварийная реакция организма на повреждение — основа большинства заболеваний человека, включая коронарогенные и некоронарогенные повреждения миокарда. Известно, что течение, развитие, появление осложнений и исход воспаления определяется активностью основных эффекторных механизмов,

среди которых важное место занимают полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, а также гуморальные факторы воспаления, такие как цитокины, компоненты системы комплемента, лизосомальные ферменты, про- и антиоксидантные системы. Следует также иметь в виду, что на характер воспалительных реакций независимо от их генеза большое влияние оказывают нарушения гормональной регуляции. [4–6].

Средние показатели спонтанного теста с нитросиним тетразолием и хемиллюминесцентной активности лейкоцитов крыс с метаболическим инфарктом миокарда (МИМ)

Условия опыта	Контроль	МИМ, 1-е сутки	МИМ, 7-е сутки	МИМ, 14-е сутки
Тест с нитросиним тетразолием, %	5,3±0,33	16,8±3,08*	18,8±1,49*	12,4±1,13
I <sub>max</sub>	4,8±0,06	7,1 ±0,09*	8,4±0,10*	12,0±0,11*
T <sub>max</sub> , мин	5,3±0,37	9,2±0,75*	10,18±0,67*	8,8±0,72*

Примечание: I<sub>max</sub> – количество импульсов на пике хемиллюминесцентного ответа в минуту на 100 нейтрофилов; T<sub>max</sub> – время достижения максимума; число определений в каждой группе – по 12 животных; \*p < 0,05 по сравнению с контролем.

Рост напряженности людей в современном обществе обуславливает всё большую распространённость не только коронарогенного, но и некоронарогенного инфаркта миокарда [5]. Вместе с тем патогенетические механизмы развития именно некоронарогенного повреждения миокарда остаются недостаточно изученными.

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

В исследовании использовали 48 крыс-самцов линии Вистар с массой тела 180–220 г. Метаболический инфаркт миокарда (МИМ) воспроизводили у животных подкожным ежедневным введением в течение недели раствора эпинефрина (адреналина, 0,2 мл 0,1% раствора на крысу). Инфаркт миокарда подтверждали с помощью анализа данных электрокардиографии, а также гистологического контроля. Изменения на электрокардиограмме появлялись уже через 24 ч после первой инъекции эпинефрина. Через неделю после ежедневного введения эпинефрина на электрокардиограмме была отмечена депрессия сегмента ST, появлялся отрицательный зубец T. Гистологическое исследование выявило постепенно нарастающее развитие некротических и некробиотических процессов в миокарде с пиком нарушений на 7-е сутки от начала эксперимента. Кроме того, в миокарде экспериментальных животных обнаружено накопление лейкоцитов, группировавшихся вокруг очагов повреждения миокардиоцитов. Среди лейкоцитов преобладали нейтрофильные гранулоциты.

Животных забивали под эфирным наркозом путем декапитации на 1-е, 3-е, 7-е и 14-е сутки эксперимента – по 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 использовали спонтанный тест с нитросиним тетразолием. Результат выражался в процентах диформаза-положительных нейтрофилов на 100 нейтрофилов. Кроме того, в крови измеряли интенсивность хемиллюминесценции нейтрофилов на биохемиллюминесцентном счетчике «СКИФ-0301» («Наука», Красноярск) с люминолом (5-амино-2,3-дигидрофталазиндион-1,4) в качестве люминофора [1].

Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по концентрации в крови малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и дикетонов. В гемолизате эритроцитов определяли активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона, в сыворотке крови измеряли активность супероксиддисмутазы [2].

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

В качестве контроля использовали 12 интактных животных.

Изменение показателей перекисного окисления липидов, активности каталазы, концентрации восстановленного глутатиона и активности супероксиддисмутазы (СОД) в крови в динамике развития метаболического инфаркта миокарда (МИМ) (M±m)

Условия опытов	МДА, ммоль/л	ДК, ед. опт. пл./мл	Дикетоны, мг%	Каталаза, моль/л в минуту	Глутатион, 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-е сутки	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-е сутки	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-е сутки	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: \*p < 0,05 по сравнению с контролем; на каждом сроке наблюдения использовано по 12 животных; МДА – малоновый диальдегид; ДК – диеновые конъюгаты.

