

УДК 616.153.915-092.4:616-008.9-097

РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ИНИЦИИРОВАННИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В РАННЮЮ СТАДИЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОГЕНЕЗА

Немытышева Е.В., Щеглова Н.Е., Заварин В.В., Егорова Е.Н.

ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия Минздрава России»,
Тверь, e-mail: natali.sh45@mail.ru

На экспериментальной модели гиперлипидемии у кроликов показано развитие атерогенной дислипидемии, нарастание уровней С-реактивного белка и эндогенных токсических субстанций – лактата и перекисей, способствующих атерогенезу. Концентрация эндотоксинов и фактора некроза опухоли альфа при этом увеличивалась незначительно. Одновременное уменьшение времени свертывания крови свидетельствует о вовлечении системы гемостаза в процесс атерогенеза. Изменения показателей инфракрасного спектра сыворотки крови указывает на изменения характера структурной организации водного компонента крови. Это, в свою очередь, влечет перестройку метаболизма органов и тканей и может служить причиной функциональных нарушений в организме. Поэтому, атерогенная дислипидемия за счет биохимических, метаболических и иммунных сдвигов может иметь значение для индукции системного воспаления, вовлекая систему гемостаза, что закономерно ведет к поддержанию и прогрессированию патологического процесса.

Ключевые слова: гиперлипидемия, экспериментальная модель, кролики, время свертывания, инфракрасный спектр

THE ROLE OF IMMUNE AND METABOLIC CHANGES IN THE INITIATION OF INFLAMMATORY PROCESS IN EARLY STAGE OF EXPERIMENTAL ATEROGENESIS

Nemytysheva E.V., Scheglova N.E., Zavarin V.V., Egorova E.N.

Tver State Medical Academy, Tver, e-mail: natali.sh45@mail.ru

An experimental model of hyperlipidemia in rabbits has shown a development of an atherogenous dyslipidemia, Increase of levels of C-reactive protein and endogenous toxic substances – a lactate and the peroxides also promoting an atherogenesis. The concentration of endotoxins and tumor necrosis factor alpha has increased insignificant. Simultaneous decrease in blood clotting time indicates the involvement of the haemostatic system in the process of atherogenesis. Changes of the infrared spectrum of serum indicate a change in the nature of the structural organization of the water component of blood. This changes further implies reorganization of the metabolism of organs and tissues and can cause functional disorders in organism, for example sudden cardiac death, which is the morphological substrate of atheromatous coronary vessels. Therefore the atherogenous dyslipidemia can be important for the induction of systemic inflammation involving the haemostatic system, that take place to the maintenance and progression of pathological process.

Keywords: hyperlipidemia, experimental model, rabbits, clotting time, infrared spectrum

В начале XXI века сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются важнейшей медицинской и социальной проблемой для всех экономически развитых стран. Один из основных факторов глобальной эпидемии ССЗ связан с широким распространением атеросклероза в популяции. Только в нашей стране от ССЗ заболеваний, которые возникают в результате атеросклероза, умирает более 1 млн человек ежегодно [1].

Из огромного количества теорий и гипотез патогенеза атеросклероза сегодня широкое распространение получили иммуновоспалительная и тромбогенная теории.

В настоящее время накоплено достаточное количество доказательств, полученных в экспериментальных и клинических исследованиях, свидетельствующих об участии системной воспалительной реакции в развитии атеросклероза [2, 3].

При этом воспалительная теория атерогенеза доказательно дополняется данными об участии иммунных и метаболических

факторов прежде всего липидной природы в развитии атероматозного поражения сосудистой стенки [4].

В то же время существенным недостатком, затрудняющим эффективное проведение превентивных кардиологических мероприятий, является недостаточное количество знаний о механизмах инициации воспалительных реакций в самую раннюю стадию атерогенеза.

Цель исследования – изучение изменений биохимических, метаболических, иммунологических факторов, показателей инфракрасного спектра крови на самых ранних стадиях атерогенеза.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 20 беспородных кроликах-самцах, массой тела $3,75 \pm 0,1$ кг. Гиперлипидемию моделировали внутривенным введением 10 % жировой эмульсии для парентерального питания «Липофундин» производства Braun Medical (Германия) ежедневно по 0,5 мл/кг в течение 30 дней [5]. При работе с кроликами руководствовались требо-

ваниями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Лабораторные исследования крови выполняли дважды: исходное значение показате-лей – перед первым введением и конечный уровень – через сутки после последнего введения препарата.

