

© САТУРСКАЯ А.С., 2015

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ-АЛЬФА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ДИФфуЗНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА У КРЫС С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

САТУРСКАЯ А.С.

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского
Министерства здравоохранения Украины», Украина

Резюме.

В работе анализируются результаты экспериментального исследования особенностей изменений концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови при развитии диффузного кардиосклероза (ДКС) у крыс с разной устойчивостью к гипоксии. Эксперименты проведены на 96 половозрелых белых нелинейных крысах-самцах, которые были разделены на экспериментальные группы с различной устойчивостью к экзогенной гипобарической гипоксии. Животным моделировали диффузный ишемически-некротический кардиосклероз. Выявлено, что при моделировании диффузного кардиосклероза содержание ФНО- α в сыворотке крови животных значительно возрастает на этапе наблюдения 7 суток диффузного кардиосклероза и удерживается на высоком уровне до следующих этапов наблюдения: 14 и 30 суток диффузного кардиосклероза. Выявлено, что интенсивность увеличения содержания ФНО- α в сыворотке крови животных в группах с различной устойчивостью к гипоксии неодинаковая: наибольшая – у низкоустойчивых к гипоксии животных и наименьшая – у высокоустойчивых к гипоксии животных, что играет решающую роль в развитии кардиосклероза у животных с различной резистентностью к гипоксии. Эта закономерность прослеживается на всех этапах наблюдения, но наиболее выражена в раннем периоде кардиосклеротического процесса. Полученные данные проанализированы с использованием новейших достижений науки в данной сфере.

Ключевые слова: гипоксия, диффузный кардиосклероз, фактор некроза опухолей-альфа.

Abstract.

The article presents the analysis of the results of an experimental study of the changes of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) concentration in the blood serum in the development of diffuse cardiosclerosis in rats with different resistance to hypoxia. The experiments were conducted on 96 experimental white male rats which were divided into experimental groups with different resistance to exogenous hypobaric hypoxia. The experimental model of diffuse cardiosclerosis (DCS) was simulated. Experimentally it has been proved that, in the development of DCS, TNF- α concentration in the blood serum of animals increases significantly after 7 days of modelling. TNF- α concentration in the blood serum is maintained at a high level throughout the next stages of observation: 14 days and 30 days of DCS. The study has shown that the intensity of TNF- α concentration increase in the blood serum of animals in the groups with different resistance to hypoxia varies: it is the greatest in animals with low resistance to hypoxia and the lowest in animals with high resistance to hypoxia. This pattern is observed at all stages of observation, being most clearly marked in the early period of cardiosclerotic process. The data obtained have been analyzed with the use of the latest scientific achievements in the given field.

Key words: hypoxia, diffuse cardiosclerosis, tumor necrosis factor-alpha.

В последнее время значительный интерес для ученых экспериментальной [1] и клинической [2-5] медицины представляет кардиосклероз как одна из клинических форм ишемической болезни сердца. В патогенезе многих сердечных заболеваний, в том числе и кардиосклероза, до сих пор остаются недостаточно изученными некото-

рые механизмы межклеточных взаимодействий, которые значительно влияют на дальнейшее развитие патологии и определяют исход болезни. Среди таких регуляторов значимую роль играют цитокины [6, 7], которые, благодаря регулирующей функции, обеспечивают основу для межклеточных взаимоотношений, ответствен-

ных за инициацию, поддержку и потенциальный характер иммунного ответа при развитии воспаления. В наших предыдущих работах мы уже изучали некоторые особенности изменения цитокинового профиля крови, а также особенности баланса про- и противовоспалительных цитокинов при экспериментальном диффузном кардиосклерозе у крыс с различной устойчивостью к гипоксии [8, 9], в то время как изменения содержания фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) при данной патологии еще не изучено. Этот внеклеточный белок, являющийся многофункциональным провоспалительным цитокином, синтезируется в основном моноцитами и макрофагами как мембранный белок с молекулярной массой 26 кДа (233 аминокислоты). Эта форма цитокина не обладает активностью, но способна активироваться с помощью специфической металлопротеазы ADAM17, под действием которой мембрано-связывающий фрагмент отщепляется и образуется растворимый ФНО с молекулярной массой 17 кДа (157 аминокислот). Новейшие исследования в этой области показывают, что ADAM17 активируется зависимыми от гипоксии механизмами [10] с помощью EGFR / PI3K / Akt пути. Поскольку гипоксия является ведущим звеном в патогенезе изучаемой нами патологии [8, 9], это еще раз подтверждает необходимость изучения особенностей влияния цитокиновых механизмов, в том числе ФНО- α при кардиосклеротическом процессе у животных с разной резистентностью к гипоксии.