Изменения концентрации цитокинов в сыворотке крови у крыс в динамике развития метаболического инфаркта миокарда (МИМ)

Показатели	Контроль (n=10)	МИМ, 1-е сутки (n=10)	МИМ, 7-е сутки (n=10)	МИМ, 14-е сутки (n=10)
ИЛ-1 $\beta$ , 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*
ФНО $\alpha$ , пкг/мл	5,5 $\pm$ 0,03	7,3 $\pm$ 1,09*	10,7 $\pm$ 1,11*	12,6 $\pm$ 1,23*

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ИЛ – интерлейкин; ФНО $\alpha$  – фактор некроз опухоли альфа, МИМ – метаболический инфаркт миокарда.

Статистический анализ результатов был проведён с помощью пакетов программ Statistica 6,0, программного обеспечения MS Excel XP. Выборочные данные проверяли 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. Уровень значимости  $p < 0,05$  принимали за статистически значимый.

Учитывая накопление лейкоцитов и макрофагов в миокарде в процессе развития МИМ, следовало в первую очередь определить уровень биологической активности лейкоцитов.

Кислород-зависимая биоцидность лейкоцитов резко возрастала уже с первых суток введения эпинефрина и продолжала увеличиваться вплоть до окончания эксперимента (14-е сутки). Это подтверждено как результатами теста с нитросиним тетразолием, так и показателями изменения хемилюминесцентной активности крови (табл. 1). Соответственно увеличивался синтез активных кислородных метаболитов. Как известно, гиперкатехоламинемия – один из важных патогенетических факторов развития как стрессорного, так и ишемического повреждения миокарда [5–8]. При этом одной из основных причин клеточного повреждения считают инициацию катехоламинами процессов перекисного окисления липидов, обусловленного наработкой активных кислородных метаболитов [2].

Результаты исследования интенсивности перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты (табл. 2) показали, что у животных с МИМ уже с 1-х суток обнаруживалось повышение накопления малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и diketонов. Этот процесс нарастал параллельно с увеличением объёма повреждения миокарда. Одновременно на фоне повышенного образования липоперекисей происходило снижение активности каталазы, супероксиддисмутазы, содержания восстановленного глутатиона, которое держалось вплоть до 14-х суток эксперимента (см. табл. 2).

В результате этого нарушался естественный

баланс между про- и антиоксидантными системами организма, что является одним из механизмов деструктивного действия активных кислородных метаболитов. При этом основной мишенью поражения становятся клеточные мембраны. Кроме того, активные кислородные метаболиты, по-видимому, самостоятельно могут быть индукторами коронаростазма [5]. Замыкается своеобразный порочный круг: повышение концентрации катехоламинов приводит к резкому усилению синтеза активных кислородных метаболитов, активации процессов перекисного окисления липидов, которые в свою очередь могут индуцировать коронаростазм, истощение антиоксидантных факторов, что ещё более усугубляет ишемию сердечной мышцы, в конечном итоге опять же приводя к усилению свободно-радикальных процессов в миокарде. Таким образом, активация эндогенных механизмов генерации активных кислородных метаболитов приводит к напряжению антиоксидантной защиты и развитию так называемого окислительного стресса – важного звена патогенеза повреждения миокарда [2, 6, 9].

Как известно, лейкоциты и макрофаги, накапливающиеся в миокарде при его повреждении, являются основным источником таких воспалительных цитокинов, как интерлейкины-1 и -6, ФНО $\alpha$  [4]. Интерлейкины и, особенно, ФНО $\alpha$  вызывают резкие сосудистые расстройства в зоне воспаления. Это связано с тем, что нейтрофилы и макрофаги не только образуют, но и сами подвергаются их действию, в результате чего активируются и начинают вести себя более агрессивно по отношению к эндотелию сосудов. Концентрация провоспалительных цитокинов в крови отражает тяжесть течения инфаркта миокарда. К тому же гипоксия, сопровождающая инфаркт миокарда, усиливает базальную и липополисахарид-индуцированную экспрессию рецепторов ФНО в лейкоцитах. Следовательно, целесообразно определение концентрации указанных цитокинов в динамике течения МИМ у экспериментальных животных.

Содержание интерлейкина-1 $\beta$  постепенно нарастало параллельно с увеличением деструктивных нарушений в миокарде у крыс с МИМ. На 3-и сутки концентрация интерлейкина-1 $\beta$  была

выше, чем в контроле, почти на 40% ( $p < 0,01$ ), на 14-е сутки — на 85% ( $p < 0,01$ , табл. 3).