Липидный спектр сыворотки крови (общий холестерин – ОХС, триглицериды – ТГ, липопротеины высокой плотности – ЛПВП) исследовали, используя реактивы производства Bioson® (Германия). Рассчитывали концентрацию ЛПНП, ЛПОНП и коэффициент атерогенности (КА). Уровень лактата определяли энзиматическим методом с применением реактивов производства Bioson® (Германия). Количественное определение общей концентрации перекисей в плазме крови проводилось колориметрическим методом с использованием тест-системы «Oxystab» (Biomedica, Австрия). Биохимические исследования выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Flexor E (Vital Scientific, Нидерланды).

Концентрацию TNF α и СРБ в плазме крови исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем производства Bender MedSystems® (Австрия) и ООО «Хема» (Россия). Результаты ИФА учитывали с помощью микропланшетного мультидетектора Zenyth 1100 (Anthos, Австрия). Уровень эндотоксинемии определяли хромогенным LAL-тестом по конечной точке, используя тест-систему фирмы Charles River Endosafe® (США).

Время свертывания определяли по методу Ли–Уайта.

Инфракрасный спектр изучался с использованием универсальной аппаратно-программной системы «ИКАР-9/1», разработанной в Тверской государственной медицинской академии под руководством профессора Каргаполова А.В., сертифицированной

Госстандартом России как тип средств измерений (сертификат № 5745 от 20.11.98 г.).

При инфракрасной спектроскопии водных растворов и биологических жидкостей существенный вклад в полученные результаты вносит спектр воды. 30 мкл нативной плазмы помещали в кювету из KRS (пластинки из искусственного хлористобромистого таллия и иодистобромистого таллия) аппаратной части системы. Затем проводили спектрофотометрию. В качестве единицы измерения пропускания инфракрасного излучения в каждом диапазоне использовали коэффициент пропускания $\times 100$ (у.е.)

Исследовали 9 диапазонов инфракрасного спектра: 3500–3100 см⁻¹, 3085–2732 см⁻¹, 2120–1880 см⁻¹, 1710–1610 см⁻¹, 1600–1535 см⁻¹, 1543–1396 см⁻¹, 1470–1330 см⁻¹, 1170–1057 см⁻¹, 1087–963 см⁻¹[6].

Во всех выделенных группах рассчитывался средний уровень (M) и ошибка репрезентативности (m) анализируемых показателей. Достоверность изменения показателей в ходе эксперимента оценивалась по t-критерию Стьюдента для парных переменных.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное исследование показало, что курс внутривенного введения кроликам 10% жировой эмульсии вызывал развитие гиперлипидемии (табл. 1). При этом происходило разнонаправленное изменение концентраций липопротеинов, что можно охарактеризовать как дислипидемию, формирующую условия для атерогенеза, о чем свидетельствует высоко достоверное повышение коэффициента атерогенности.

Таблица 1
Биохимические, иммунологические показатели и время свертывания по Ли–Уайту при экспериментальной гиперлипидемии у кроликов

Показатель	Исходное значение	Значение после курса
ОХС, моль/л	1,7 \pm 0,82	2,6 \pm 0,94*
ТГ, моль/л	0,75 \pm 0,13	1,01 \pm 0,4*
ЛПВП, моль/л	0,75 \pm 0,24	0,53 \pm 0,19*
ЛПНП, моль/л	0,95 \pm 0,66	1,51 \pm 0,74
ЛПОНП, моль/л	0,35 \pm 0,06	0,55 \pm 0,25*
КА, ед.	1,74 \pm 0,57	4,1 \pm 1,86**
Лактат, ед/л	8,73 \pm 1,46	15,66 \pm 2,31**
Общее количество перекисей, мкмоль/л	347,3 \pm 50,4	503,1 \pm 68,6**
Эндотоксин, ед/мл	0,042 \pm 0,016	0,049 \pm 0,017
TNF α , пг/мл	38,62 \pm 7,02	40,51 \pm 5,61
СРБ, мг/л	0,04 \pm 0,01	1,0 \pm 0,44**
Время свертывания, мин.	6,67 \pm 1,71	3,89 \pm 0,56*

Примечание: * – статистическая значимость различий относительно предыдущей группы (p < 0,05); ** – значимость различий относительно предыдущей группы (p < 0,01).