Целью нашего исследования является изучение особенностей изменения концентрации ФНО- α в сыворотке крови при диффузном кардиосклеротическом процессе, а также изучение влияния врожденной устойчивости к гипоксии на эти изменения.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проведено на 96 белых лабораторных крысах-самцах массой 190-250 г. Экспериментальные животные находились в стандартных условиях вивария, получали сбалансированное питание. Эксперименты проводились с соблюдением общих правил и положений Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей (Страсбург, 1986), и Общих этических принципов экспериментов на животных (Киев, 2001).

Используя методику В.Я. Березовского, животных разделили на экспериментальные группы, в зависимости от их устойчивости к гипоксии: низкоустойчивых (НГЖ), среднеустойчивых (СГЖ) и высокоустойчивых к гипоксии животных (ВГЖ). Данная методика базируется на определении времени выживания животных в барокамере, при разрежении воздуха до 30 мм рт. ст. (эквивалентно пребыванию на высоте 12000 метров над уровнем моря). Наблюдали за состоянием животного, отмечая время до появления агональных судорог или второго агонального вдоха. Указанный промежуток времени принимали за время выживания животного, которое свидетельствует об индивидуальной устойчивости каждого животного к гипоксии. Описанный тест всем экспериментальным животным проводили дважды с интервалом в две недели.

Животным основных групп моделировали диффузный ишемически-некротический кардиосклероз (ДКС) по методике М.Р. Хары, А.С. Сатурской [11] путем двукратного, с интервалом в 7 суток, введения раствора адреналина гидротартрата (0,5 мг/кг) внутримышечно и введения 1,0 мл 5% раствора кальция глюконата в расчете на 100 г массы животного интраперитонеально.

Эвтаназию животных осуществляли путем тотального кровопускания под общей анестезией с помощью интраперитонеального введения тиопентала натрия (50 мг/кг), поэтапно выводя животных с эксперимента через 7, 14 и 30 суток после моделирования ДКС (по 8 особей каждой группы). В качестве объективного критерия эффективности экспериментальной модели использовали морфологическое исследование миокарда для выявления соединительнотканых элементов с помощью окраски гистологических препаратов по Масону [12] на этапе 30 суток ДКС.

В сыворотке крови определяли концентрацию ФНО- α [7] методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов «ELISA Kit for Rat Uscn, Life Science Inc» в соответствии с инструкциями фирмы-производителя на анализаторе STAT-FAX и выражали в нг/л.

Статистическая обработка результатов выполнена в отделе системных статистических исследований ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского Министерства здраво-

охранения Украины» в программном пакете Statsoft STATISTICA 6.0. («Statsoft», США) с использованием непараметрических методов оценки полученных данных. Рассчитывали значение средней арифметической выборки (M) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность разницы значений между независимыми количественными величинами определяли с помощью критерия Манна-Уитни. Различия между величинами считали достоверными при величине $p < 0,05$.

Результаты

Результаты определения содержания ФНО- α в сыворотке крови крыс после моделирования ДКС показали, что концентрация исследуемого цитокина значительно увеличилась. На начальном этапе наблюдения, через 7 суток после моделирования ДКС содержание ФНО- α в сыворотке крови животных возрастало (табл. 1), но с неодинаковой интенсивностью в группах с различной устойчивостью к гипоксии.