Концентрация ФНО $\alpha$  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 данного цитокина возрастало на 33%, на 3-и сутки — почти в 2 раза. На 14-е сутки уровень ФНО $\alpha$  был уже в 2,3 раза выше, чем в контроле. Синтез интерлейкина-6 начинал возрастать гораздо позже — на 3-и сутки МИМ. Так, на этом сроке содержание интерлейкина-6 превышало контрольный уровень почти в 3 раза, на 14-й день — в 5,5 раза. Эти данные свидетельствуют о том, что у крыс с МИМ воспалительные изменения сохраняются до конца эксперимента.

### ВЫВОД

Длительное введение эпинефрина экспериментальным животным вызывает повышение биоцидной активности нейтрофилов, сопровождающееся увеличением выделения активных кислородных метаболитов, провоспалительных цитокинов, интенсификацией перекисного окисления липидов и снижением компенсации со стороны антиоксидантной защиты, что в совокупности может быть мощным триггером повреждения миокарда.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов / Под ред. Д.Н. Маянского. — Новосибирск, 1995. — Т. 2. — С. 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. *Камышиников В.С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. — Минск: Беларусь, 2000. — Т. 2. — 463 с.
4. *Маянский Д.Н.* Лекции по клинической патологии. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 249 с.
5. *Меерсон Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М.: Медицина, 1984. — 272 с.
6. *Ольбинская Л.И., Литвицкий П.Ф.* Коронарная и миокардиальная недостаточность. — М.: Медицина, 2006. — С. 272.
7. *Савельев В.С., Петухов В.А.* Липидный дистресс-синдром. — М.: МАКС Пресс, 2010. — 658 с.
8. *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. — Vol. 11. — P. 800-813.
9. *Van Lenten B.J., Navab M., Shih D. et al.* The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2001. — Vol. 1, N 3-4. — P. 155-161.

УДК 612.084: 612.017.1: 616.441-008.61-008.64: 616.311.2-002: 616-001.4-002

НО20

## ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГИПО- И ГИПЕРТИРЕОЗОМ

*Найля Назибовна Маянская<sup>1\*</sup>, Сергей Сергеевич Рымарь<sup>2</sup>, Светлана Дмитриевна Маянская<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Казанский государственный медицинский университет,*

<sup>2</sup>*Медицинский центр «Мир здоровья», Новосибирск*

### Реферат

**Цель.** Выявление особенностей изменения воспалительных реакций у крыс с экспериментальной дисфункцией щитовидной железы.

**Методы.** У крыс линии Вистар вызывали экспериментальный гипотиреоз (50 животных) ежедневным введением *per os* фармакопейного тиреостатика тиамазола (мерказолила) или гипертиреоз (50 животных) введением лиотиронина (трийодтиронина 50), после чего у животных воспроизводили воспалительную патологию путём нанесения раны в десне. В качестве контроля использовали 10 интактных крыс.

**Результаты.** Экспериментальный гипотиреоз сопровождался снижением биоцидности фагоцитов как в ткани пародонта, так и в крови, уменьшением активности лизосомальных ферментов и ферментов антиоксидантной защиты, накоплением продуктов перекисного окисления липидов. При экспериментальном воспалении в тканях пародонта у крыс с гипотиреозом нагноительные процессы выявляли в 1,5 раза чаще, чем у крыс с нормальным уровнем тиреоидных гормонов, за счёт более низкой биоцидной активности фагоцитирующих клеток и антиоксидантной защиты. Экспериментальный гипертиреоз сопровождался повышением биоцидности и снижением функциональных резервов фагоцитирующих клеток как в ткани пародонта, так и в крови, снижением компенсаторных возможностей антиоксидантной системы и ростом интенсивности перекисного окисления липидов. Изменения концентрации фактора некроза опухоли альфа в сыворотке крови в обеих моделях дисфункции щитовидной железы соответствовали изменениям биоцидности фагоцитов. Нагноительные процессы в пародонте у крыс с экспериментальным гипертиреозом на 7-е сутки выявляли в 2 раза реже, чем у крыс с нормальным уровнем тиреоидных гормонов, за счёт более высокой биоцидной активности тканевых макрофагов и нейтрофилов крови.

**Вывод.** Экспериментальный гипотиреоз сопровождается усилением напряжённости системы перекисного окисления липидов и снижением способности тканей к репарации; при экспериментальном гипертиреозе про-

Адрес для переписки: nmayansk@mail.ru