Изучение других биохимических и иммунологических показателей, проведенное параллельно с определением показателей липидного обмена, выявило достоверное нарастание уровней лактата, общего ко-

личества перекисей и СРБ. Концентрации эндотоксина (ЭТ) и TNF α при этом увеличились незначительно. Нарастание уровня СРБ при отсутствии реакции со стороны провоспалительного цитокина TNF α и ин-

дуктора иммунных реакций ЭТ можно объяснить повышением активности процессов перекисного окисления, в том числе и липидов, в частности, ЛПНП, которые, как известно, поглощаются макрофагами с образованием «пенистых клеток», участвующих в процессе атерогенеза. В свою очередь активированные макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины, включающиеся в атеросклеротический процесс и формируют инициальное воспаление. Одновременно происходит достоверное уменьшение времени свертывания

крови, что свидетельствует об активации системы гемостаза и ее вовлечении в процесс атерогенеза [7].

При исследовании инфракрасного спектра сыворотки крови было выявлено достоверное изменение показателей – увеличение пропускания инфракрасного излучения водным компонентом сыворотки в диапазоне, характеризующем деформационные колебания ОН-групп ($2120\text{--}1880\text{ см}^{-1}$) и уменьшение пропускания в областях $3500\text{--}3100\text{ см}^{-1}$, характеризующих валентные колебания ОН-групп, $3085\text{--}2732\text{ см}^{-1}$ и $1600\text{--}1535\text{ см}^{-1}$ (табл. 2).

Таблица 2

Показатели инфракрасного спектра крови при экспериментальной гиперлипидемии у кроликов

Каналы	Исходные значения, у.е.	Значение после курса, у.е.
1 $3500\text{--}3100\text{ см}^{-1}$	$1,689 \pm 0,36$	$1,41 \pm 0,12^*$
2 $3085\text{--}2732\text{ см}^{-1}$	$4,91 \pm 0,65$	$4,53 \pm 0,66^*$
3 $2120\text{--}1880\text{ см}^{-1}$	$23,50 \pm 0,32$	$24,31 \pm 0,47^{**}$
4 $1710\text{--}1610\text{ см}^{-1}$	$17,72 \pm 1,23$	$17,77 \pm 0,59$
5 $1600\text{--}1535\text{ см}^{-1}$	$2,74 \pm 0,41$	$2,53 \pm 0,2^*$
6 $1543\text{--}1396\text{ см}^{-1}$	$8,59 \pm 0,93$	$9,0 \pm 0,51$
7 $1470\text{--}1330\text{ см}^{-1}$	$8,46 \pm 1,01$	$8,68 \pm 0,64$
8 $1170\text{--}1057\text{ см}^{-1}$	$10,36 \pm 1,17$	$10,51 \pm 0,58$
9 $1087\text{--}963\text{ см}^{-1}$	$8,69 \pm 1,03$	$8,51 \pm 0,739$

Примечание: * – статистическая значимость различий относительно предыдущей группы ($p < 0,05$); ** – значимость различий относительно предыдущей группы ($p < 0,01$).

Изменения инфракрасного спектра сыворотки крови указывают на изменения характера структурной организации водного компонента крови. Развитие атерогенной гиперлипидемии приводит к изменениям структурной организации водного компонента крови, что в последующем влечет значительную перестройку метаболизма и связанных с ней изменений структурно-функционального состояния различных органов и тканей, а также может являться предпосылкой развития внезапной сердечной смерти, морфологическим субстратом которой является атероматозное поражение коронарных сосудов [8].

Выводы

В проведенном исследовании показано, что у кроликов при экспериментальной гиперлипидемии развивается атерогенная дислипидемия, происходит нарастание уровней СРБ и эндогенных токсических субстанций – лактата и перекисей, способствующих атерогенезу, а также наблюдается уменьшение времени свертывания крови

и изменение показателей инфракрасного спектра крови.