У низкоустойчивых к гипоксии животных этот показатель был в 3,2 раза больше ($p < 0,001$) на этапе наблюдения 7 суток ДКС, чем у контрольных крыс с низкой устойчивостью к гипоксии. Дальнейшее развитие кардиосклеротического процесса сопровождалось повышенной продукцией этого цитокина, и на этапе наблюдения 14 суток ДКС он был в 2,9 раза больше ($p < 0,001$), а на 30 суток ДКС – в 2,6 раза больше ($p < 0,001$), чем в контрольной группе низкоустойчивых к гипоксии животных.

У крыс со средней устойчивостью к гипоксии изменения содержания ФНО- α в сыворотке крови были менее интенсивными. Через

7 суток после моделирования ДКС показатель был выше показателя контрольной группы в 2,3 раза ($p < 0,001$). На следующих этапах наблюдения показатель несколько снижился, но оставался на высоком уровне: через 14 суток ДКС – был в 2,1 раза ($p < 0,001$) выше, чем у контрольной группы СГЖ, а через 30 суток – соответственно в 1,9 раза ($p < 0,01$) выше.

Высокоустойчивые к гипоксии животные на моделирование ДКС среагировали наименее интенсивными изменениями содержания ФНО- α в сыворотке крови. Через 7 суток после моделирования ДКС содержание ФНО- α в сыворотке крови было на 53,0% ($p < 0,01$) больше, чем у контрольной группы ВГЖ, через 14 суток ДКС – на 44,0% ($p < 0,01$), а через 30 суток – на 39,0% ($p < 0,01$) больше, чем содержание ФНО- α в сыворотке крови контрольных животных с высокой устойчивостью к гипоксии.

Сопоставление концентрации ФНО- α в сыворотке крови в контрольных группах животных с различной устойчивостью к гипоксии показало, что достоверных отличий этого показателя до моделирования патологии не наблюдалось. При развитии экспериментального кардиосклероза, на этапе наблюдения 7 суток ДКС концентрация ФНО- α в сыворотке крови группы НГЖ была больше, чем у СГЖ на 45,1% ($p < 0,001$), а у ВГЖ этот показатель был на 40,1% ($p < 0,001$) меньше, чем у СГЖ (рис. 1). Различия между животными с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии на данном этапе составляло 2,42 раза ($p < 0,001$). На этапе наблюдения 14 суток ДКС содержание ФНО- α в сыворотке крови у НГЖ было больше, чем животных со средней устойчивостью к гипоксии на 39,6% ($p < 0,001$). У животных с высокой устойчивостью к гипоксии этот показатель был ниже, чем в группе СГЖ на

Таблица 1 – Концентрация ФНО- α , нг/л, в сыворотке крови крыс с разной устойчивостью к гипоксии на этапах развития диффузного кардиосклероза, (M \pm m)

Устойчивость животных к гипоксии	Контроль (n=8)	Этап наблюдения при моделировании ДКС		
		7 суток (n=8)	14 суток (n=8)	30 суток (n=8)
Низкоустойчивые	1,44 \pm 0,09	4,63 \pm 0,11 $p < 0,001$	4,23 \pm 0,19 $p < 0,001$	3,74 \pm 0,14 $p < 0,001$
Среднеустойчивые	1,41 \pm 0,11	3,19 \pm 0,12 $p < 0,001$	3,03 \pm 0,12 $p < 0,001$	2,86 \pm 0,11 $p < 0,001$
Высокоустойчивые	1,25 \pm 0,11	1,91 \pm 0,15 $p < 0,01$	1,80 \pm 0,12 $p < 0,01$	1,74 \pm 0,17 $p < 0,01$

Примечание: p – достоверность различий показателя на данном этапе по отношению к показателю контрольной группы животных.

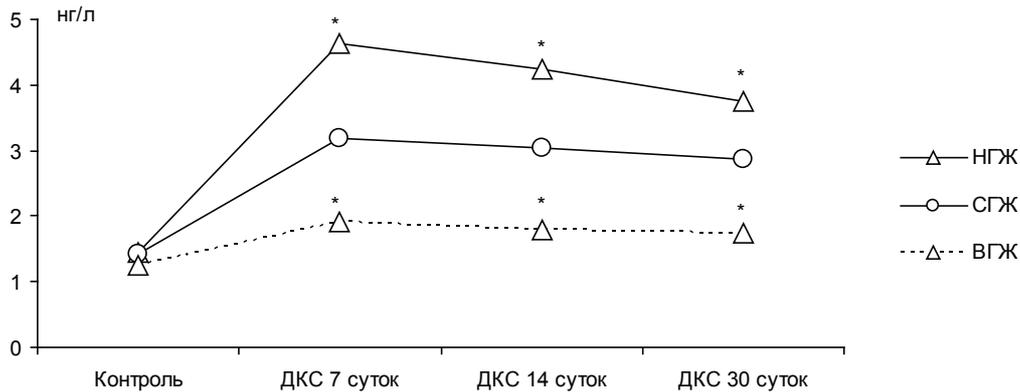


Рисунок 1 – Динамика концентрации ФНО-α в сыворотке крови у животных с различной устойчивостью к гипоксии при развитии диффузного кардиосклероза (ДКС):
* $p < 0,05$ – достоверность различий по отношению к показателю группы среднеустойчивых к гипоксии животных на данном этапе наблюдения).

40,5% ($p < 0,001$). Различие между животными с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии по показателю концентрации ФНО-α в сыворотке крови на данном этапе составляло 2,35 раза ($p < 0,001$), а к этапу наблюдения 30 суток ДКС – 2,1 раза ($p < 0,001$).

У НГЖ концентрация ФНО-α в сыворотке крови на этапе наблюдения 30 суток ДКС была больше, чем в группе СГЖ на 30,8% ($p < 0,01$). У животных с высокой устойчивостью к гипоксии этот показатель на данном этапе был меньше, чем показатель в группе среднеустойчивых к гипоксии животных на 39,2% ($p < 0,001$). В целом можно утверждать, что на всех этапах наблюдения при развитии диффузного кардиосклероза содержание ФНО-α в сыворотке крови у животных с низкой устойчивостью к гипоксии удерживалось выше, а у животных с высокой устойчивостью к гипоксии – ниже уровня показателя среднеустойчивых к гипоксии животных.

Обсуждение

Анализ полученных результатов по оценке содержания ФНО-α в сыворотке крови животных, которым моделировали ДКС, представляет значительный интерес, ввиду того, что этот цитокин является одним из центральных цитокинов, которые принимают участие в обеспечении патофизиологических механизмов при различных заболеваниях.

Экспрессия ФНО-α запускает каскад клеточных реакций, что в итоге приводит к продукции других цитокинов, необходимых для поддержания воспалительного процесса.

ФНО-α проявляет способность активировать тканевые и иммунные клетки, индуцируя экспрессию множества цитокинов, включая ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 [13].

Активация продукции цитокинов под влиянием увеличения содержания ФНО-α в первую очередь регулирует развитие местных защитных реакций в тканях с участием различных типов клеток крови, эндотелия, соединительной ткани. Цитокины также способны воздействовать на иммунную систему, осуществляя взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом, действуя в обоих направлениях. На уровне организма цитокины осуществляют связь между иммунной, нервной, эндокринной, кроветворной и другими системами и служат для их вовлечения в организацию и регуляцию защитных реакций [13]. Среди очень большого разнообразия цитокинов, а сейчас известно уже более 100 веществ, относящихся к семейству цитокинов [13], именно ФНО-α уделяют до сих пор особое внимание в патогенезе развития множества заболеваний, как неспецифическому, но, иногда, решающему фактору. Известно, что цитокины, и в частности ФНО-α, могут влиять на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток-мишеней [14], а также индуцировать апоптоз и ремоделирование миокарда [15]. Сигнал к апоптозу проводится с участием специфического участка рецепторов группы ФНО, так называемого «домена смерти» (death domain). Дифференцировочный сигнал, приводящий к выбору пути развития либо терминальной дифференциров-

ки клеток, осуществляется с участием внутриклеточных белков STAT (сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции). G-белки участвуют в передаче сигнала от хемокинов, что приводит к усилению миграции и адгезии клеток. Существует несколько вариантов проявления биологической активности в зависимости от участия различных внутриклеточных систем в передаче сигнала от рецептора, что связано с особенностями конкретных клеточных мишеней [16].