Таким образом, атерогенная дислипидемия за счет биохимических, метаболических и иммунных сдвигов, изменения структурной организации водного компонента крови на самых начальных этапах атерогенеза инициирует индукцию системного воспаления, усугубляющегося по мере прогрессирования хронического системного воспаления, вовлекая в процесс систему гемостаза, что закономерно ведет к поддержанию патологического процесса и его дальнейшему прогрессированию.

Список литературы

1. Кухарчук В.В. Современные и нерешенные вопросы в проблеме атеросклероза в первой декаде XXI века // Терапевтический архив. – 2009. – № 5. – С. 14–20.
2. Роль системного воспаления в развитии кардиоваскулярной и акушерской патологии / М.Б. Игитова, Е.В. Воробьева, И.В. Осипова, Н.П. Гольцова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2009. – № 1. – С. 81–87.
3. Алекперов Э.З., Наджафов Р.Н. Современные концепции о роли воспаления при атеросклерозе // Кардиология. – 2010. – № 3. – С. 88–91.

4. Нагорнев В.А., Восканьянц А.Н. Современные представления о патогенезе атеросклероза // Вестник Российской АМН. – 2006. – № 9–10. – С.66–74.

5. Калинин М.Н., Волков В.С., Заварин В.В. Атеросклероз: патофизиология, лечение, первичная профилактика. – Тверь: РИЦ ТГМА, 2009. – 215 с.

6. Заварин В.В. Изменения показателей инфракрасного спектра тканей при внезапной сердечной смерти и действия факторов риска ее наступления: дис. ... канд. мед. наук. – Тверь, 2001. – С.60, 63–65.

7. Дислипидемии и атеросклероз. Биомаркеры, диагностика и лечение: рук. для врачей / Р.Г. Оганов [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 160 с.

8. Калинин М.Н. Патогенез атерогенных нарушений липидного метаболизма, предшествующих наступлению внезапной коронарной смерти: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 1994.

References

1. Kuharchuk V.V. Terapevticheskiy arhiv – Therapeutic archive. 2009. no. 5, pp. 14–20.

2. Igitova M.B., Vorob'eva E.V., Osipova I.V., Gol'cova N.P. Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika – Cardiovascular therapy and prevention, 2009, no. 1, pp. 81–87.

3. Alekperov Je.Z., Nadzhafov R.N. Kardiologija – Cardiology, 2010, no.3, pp. 88–91.

4. Nagornev V.A., Voskan'janc A.N. Vestnik Rossijskoj AMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences, 2006, no. 9–10, pp. 66–74.

5. Kalinkin M.N., Volkov V.S., Zavarin V.V. Ateroskleroz: patofiziologija, lechenie, pervichnaja profilaktika [Atherosclerosis: pathophysiology, treatment, primary prevention], Tver: RIC TGMA, 2009. 215 p.

6. Zavarin V.V. *Izmenenija pokazatelej infrakrasnogo spektra tkanej pri vnezapnoj serdechnoj smerti i dejstvii faktorov riska ee nastuplenija* [Changes of indicators of infrared spectrum of tissues in sudden cardiac death and effect of risk factors its occurrence]: dis. kand. med. nauk. Tver, 2001, pp. 60, 63–65.

7. *Dislipidemii i ateroskleroz. Biomarkery, diagnostika i lechenie* [Dislipidemia and atherosclerosis. Biomarkers, diagnostics and treatment]: ruk. dlja vrachej R. G. Oganov [i dr.]. M, GJeOTAR-Media, 2009, 160 p.

8. Kalinkin M.N. *Patogenez aterogennyh narushenij lipidnogo metabolizma, predshestvujushhih nastupleniju vnezapnoj koronarnoj smerti* [Patogenesis of atherogenous violations of the lipid metabolism preceding approach of sudden coronary death]: Avtoref. dis. ... d-ra med. nauk. SPb., 1994.

Рецензенты:

Баженов Д.В., д.м.н., профессор, проректор по работе с иностранными обучающимися и международным связям, профессор кафедры анатомии человека, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА» Минздрава России, г. Тверь;

Коричкина Л.Н., д.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии и профессиональных болезней, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА» Минздрава России, г. Тверь.

Работа поступила в редакцию 04.04.2013.