В полученных нами данных четко просматривается реакция увеличения содержания ФНО- α в ответ на инициацию повреждения кардиомиоцитов. В то же время, поддержание содержания ФНО- α на высоком уровне на всех этапах наблюдения, по нашему мнению, свидетельствует о продолжении ишемических и некротических изменений в миокарде. Это подтверждается полученными нами ранее данными о повышенном содержании первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов и провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 при моделировании ДКС [9]. ФНО- α может и сам быть причиной окислительного стресса, посредством активации фосфолипазы А2, которая стимулирует образование эйкозаноидов, ингибирующих фермент митохондриальную MnSOD. Этот фермент метаболизирует супероксид-анион, поэтому при его ингибировании происходит накопление супероксид-анионов и повреждение митохондриальной мембраны. Умеренное, но не чрезмерное, увеличение содержания ФНО- α и других провоспалительных цитокинов на начальном этапе развития патологии следует рассматривать как положительное явление, поскольку цитокины стимулируют пролиферацию фибробластов и клеток эпителия, что чрезвычайно важно для заживления повреждения и восстановления целостности ткани [13]. Но полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении продукции ФНО- α при развитии ДКС на первом этапе наблюдения, особенно у низкоустойчивых к гипоксии животных. Продолжающаяся ишемия и вторичное повреждение ткани миокарда приводит к хронизации процесса, что подтверждается поддержанием продукции ФНО- α на высоком уровне при дальнейшем наблюдении. Результаты показали, что наименее интенсивная продукция ФНО- α при моделируемой патологии была у высокоустойчивых

к гипоксии животных. Ввиду того, что концентрация повреждающих агентов, используемых в данной модели, слишком велика, патологический процесс все же развивается. Учеными Caretti A., Morel S. и др. получены убедительные данные о значительном увеличении содержания гипоксия-индуцированного фактора (HIF) при экспериментальной гипоксии миокарда [17]. В условиях хронической гипоксии рост уровня HIF-1 α приводит к необратимому повреждению структур миокарда и развитию фиброза [17].

Гипоксические влияния также ведут к значительным кардиосклеротическим изменениям при старении организма. Исследования в этой области [18] показали, что возрастные изменения сопровождаются соответствующими изменениями в системе HIF, которые лежат в основе пониженной способности пожилых людей справляться с гипоксией. Есть также некоторые свидетельства того, что HIF функционально связан с самим процессом старения [18]. Основными точками воздействия HIF-1 α при этом являются: непосредственная регуляция фиброгенеза, контроль эпитеально-мезангиальной трансформации, модуляция процессов воспаления [19].

Заключение

1. При моделировании ДКС содержание ФНО- α в сыворотке крови животных значительно возрастает до этапа наблюдения 7 суток ДКС и удерживается на высоком уровне на этапах наблюдения 14 и 30 суток ДКС.

2. Интенсивность увеличения содержания ФНО- α в сыворотке крови животных в группах с различной устойчивостью к гипоксии неодинаковая: наибольшая – у низкоустойчивых к гипоксии животных и наименьшая – у высокоустойчивых к гипоксии животных, что играет решающую роль в развитии кардиосклероза у животных с различной резистентностью к гипоксии.

Перспективы дальнейших исследований. Принимая во внимание то, что ФНО- α относится к группе факторов роста и дифференцировки T и B лимфоцитов, полученные в экспериментальной работе результаты определяют дальнейший путь изучения данной патологии. Целесообразно изучить реакцию иммунной системы у животных с разной резистентностью к

гипоксии на этапах развития кардиосклеротического процесса.

Литература

1. Effects of telmisartan on inflammation and fibrosis after acute myocardial infarction in rats / Z. Song [et al.] // *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* – 2014 Sep. – Vol. 94, N 33. – P. 2628–2633.
2. Endomyocardial fibrosis: pathological and molecular findings of surgically resected ventricular endomyocardium / S. D. Iglezias [et al.] // *Virchows. Arch.* – 2008 Sep. – Vol. 453, N 3. – P. 233–241.
3. Echocardiographic predictors of functional capacity in endomyocardial fibrosis patients / V. M. C. Salemi [et al.] // *Eur. J. Echocardiogr.* – 2009. – Vol. 10, N 3. – P. 400–405.
4. Low-grade inflammation and the phenotypic expression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy // J. Kuusisto [et al.] // *Heart.* – 2012 Jul. – Vol. 98, N 13. – P. 1007–1013.
5. Westermann, D. Does inflammation trigger fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy: a burning question? / D. Westermann // *Heart.* – 2012 Jul. – Vol. 98, N 13. – P. 965–966.
6. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling / M. Nian [et al.] // *Circ. Res.* – 2004 Jun. – Vol. 94, N 1. – P. 1543–1553.
7. Сенников, С. В. Методы определения цитокинов / С. В. Сенников, А. Н. Силков // *Цитокины и воспаление.* – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 22–27.
8. Сатурская, А. С. Особенности баланса про- и противовоспалительных цитокинов при экспериментальном диффузном кардиосклерозе у крыс в зависимости от их врожденной устойчивости к гипоксии [Электронный ресурс] / А. С. Сатурская // *Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал.* – 2015. – Т. 14, вып. 1. – Режим доступа: <http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/N-45-html/saturskaya/saturskaya.htm>
9. Сатурская, А. С. Изменения цитокинового профиля крови при экспериментальном диффузном кардиосклерозе у крыс с различной устойчивостью к гипоксии / А. С. Сатурская, Ю. И. Бондаренко, В. Е. Пельх // *Journal of Education, Health and Sport.* – 2015. – Т. 5, № 2. – С. 66–78.
10. Wang, X. J. ADAM17 mediates hypoxia-induced drug resistance in hepatocellular carcinoma cells through activation of EGFR/PI3K/Akt pathway / X. J. Wang, C. W. Feng, M. Li // *Mol. Cell. Biochem.* – 2013 Aug. – Vol. 380, N 1/2. – P. 57–66.
11. Пат. 66297 Украина, МПК G 09 B 23/28. Способ моделирования диффузного кардиосклероза / Хара М. Р., Боднар Я. Я., Сатурская А. С., Пельх В. Е. ; заявитель и патентообладатель Терн. гос. мед. ун-т им. И. Я. Горбачевского. – № u 2011 08088 ; заявл. 29.06.11 ; опубл. 26.12.11, Бюл. № 24.
12. Меркулов, Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л. : Медицина, 1969. – 424 с.
13. Симбирцев, А. С. Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // *Цитокины и воспаление.* – 2004. – № 2. – С. 16–22.
14. Proliferation, differentiation and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro / S. Neuhoff [et al.] // *Experimental Hematology.* – 2007 Jul. – Vol. 35, N 1. – P. 1119–1131.
15. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways / S. B. Haudek [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007 Sep. – Vol. 117, N 9. – P. 2692–2701.
16. Heim, M. The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus / M. Heim // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1996 Jan. – Vol. 26, N 1. – P. 1–12.
17. Heart HIF-1 α and MAP kinases during hypoxia: are they associated in vivo? / A. Caretti [et al.] // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2007 Jul. – Vol. 232, N 7. – P. 887–894.
18. Katschinski, D. M. Is there a molecular connection between hypoxia and aging? / D. M. Katschinski // *Exp. Gerontol.* – 2006 May. – Vol. 41, N 5. – P. 482–484.
19. HIF-1 α and HIF-2 α induce angiogenesis and improve muscle energy recovery / H. Niemi [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2014 Oct. – Vol. 44, N 10. – P. 989–999.

Поступила 06.03.2015 г.

Принята в печать 10.06.2015 г.

Сведения об авторах:

Сатурская А.С. – к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского Министерства здравоохранения Украины», Украина.

Адрес для корреспонденции: Украина, 46000, г. Тернополь, ул. Чехова, 3, ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского Министерства здравоохранения Украины», кафедра патологической физиологии. E-mail: saturska.gs@gmail.com – Сатурская Анна Степановна.